

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 025**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2013 PCT/US2013/054527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14028382**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2013 E 13829280 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2885642**

54 Título: **Métodos y sistemas para el cribado de composiciones que comprenden polisacáridos sulfados no anticoagulantes**

30 Prioridad:

14.08.2012 US 201261683144 P

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

09.01.2020

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zaehlerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

DOCKAL, MICHAEL;

SCHEIFLINGER, FRIEDRICH;

ZHANG, ZHENQING;

TILL, SUSANNE;

KNAPPE, SABINE y

SZABO, CHRISTINA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 737 025 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

Métodos y sistemas para el cribado de composiciones que comprenden polisacáridos sulfados no anticoagulantes

5 INTRODUCCIÓN

[0001] La hemorragia es una de las manifestaciones más graves y significativas de la enfermedad, y puede ocurrir desde un sitio local o ser sistémica. El sangrado localizado puede estar asociado con lesiones y puede complicarse aún más por un mecanismo hemostático defectuoso. La coagulación sanguínea es inadecuada en los trastornos hemorrágicos, que pueden ser causados por trastornos congénitos de la coagulación, trastornos de la coagulación adquiridos o afecciones hemorrágicas inducidas por un traumatismo. Las deficiencias congénitas o adquiridas de cualquiera de los factores de coagulación pueden estar asociados con una tendencia hemorrágica. Los trastornos congénitos de la coagulación incluyen la hemofilia, un trastorno recesivo ligado al cromosoma X que involucra una deficiencia del factor VIII de la coagulación (hemofilia A) o factor IX (hemofilia B) y la enfermedad de von Willebrand, un trastorno hemorrágico poco frecuente que involucra una deficiencia grave del factor de von Willebrand. Los trastornos de la coagulación adquiridos pueden surgir en individuos sin un historial previo de sangrado como resultado de un proceso de enfermedad. Por ejemplo, los trastornos de la coagulación adquiridos pueden ser causados por inhibidores o autoinmunidad contra los factores de coagulación de la sangre, como el factor VIII, el factor de von Willebrand, los factores IX, V, XI, XII y XIII; o por trastornos hemostáticos, como los causados por una enfermedad hepática, que pueden estar asociados con una disminución de la síntesis de los factores de coagulación.

[0002] El documento WO 2005/117912 describe métodos para promover la hemostasia usando polisacáridos sulfatados no anticoagulantes (NASP).

[0003] Zhang et al.; 2011; Glicobiología; 21, 11; p1508; XP009188165 describe la detección de fucoidanos como candidatos a fármacos procoagulantes.

[0004] Dockal et al.; 2011; Base de datos de biosis; Servicio de información de biociencias; acceso a la base de datos nº PREV201200219543; 53ª Reunión Anual y Exposición ASH; XP009188172 describe la caracterización de fucoidanos y sus efectos en un modelo de conejillo de indias inhibido por Factor VIII.

[0005] Dockel et al.; Base de datos de biosis 2011; Servicio de información de biociencias; acceso a la base de datos nº PREV201200218491; 53ª Reunión Anual y Exposición ASH; XP009188173 describe la actividad anticoagulante y el mecanismo de los polisacáridos sulfatados no anticoagulantes.

[0006] El documento WO 2008/103234 describe métodos para purificar fucoidans a partir de extractos de algas marinas.

[0007] El documento WO 2011/088267 describe métodos y composiciones para tratar trastornos de sangrado.

RESUMEN

[0008] La presente invención proporciona un método para evaluar o seleccionar una pluralidad de composiciones que comprenden un NASP (polisacárido sulfatado no anticoagulante) para identificar una composición que sea adecuada para tratar a un sujeto que tenga un trastorno de coagulación de la sangre, comprendiendo el método:

determinando las características de:

la actividad de coagulación y composición química de cada composición;

la estructura molecular de cada NASP;

en donde dicha determinación de la actividad de coagulación comprende evaluar la CE₅₀ para la actividad procoagulante de la composición mediante trombografía automatizada calibrada (CAT), la ventana procoagulante de la composición, y calcular la relación de la actividad procoagulante a la actividad anticoagulante de la composición;

en donde dicha determinación de la estructura molecular comprende determinar el peso molecular de la NASP, el porcentaje en peso de azufre de la NASP y el contenido de fucosa y alginato de la NASP; y

en donde dicha determinación de la composición química comprende determinar los componentes elementales de la composición, y en donde dicha determinación de los componentes elementales de la composición comprende determinar el contenido de impureza de la composición;

en donde dicho método comprende además comparar las características determinadas de la pluralidad de

composiciones que comprenden un NASP;
 en donde dicho método comprende además determinar que una o más de la pluralidad de composiciones pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea cuando la composición comprende:

- 5 un valor de EC_{50} para la actividad procoagulante de 0,3 mg/ml o menos según lo determinado por CAT;
 una ventana procoagulante de 0,1 a 100 mg/mL;
 una relación de la actividad procoagulante a la actividad anticoagulante de la composición que es
 10 10 o mayor; un peso molecular de la NASP que es de 160 kDa o menos;
 un contenido de fucosa de la NASP que es 60% de fucosa o mayor;
 un contenido de alginato de la NASP que es un 10% de alginato o menos;
 un porcentaje en peso de azufre de la NASP que es 8% de azufre en peso o mayor; y
 15 un porcentaje en peso de impurezas en la composición que es 0,1% de impurezas en peso o menos.

[0009] En otros casos, determinar la actividad de coagulación de la composición incluye además evaluar la actividad inhibidora de TFPI de la NASP. En otros casos, determinar la actividad de coagulación de la composición incluye además determinar el efecto de la composición sobre la activación de la vía de contacto.

20 [0010] En otras realizaciones, los métodos incluyen además determinar la polidispersidad del peso molecular de NASP, y determinar la configuración estructural (por ejemplo, enlaces glicosídicos) de la NASP.

[0011] En otras realizaciones más, los métodos incluyen además determinar la composición elemental, el contenido de sacárido no NASP y el contenido de proteína.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0012]

- 30 Las Figuras 1a-b muestran diagramas de flujo que ilustran los pasos para evaluar una o más composiciones de NASP.
 Las Figuras 2a-d muestran ejemplos de datos adquiridos para la actividad procoagulante de composiciones de NASP según se midió usando trombografía automatizada calibrada (CAT).
 La Figura 3 muestra un ejemplo de datos de actividad anticoagulante de composiciones de NASP según se midió utilizando el ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activada (aPTT).
 35 Las Figuras 4a-j muestran ejemplos de datos para la activación por vía de contacto de composiciones de NASP según se midió usando CAT en presencia y ausencia de inhibidor de tripsina de maíz (CTI).
 Las Figuras 5a-d muestran actividades procoagulantes y anticoagulantes de composiciones de NASP separadas por tamaño. La Figura 5a muestra la actividad procoagulante determinada por ensayos CAT en plasma humano inhibido por FVIII. La Figura 5b muestra el efecto anticoagulante medido por ensayos de aPTT. La Figura 5c muestra la actividad procoagulante por los valores de CE_{50} derivados de las curvas de generación de trombina en función del peso molecular. La Figura 5d muestra las tendencias observadas para la actividad anticoagulante.
 40 Las Figuras 6a-d muestran actividades procoagulantes y anticoagulantes de composiciones de NASP sobre sulfatadas y sobre sulfatadas. La Figura 6a muestra la actividad procoagulante determinada por ensayos CAT en plasma humano inhibido por FVIII. La Figura 6b muestra el efecto anticoagulante medido por ensayos de aPTT. La Figura 6c muestra la actividad procoagulante por los valores de CE_{50} derivados de las curvas de generación de trombina en función del peso molecular. La Figura 6d muestra las tendencias observadas para la actividad anticoagulante.
 45 La Figura 7 muestra un ejemplo de datos para medir la inhibición del inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) por composiciones de NASP según se mide por el ensayo de tiempo de protrombina diluida (dPT) según ciertas realizaciones.
 La Figura 8 muestra un ejemplo de un gel de agarosa usado para caracterizar composiciones de NASP de acuerdo con ciertas realizaciones.
 50 La Figura 9 muestra un ejemplo del contenido de monosacáridos para una composición de NASP según se mide por cromatografía iónica de acuerdo con ciertas realizaciones.
 La Figura 10 muestra un ejemplo de ^{13}C -RMN usada para caracterizar la heterogeneidad, el contenido de fucosa y alginato de las composiciones de NASP de acuerdo con ciertas realizaciones.
 La Figura 11 muestra un ejemplo de medición de integrales de la ^{13}C -RMN representada en función del tiempo de retraso de relajación (D1) para composiciones de NASP de acuerdo con ciertas realizaciones.
 55 La Figura 12 muestra un ejemplo de la superposición del índice de refracción por cromatografía de exclusión de tamaño de composiciones de NASP de acuerdo con ciertas realizaciones.
 La Figura 13 muestra un ejemplo de 1H -RMN y ^{13}C -RMN usadas para caracterizar composiciones de NASP separadas por tamaño de acuerdo con ciertas realizaciones.
 60 La Figura 14 muestra ejemplos de 2D-RMN usada para caracterizar composiciones de NASP de acuerdo con ciertas realizaciones.
 65

La Figura 15 muestra un ejemplo de plano 2D de un conjunto de datos 3D-RMN usado para caracterizar composiciones NASP de acuerdo con ciertas realizaciones.

La Figura 16 ilustra un ejemplo de la sulfatación de NASP y la configuración del enlace glicosídico de acuerdo con ciertas realizaciones.

5 La Figura 17 muestra otro ejemplo de 2D-RMN utilizado para caracterizar composiciones NASP de acuerdo con ciertas realizaciones.

La Figura 18 muestra un ejemplo de ¹H-RMN usada para caracterizar NASP desulfatados y sobre sulfatados de acuerdo con ciertas realizaciones.

10 La Figura 19 muestra un ejemplo de ensayo de TFPI-dPT y experimentos de Biacore utilizados para analizar la inhibición del efecto anticoagulante de TFPI y la unión de los NASP a TFPI.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 **[0013]** Antes de que la invención se describa con mayor detalle, debe entenderse que la invención no está limitada a realizaciones particulares descritas en el presente documento, ya que dichas realizaciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y la terminología no pretende ser limitante. El alcance de la invención está limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor declarado o intermedio en el rango indicado, se engloba dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención. Ciertos rangos se presentan aquí con valores numéricos que van precedidos por el término "acerca de". El término "acerca de" se usa en este documento para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como un número que es cercano o aproximadamente al número que el término precede. Al determinar si un número está cerca de o aproximadamente un número recitado específicamente, el número no recitativo cercano o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número recitado específicamente. La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la invención aquí descrita no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden necesitar confirmación independiente.

40 **[0014]** Como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene componentes y características discretas que pueden separarse o combinarse fácilmente con las características de cualquiera de las otras realizaciones. Cualquier método recitado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos recitados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento también se pueden usar en la práctica o el ensayo de la invención, ahora se describen métodos y materiales representativos ilustrativos.

45 **[0015]** En la descripción adicional de la presente invención, los métodos para evaluar una o más composiciones de NASP se describen primero con mayor detalle. A continuación, se revisan los métodos para identificar una composición NASP más que pueda ser adecuada para tratar a un sujeto con un trastorno de la coagulación de la sangre.

MÉTODOS PARA IDENTIFICAR UNA O MÁS COMPOSICIONES DE NASP

50 **[0016]** La invención se refiere a métodos para identificar o seleccionar una pluralidad de composiciones de NASP que son adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea, como se define en las reivindicaciones. Al describir los métodos del sujeto, el término "trastorno de la coagulación de la sangre" se usa aquí en su sentido convencional para referirse a cualquier trastorno asociado con un sangrado excesivo, como un trastorno de la coagulación congénita, un trastorno de la coagulación adquirida, la administración de un anticoagulante o una condición hemorrágica inducida por trauma. Los trastornos hemorrágicos pueden incluir, entre otros, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto, como factor XI, factor XII, precalicreína y kininógeno de alto peso molecular. (HMWK), una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragia clínicamente significativa, como el factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, que incluye afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa2-antiplasmina y sangrado excesivo causado por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo. Alternativamente, un trastorno de coagulación de la sangre puede ser el resultado de administrar un anticoagulante a un sujeto. Por ejemplo, el sujeto puede haber sido tratado con un anticoagulante que incluye, entre otros, heparina, un derivado de cumarina, como warfarina o dicumarol, TFPI, AT III, anticoagulante lúpico, péptido

anticoagulante nematodo (NAPc2), sitio activo bloqueado factor VIIa (factor VIIIai), inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, incluidos fondaparinux, idraparinux, DX-9065a y razaxaban (DPC906), inhibidores de los factores Va y VIIIa, incluyendo proteína C activada (APC) e inhibidores de trombosmodulina, trombosmodulina soluble, incluyendo hirudina, bivalirudina, argatroban y ximelagatrán. En ciertas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a un factor de coagulación, que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo que se une al factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor XI, factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína o cininógeno de alto peso molecular (HMWK).

[0017] El término "sujeto" se refiere a la persona u organismo al que se le diagnostica un trastorno de coagulación de la sangre. Como tales, los sujetos de la invención pueden incluir, pero no se limitan a mamíferos, por ejemplo, seres humanos y otros primates, tales como chimpancés y monos y otras especies de simios; y similares, donde en ciertas realizaciones el sujeto son humanos.

[0018] En la descripción de la presente invención, el término "NASP" se refiere a polisacáridos sulfatados (SP) que exhiben actividad no anticoagulante y anticoagulante en cualquiera de los diversos ensayos de coagulación descritos. En realizaciones de la invención, las composiciones de NASP pueden obtenerse de cualquier fuente conveniente. Por ejemplo, las composiciones de NASP pueden ser composiciones de NASP naturales que se encuentran o se derivan de una fuente natural, tal como de una fuente animal o vegetal y abarcan una amplia gama de subclases que incluyen glicosaminoglicanos, heparinas, fucoidanos, carragenanos, polisulfatos de península, sulfatos de dermatan y sulfatos de dextrano. En algunas realizaciones, las composiciones naturales de NASP se extraen de una fuente biológica. Por "fuente biológica" se entiende un organismo natural o parte de un organismo. Por ejemplo, las composiciones de NASP pueden extraerse de plantas, animales, hongos o bacterias. En particular, las composiciones NASP pueden extraerse de algas comestibles, algas pardas, equinodermos (por ejemplo, erizos de mar, pepinos de mar) y similares. Se puede emplear cualquier protocolo conveniente para extraer la composición NASP de la fuente biológica. Por ejemplo, la composición de NASP se puede extraer de la fuente biológica mediante extracción a base de ácido, degradación enzimática, precipitación selectiva, filtración, entre otros procedimientos. Los métodos para extraer y aislar NASP de fuentes biológicas, como algas marinas comestibles y algas pardas, se describen en detalle en la Solicitud de Patente de EE.UU. número de serie 12/449,712, presentada el 25 de febrero de 2010. En ciertos casos, las composiciones de NASP incluyen fucoidanos. Como se usa en el presente documento, el término "fucoidano" se refiere a un grupo diverso de polisacáridos sulfatados complejos de origen natural que se extraen de ciertas algas comestibles, algas pardas y equinodermos (por ejemplo, erizos de mar, pepinos de mar). En algunas formas de realización, los fucoidanos son NASP que se extraen de organismos del género *Fucus*, *Laminaria*, *Cladosiphon*, *Namacystus*, *Undaria*, *Chordaria*, *Sargassum*, *Leathesia*, *Desmarestia*, *Dictyosiphon*, *Dictyota*, *Padina*, *Spatoglossum*, *Adenocystis*, *Pylayella*, *Ascophyllum*, *Bifurcaria*, *Himanthalia*, *Hizikia*, *Pelvetia*, *Alaria*, *Arthrothamnus*, *Chorda*, *Ecklonia*, *Eisenia*, *Macrocystis*, *Nereocystis*, *Petalonia*, *Scytosiphon*, y *Saundersella*, entre otros. En ciertas realizaciones, los fucoidanos son fucoidanos *Laminaria japonica* (L.j.); fucoidanos *Fucus vesiculosus* (F.v.), fucoidanos *Undaria pinnatifida* (U.p.) y fucoidanos *Ecklonia maxima* (E.m.).

[0019] Según la fuente de la composición de NASP, las composiciones de NASP pueden incluir uno o más NASP. Por ejemplo, las composiciones de NASP pueden incluir dos o más NASP, como tres o más NASP e incluir cuatro o más NASP. Como tal, cuando las composiciones de NASP incluyen más de un NASP, los métodos pueden incluir la separación y purificación de los NASP antes de evaluar una o más composiciones de NASP. Los NASP pueden separarse utilizando cualquier protocolo conveniente, tal como mediante extracción a base de ácido, cromatografía iónica, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión de gel, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de exclusión de tamaño y similares.

[0020] Como se describe anteriormente, la invención se relaciona con la evaluación de una o más composiciones de NASP mediante la determinación de la actividad de coagulación y la composición química de la composición de NASP y la estructura molecular de la NASP. Cada paso puede realizarse en cualquier momento durante los métodos de la invención. Como tal, la actividad de coagulación, la composición química y la estructura molecular de la NASP se pueden determinar de manera simultánea o secuencial. Por ejemplo, la Figura 1a muestra un diagrama de flujo que ilustra los pasos para evaluar una o más composiciones de NASP. Como se muestra en la Figura 1a, los métodos pueden incluir primero, evaluar la actividad de coagulación de la composición de NASP, y luego determinar la composición química de la composición de NASP y la estructura molecular de NASP. Alternativamente, como se muestra en la Figura 1b, primero se puede determinar la composición química de la composición de NASP y la estructura molecular de NASP, y luego se evalúa la actividad de coagulación. En otros casos, la actividad de coagulación, la composición química y la estructura molecular de la NASP se determinan simultáneamente. Además, una o más composiciones de NASP pueden evaluarse en un momento dado. Como tal, en ciertos casos, más de una composición de NASP puede evaluarse simultáneamente, como dos o más composiciones de NASP, como tres o más composiciones de NASP, como cuatro o más composiciones de NASP, incluidas cinco o más composiciones de NASP simultáneamente.

[0021] En la evaluación de una composición de NASP, los métodos incluyen determinar la actividad de coagulación de la composición. Por "actividad de coagulación" se entiende cualquier efecto biológico que una composición de NASP pueda tener sobre el proceso de coagulación, incluida la anticoagulación y la procoagulación. Cualquier medio de muestra para estudiar la formación de coágulos puede emplearse para evaluar la actividad de coagulación y puede

incluir, entre otros, sangre total, plasma sanguíneo normal, plasma sanguíneo deficiente en el factor de coagulación, plasma sanguíneo inhibido del factor de coagulación, plasma sanguíneo deficiente en el factor de coagulación congénita y plasmas producidos sintéticamente, entre otros. En algunas realizaciones, la actividad de coagulación se evalúa en plasma normal. En otras realizaciones, la actividad de coagulación se evalúa en plasmas inhibidos por el factor de coagulación. Por "plasmas inhibidos por el factor de coagulación" se entiende uno o más factores de coagulación (por ejemplo, Factor VIII, Factor IX o Factor XI) que se eliminan funcionalmente del plasma, como por ejemplo un inhibidor, que proporciona actividad neutralizante del factor de coagulación. En otras realizaciones más, la actividad de coagulación se evalúa en plasmas deficientes en el factor de coagulación. Por "plasmas deficientes en el factor de coagulación" se entiende uno o más factores de coagulación que se eliminan del plasma, como la inmunoadaptación por afinidad selectiva o muestras de plasma de pacientes con deficiencias congénitas del factor de coagulación. Por ejemplo, la actividad de coagulación puede evaluarse en plasmas en los que el Factor VIII (FVIII), el Factor IX (FIX) o el Factor XI (FXI) se han eliminado del plasma (es decir, el plasma está ausente de FVIII, FIX o FXI). Alternativamente, la actividad de coagulación puede evaluarse en plasmas inhibidos por FVIII, inhibidos por FIX o inhibidos por FXI mediados por anticuerpos.

[0022] La determinación de la actividad de coagulación incluye la evaluación de la actividad procoagulante de la composición de NASP. El término "actividad procoagulante", como se usa en el presente documento, se refiere al efecto positivo que tiene la composición NASP para acelerar el inicio de la coagulación, así como para aumentar la velocidad de coagulación global, en comparación con un control adecuado (determinado mediante ensayos de coagulación sanguínea, p.ej., CAT, dPT, que se describen detalladamente a continuación). En otras palabras, la actividad procoagulante es el efecto que tiene la composición de NASP en la reducción de la cantidad de tiempo para que comience la coagulación o en la reducción de la cantidad total de tiempo para que se complete la coagulación.

[0023] La evaluación de la actividad procoagulante de la composición de NASP puede incluir, en ciertos casos, medir el aumento en la tasa global de coagulación por la composición de NASP. Por ejemplo, la composición de NASP puede aumentar la tasa global de coagulación en un 1% o más en comparación con un control adecuado, como un 5% o más, como un 10% o más, como un 15% o más, como 20% o más, como 30% o más, como 40% o más, como 50% o más, como 75% o más, como 90% o más, como 95% o más e incluyendo 99% o más en comparación con un control adecuado. En algunos casos, la tasa global de coagulación que puede incrementarse con la composición de NASP varía de 0,5% a 99% en comparación con un control adecuado, como 5% a 90%, tal como 10% a 75% e incluyendo 15% a 50% en comparación con un control adecuado. La evaluación de la actividad procoagulante de la composición de NASP también puede incluir medir la aceleración en el inicio de la coagulación mediante la composición de NASP. Por ejemplo, la cantidad de tiempo requerido para que comience la coagulación puede reducirse por la composición de NASP en un 5% o más en comparación con un control adecuado, tal como en un 10% o más, como en un 25% o más, tal como en un 50% o más, tal como en un 75% o más, tal como en un 90% o más e incluyendo en un 95% o más en comparación con un control adecuado. En algunos casos, la cantidad de tiempo requerido para comenzar la coagulación que puede reducirse por la composición de la NASP varía de 0,5% a 99% en comparación con un control adecuado, como 5% a 90%, tal como 10% a 75% y incluyendo 15% a 50% en comparación con un control adecuado. El aumento en la tasa global de coagulación y la aceleración en el inicio de la coagulación se pueden medir mediante cualquier protocolo conveniente, como, por ejemplo, ensayos de coagulación de la sangre, trombografía automatizada calibrada (TAC), ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada, o ensayo de tromboelastometría o tromboelastografía (ROTEM), entre otros protocolos de coagulación.

[0024] La evaluación de la actividad procoagulante de la composición de NASP también puede incluir la evaluación del efecto de la composición sobre la generación de trombina. La trombina se produce en la cascada de coagulación de la sangre por la escisión enzimática de dos sitios en la protrombina por el Factor X activado (Xa). La trombina actúa para convertir el factor XI en XIa, VIII en VIIIa, V en Va y el fibrinógeno en fibrina. Dado que la producción de trombina depende de la actividad de los factores tisulares en la cascada de coagulación sanguínea, la generación de trombina en plasma inhibido por el factor de coagulación o deficiente en el factor de coagulación se reduce significativamente en comparación con los niveles normales. Cuando se agrega una composición de NASP a los plasmas inhibidores del factor de coagulación o deficientes en el factor de coagulación, la generación de trombina aumenta en función de la concentración de la NASP.

[0025] Como tales, los métodos de acuerdo con ciertas realizaciones, incluyen medir la cantidad de generación de trombina que es restaurada por la composición de NASP en plasmas inhibidores del factor de coagulación o deficientes en el factor de coagulación. Por ejemplo, las composiciones de NASP pueden restaurar la cantidad de generación de trombina a 5% o más de los niveles normales, como 10% o más, como 25% o más, como 50% o más, como 75% o más, como 90% o más, como 95% o más, incluida la restauración de la cantidad de generación de trombina en plasma inhibido por el factor de coagulación o plasma deficiente en factor de coagulación a 100% de los niveles normales. En algunos casos, la cantidad de generación de trombina que es restaurada por la composición de NASP en plasmas inhibidos por el factor de coagulación o deficientes en el factor de coagulación varía de 0,5% a 100%, tal como 5% a 90%, tal como 10% a 75% y incluyendo 15% a 50%. En otros casos, las composiciones de NASP pueden aumentar la generación de trombina en plasmas inhibidos por el factor de coagulación o deficientes en el factor de coagulación más allá de los niveles normales, como por ejemplo, en un 5% o más, como un 10% más, como un 25% o más, tal como como 50% o más, como 75% o más, incluyendo 100% o más, como 1,5 veces los niveles normales, como 2 veces los niveles normales, como 3 veces los niveles normales, incluyendo 5 veces los niveles normales. En

ciertos casos, evaluar el efecto de la composición en la generación de trombina incluye medir la concentración de la NASP requerida para restablecer la coagulación en el plasma inhibido por FVIII a niveles normales. Por ejemplo, la concentración de la NASP requerida para restablecer la coagulación a niveles normales en el plasma inhibido por FVIII puede variar de 0,1 a 10 µg/ml, tal como de 0,5 a 5 µg/ml, como de 0,75 a 2,5 µg/ml y que incluye de 0,8 a 2 µg/mL.

[0026] Los métodos también incluyen evaluar el efecto de la composición de NASP sobre la generación de trombina midiendo la concentración de la NASP en la generación máxima de trombina. Por ejemplo, la concentración de la NASP en la generación máxima de trombina puede ser de 10 µg/ml o menos, como 8 µg/ml o menos, como 7,5 µg/ml o menos, como 5 µg/ml o menos, como 2,5 µg/ml o menos, como 1 µg/ml e incluyendo 0,8 µg/ml o menos. Del mismo modo, la concentración efectiva media máxima (CE₅₀) de la NASP también se mide para evaluar el efecto de la composición de la NASP en la generación de trombina. El término "concentración efectiva máxima media" se usa en este documento en su sentido convencional para referirse a la concentración de la NASP que induce la generación de trombina a medio camino entre la línea base y su valor máximo. Como tal, el valor de CE₅₀ para la actividad procoagulante refleja la potencia relativa de la composición de NASP en la generación de trombina, donde la CE₅₀ representa la concentración óptima de NASP en experimentos de generación de trombina. El valor de CE₅₀ para la actividad procoagulante de la composición de NASP es de 0,3 µg/ml o menos, como 0,2 µg/ml o menos e incluye 0,1 µg/ml o menos.

[0027] La evaluación de la actividad procoagulante de la composición también incluye determinar la ventana procoagulante de la composición. Por "ventana procoagulante" se entiende el rango en las concentraciones de la NASP que exhiben actividad procoagulante (es decir, un aumento en la tasa general o la aceleración en el inicio de la coagulación). En otras palabras, la ventana procoagulante es el rango de concentraciones de NASP que puede mostrar una respuesta terapéutica positiva en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre. La ventana procoagulante es el rango que se encuentra entre una cantidad no efectiva y una cantidad que resulta en actividad anticoagulante. En otras palabras, debajo de la concentración más baja de la ventana procoagulante, la NASP no tiene efecto sobre la coagulación y, por encima de la concentración más alta de la ventana procoagulante, se observa actividad anticoagulante. Por ejemplo, una concentración de NASP que cae dentro de la ventana procoagulante puede aumentar la tasa de coagulación en un 5% o más, como un 10% o más, como un 25% o más, como un 50% o más, como un 75% o más, como un 90% o más, incluido un 99% o más y en ciertos casos, aumentando la velocidad de formación de coágulos sanguíneos en 1,5 veces o más, como 2 veces o más, como 5 veces o más, como 10 veces o más, como 50 veces o más, incluido el aumento de la tasa de formación de coágulos de sangre en 100 veces o más. En algunos casos, la concentración de NASP que cae dentro de la ventana procoagulante puede aumentar la tasa de coagulación en un rango del 1% al 99%, como del 5% al 90% e incluyendo del 10% al 75% y en ciertos casos, aumentando la tasa de formación de coágulos sanguíneos en un rango de 1,5 a 1000 veces, tal como 5 veces a 500 veces, como 10 veces a 250 veces e incluyendo 20 veces a 100 veces. La ventana procoagulante determinada de una composición de NASP varía de 0,1 a 100 µg/ml.

[0028] Los métodos también pueden incluir evaluar la actividad procoagulante de la composición de NASP midiendo la actividad neutralizante del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). TFPI es un polipéptido de cadena única que puede inhibir reversiblemente FXa y trombina (factor IIa) durante la cascada de coagulación. Mientras que FXa está inhibido, el complejo Xa-TFPI puede inhibir el complejo del factor tisular FVII, lo que resulta en una reducción de la coagulación por debajo de los niveles normales. Como tal, por "actividad neutralizadora de TFPI" se entiende que la inhibición por TFPI se reduce por la composición de NASP. En ciertos casos, los métodos incluyen determinar si la composición de NASP exhibe actividad neutralizadora de TFPI. Cuando la composición de NASP muestra actividad de neutralización de TFPI, los métodos también pueden incluir medir la reducción de la actividad de TFPI como resultado de la composición de NASP. Por ejemplo, la composición de NASP puede reducir la activación de TFPI en 1% o más, como 5% o más, como 10% o más, como 15% o más, como 20% o más, como 30% o más, como 40% o más, como 50% o más, como 75% o más, como 90% o más, como 95% o más, incluida la reducción de la inhibición por TFPI en 99% o más, según lo determinado por ensayos de coagulación sanguínea. En algunos casos, la reducción de la activación de TFPI por la composición NASP puede variar del 1% al 99%, tal como del 5% al 90%, como del 10% al 75% e incluso del 15% al 50%. La actividad neutralizadora de TFPI de la composición de NASP puede medirse usando cualquier protocolo conveniente, tal como mediante un ensayo de tiempo de protrombina diluida o una trombografía automatizada calibrada. La actividad neutralizadora de TFPI se puede ensayar en plasma normal con TFPI de longitud completa agregada o en plasmas agotados de TFPI con TFPI de longitud completa agregada o con TFPI truncado C-terminal. La concentración efectiva máxima media determinada para la actividad neutralizadora de TFPI de la NASP puede ser en algunas realizaciones, 5,0 µg/ml o menos, tal como 3,0 µg/ml o menos, tal como 2,0 µg/ml o menos, tal como 1,5 µg/ml o menos, como 1,0 µg/ml o menos, como 0,9 µg/ml o menos, como 0,8 µg/ml o menos, como 0,7 µg/ml o menos, tal como 0,6 µg/ml o menos, tal como como 0,5 µg/ml o menos e incluyendo 0,4 µg/ml o menos. En algunos casos, la concentración efectiva máxima media para la actividad neutralizadora de TFPI de la NASP varía de 0,01 µg/ml a 10 mg/ml, como 0,05 µg/ml a 7 mg/ml, como 0,1 µg/ml a 5 µg/ml e incluyendo 0,5 µg/ml a 2,5 mg/mL.

[0029] En ciertos casos, la medición de la actividad neutralizante del inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) incluye además la confirmación del mecanismo de la actividad neutralizadora de TFPI por la NASP utilizando experimentos de unión de resonancia de plasmón de superficie. Por ejemplo, el mecanismo de confirmación de la actividad neutralizadora de TFPI puede incluir determinar que el NASP se enlaza con el TFPI de longitud completa. En otros

casos, confirmar el mecanismo de la actividad neutralizadora de TFPI puede incluir determinar que el NASP se une a la región C-terminal de TFPI.

5 **[0030]** La evaluación de la actividad procoagulante de la composición de NASP también puede incluir determinar si la
 composición activa la vía de contacto (es decir, la vía de coagulación intrínseca). La vía de contacto comienza con la
 formación del complejo primario en el colágeno por el cininógeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína y FXII
 (factor de Hageman). Precalicroeína se convierte a calicreína y FXII se convierte en FXIIa. FXIIa convierte FXI en FXIa.
 Factor XIa activa FIX, que con su cofactor FVIIIa forma el complejo de tenasa, que activa FX a FXa. Dado que la vía
 10 de contacto está asociada con la inflamación, las composiciones de NASP que activan la vía de contacto serían menos
 adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea. La determinación de si la
 composición NASP activa la vía de contacto puede ensayarse utilizando cualquier protocolo conveniente. Por ejemplo,
 las composiciones de NASP pueden ensayarse para la activación de la vía de contacto usando plasma normal en
 presencia y ausencia de inhibidor de tripsina de maíz (CTI). CTI inhibe FXIIa y, por lo tanto, bloquea la vía de contacto.
 Como tal, si la composición de NASP exhibe mayor formación de trombina en ausencia de CTI que en presencia de
 15 CTI, la composición de NASP activa la vía de contacto. Cuando la composición de NASP activa la ruta de contacto,
 los métodos también pueden incluir medir la concentración de la NASP en la que se activa la ruta de contacto. Por
 ejemplo, se puede determinar que la concentración de la NASP que activa la vía de contacto es de 5 µg/ml o más,
 como 6 µg/ml o más, como 7 µg/ml o más, como 8 µg/ml o mayor, como 10 µg/ml o más, como 15 µg/ml o más, como
 20 µg/ml o más, como 25 µg/ml o más e incluyendo 35 µg/ml o más. En algunos casos, la concentración de la NASP
 que activa la vía de contacto puede variar de 3 µg/ml a 100 mg/ml, como 5 µg/ml a 90 mg/ml, como 7,5 µg/ml a 75
 20 µg/ml e incluyendo 10 µg/ml a 50 mg/ml. En otras realizaciones, los métodos incluyen comparar la concentración de
 la NASP que activa la ruta de contacto con la concentración efectiva máxima media (EC₅₀) para la procoagulación
 por la NASP. Por ejemplo, la concentración de la NASP que activa la vía de contacto puede ser 10 veces mayor o más
 que el valor CE₅₀ para la actividad procoagulante de la NASP, como 15 veces o más, como 20 veces o más, como 25
 25 veces o mayor e incluido 30 veces o mayor que el CE₅₀ del NASP. En algunos casos, la concentración de la NASP
 que activa la vía de contacto varía de 5 a 50 veces más que el valor de CE₅₀ para la actividad procoagulante de la
 NASP, como 5 a 40 veces, como 7 veces para 35 veces e incluso 10 veces a 25 veces más que el valor de CE₅₀ para
 la actividad procoagulante de la NASP.

30 **[0031]** Como se describió anteriormente, los métodos incluyen determinar la actividad de coagulación de la
 composición. En algunas realizaciones, la determinación de la actividad de coagulación también incluye evaluar la
 actividad anticoagulante de la composición de NASP. El término "actividad anticoagulante", como se usa en el presente
 documento, se refiere al efecto que tiene la composición de NASP para retrasar el inicio de la coagulación, así como
 para disminuir la tasa de coagulación general, en comparación con un control adecuado (determinado por ensayos de
 35 coagulación de la sangre, por ejemplo, aPTT, CAT). En otras palabras, la actividad anticoagulante es el efecto que
 tiene la composición de NASP para aumentar la cantidad de tiempo para que comience la coagulación o para aumentar
 la cantidad total de tiempo para que se complete la coagulación.

40 **[0032]** La evaluación de la actividad anticoagulante de la composición de NASP puede incluir, en ciertos casos, medir
 la disminución de la tasa global de coagulación por la composición de NASP. Por ejemplo, la composición de NASP
 puede disminuir la tasa global de coagulación en un 1% o más en comparación con un control adecuado, como un 5%
 o más, como un 10% o más, como un 15% o más, como 20% o más, como 30% o más, como 40% o más, como 50%
 o más, como 75% o más, como 90% o más, como 95% o más e incluyendo 99% o más en comparación con un control
 45 adecuado. En algunos casos, la tasa global de coagulación que puede disminuir la composición de la NASP varía
 entre el 1% y el 99% en comparación con un control adecuado, como el 5% al 90%, como entre el 7,5% y el 75% e
 incluye el 10%. Al 50% en comparación con un control adecuado. La evaluación de la actividad anticoagulante de la
 composición de NASP también puede incluir la medición del retraso en el inicio de la coagulación por la composición
 de NASP. Por ejemplo, la cantidad de tiempo requerido para que comience la coagulación puede aumentar en un 5%
 o más en comparación con un control adecuado, tal como en un 10% o más, tal como en un 25% o más, tal como en
 50 un 50% o más, tal como en un 75% o más, tal como en un 90% o más e incluyendo en un 95% o más en comparación
 con un control adecuado. En algunos casos, la cantidad de tiempo requerido para que comience la coagulación puede
 incrementarse en un rango de NASP de 1% a 99%, tal como 5% a 90%, tal como 7,5% a 75% e incluyendo 10% a
 55 50% como en comparación con un control adecuado. La disminución en la tasa global de coagulación y el retraso en
 el inicio de la coagulación por la composición de NASP puede determinarse utilizando cualquier protocolo conveniente,
 tal como, por ejemplo, mediante un ensayo de tiempo de trombolastina parcial activada.

[0033] En ciertas realizaciones, evaluar la actividad anticoagulante incluye medir el tiempo de coagulación en función
 de la concentración de NASP. En particular, medir el tiempo de coagulación en función de la concentración de NASP
 puede incluir determinar la concentración de la NASP a la que se produce un aumento del 50% en el tiempo de
 60 coagulación en comparación con el plasma normal. En otras palabras, los métodos incluyen medir la cantidad de
 NASP requerida para reducir la tasa general de coagulación en un 50% en comparación con los niveles normales. Por
 ejemplo, la concentración de NASP a la que se produce un aumento del 50% en el tiempo de coagulación puede ser
 de 2 µg/ml o más, como 3 µg/ml o más, como 4 µg/ml o más, como 5 µg/ml o mayor, como 6 µg/ml o más, como 7
 µg/ml o más, como 8 µg/ml o más e incluyendo 10 µg/ml o más. En algunos casos, la concentración de NASP a la que
 65 se produce un aumento del 50% en el tiempo de coagulación varía de 0,01 µg/ml a 25 µg/ml, como 0,05 µg/ml a 20
 mg/mL, como 0,1 µg/ml a 15 µg/ml e incluyendo 1 µg/ml a 10 mg/ml.

5 [0034] En la evaluación de la actividad de coagulación de la composición de NASP, los métodos también incluyen la comparación de la actividad procoagulante con la actividad anticoagulante. Por ejemplo, los métodos pueden incluir el cálculo de la proporción de la concentración de NASP a la que se produce un aumento del 50% en el tiempo de coagulación con respecto a la concentración máxima efectiva media para la procoagulación. En estos casos, el valor de la relación es 10 o mayor, como 15 o más, como 25 o más, como 35 o más e incluyendo 50 o más. Un valor alto de relación (por ejemplo, 20 o más) indica que la composición de NASP tiene una actividad procoagulante significativa y poca actividad anticoagulante. Un valor de relación baja (por ejemplo, 10 o inferior) indica que la composición NASP tiene una actividad procoagulante débil y una actividad anticoagulante significativa.

10 [0035] En la evaluación de una composición de NASP, los métodos también incluyen la evaluación de la estructura molecular de la NASP. En algunas realizaciones, determinar la estructura molecular de la NASP incluye determinar el peso molecular promedio de la NASP. En ciertos casos, el peso molecular promedio de la NASP es de 15 kDa o más, como 20 kDa o más, como 25 kDa o más, e incluye 35 kDa o más. En otros casos, el peso molecular promedio de la NASP es de 41 kDa o menos, como 40 kDa o menos, como 30 kDa o menos, como 20 kDa o menos e incluyendo 15 kDa.

15 [0036] Ya que las composiciones de NASP que se evalúan pueden contener NASP que tienen un amplio intervalo de tamaños y pesos moleculares, los métodos de la invención también pueden incluir determinar la polidispersidad de la composición de NASP. Por ejemplo, la polidispersidad de la composición de NASP puede ser 1,1 o mayor, como 1,25 o mayor, como 1,3 o mayor, como 1,5 o mayor, como 1,8 o mayor e incluso 2,0 y mayor. En algunos casos, la polidispersidad de la composición de NASP varía de 1,1 a 2, como 1,2, como 1,3 e incluso 1,5. El peso molecular y la polidispersidad se pueden determinar utilizando cualquier protocolo conveniente, como, por ejemplo, cromatografía de permeación de gel o cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC), electroforesis capilar, PAGE (electroforesis en gel de poli(acrilamida)), electroforesis en gel de agarosa, entre otros. En ciertas realizaciones, el peso molecular de la NASP se determina mediante cromatografía de exclusión de tamaño - dispersión de luz en múltiples ángulos (SEC-MALLS).

20 [0037] La evaluación de la estructura molecular de la composición de NASP incluye la determinación del contenido de sacárido de la NASP. El contenido de sacáridos incluye residuos de fucosa y puede incluir residuos de xilosa, residuos de galactosa, residuos de glucosa, residuos de manosa, residuos de ramnosa, residuos de arabinosa y ácido urónico. Dado que el contenido de sacáridos de las NASP varía, los métodos de acuerdo con ciertas realizaciones también incluyen la determinación de la heterogeneidad del contenido de sacáridos. Al determinar la heterogeneidad del contenido de sacárido, primero se determina la cantidad de cada residuo de sacárido y luego se calcula el porcentaje que cada sacárido contribuye al contenido total de sacárido. Por ejemplo, se puede determinar que el contenido de fucosa es del 75% o más, como el 80% o más, como el 85% o más y que incluye el 90% o más. En algunos casos, se puede determinar que el contenido de fucosa es un porcentaje que oscila entre el 60% y el 90%. En otros casos, se puede determinar que el contenido de galactosa es del 10% o más, como el 15% o más, como el 25% o más, como el 30% o más, e incluso la determinación de que el contenido de galactosa es del 35% o más. En algunos casos, se puede determinar que el contenido de galactosa es un porcentaje que varía de 1% a 30%, tal como 2% a 25%, como 3% a 20% e incluyendo 5% a 15%. En otros casos, se puede determinar que el contenido de glucosa es del 10% o menos, como el 5% o menos, como el 4% o menos, como el 3% o menos, como el 2% o menos e incluso la determinación de que el contenido de glucosa es del 1% o menos. En algunos casos, se puede determinar que el contenido de glucosa es un porcentaje que varía de 0,1% a 10%, tal como 0,5% a 8% e incluyendo 1% a 5%. Se puede determinar que el contenido de alginato es del 10% o menos, tal como el 5% o menos, como el 4% o menos, como el 3% o menos, como el 2% o menos e incluso determinar si el contenido de alginato es del 1% o menos. En algunos casos, se puede determinar que el contenido de alginato es un porcentaje que varía de 0,1% a 10%, tal como 0,5% a 8% e incluyendo 1% a 5%. El contenido de sacáridos y la heterogeneidad pueden determinarse utilizando cualquier protocolo conveniente, como por ejemplo hidrolizando la NASP en sus monosacáridos correspondientes y analizando la composición de los monosacáridos mediante espectrometría de masas, plasma acoplado inductivamente, cromatografía de iones, cromatografía de gases, absorción atómica, horno de grafito. espectrometría de absorción atómica, espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente, espectrometría de absorción atómica de llama, o algún otro protocolo conveniente.

30 [0038] La evaluación de la estructura molecular de la NASP también puede incluir la determinación del contenido de fucosa y alginato mediante espectroscopia ^{13}C -RMN (Resonancia Magnética Nuclear). La espectroscopia de RMN puede ser una técnica poderosa para dilucidar la estructura y las características cuantitativas de los carbohidratos complejos. Por lo tanto. En ciertas realizaciones, la ^{13}C -RMN cuantitativa puede emplearse para caracterizar la fucosa y alinear el contenido de la NASP. Para determinar las condiciones cuantitativas para el contenido de fucosa y alginato por ^{13}C -RMN, las áreas de los picos relativos pueden evaluarse utilizando diversos retrasos de relajación. En particular, los picos anomeros de sacárido a δ 88-112 ppm, los carbonos del anillo de azúcar a δ 55-88 ppm, el pico de carbonilo del alginato a δ 170-185 ppm y el pico de metilo de la fucosa a δ 9-20 ppm integrado. Dado que el alginato contiene un resto carbonilo y cada sacárido contiene un carbono anomérico por residuo, el contenido de alginato (% mol de alginato/mol NASP) se puede calcular mediante la ecuación:

$$C\%_{\text{alginato}} = (\int \text{carbonilos} / \int \text{anoméricos}) \times 100\%, \quad (1)$$

5 donde $\int \text{carbonilos}$ es la integral de los grupos carbonilo y $\int \text{anoméricos}$ es la integral de los carbonos anoméricos.

[0039] Asimismo, el contenido de fucosa (% mol fucosa/mol NASP) se calcula utilizando el grupo metilo de fucosa mediante la ecuación:

$$10 \quad C\%_{\text{fucosa}} = (\int \text{metilos} / (\int \text{anoméricos} - \int \text{carbonilos})) \times 100\%, \quad (2)$$

15 en donde $\int \text{metilos}$ es la integral de grupos metilo en fucosa. Cuando se ha determinado que la muestra de NASP contiene solo una pequeña cantidad de alginato (por ejemplo, menos del 10%), el contenido de fucosa se puede calcular utilizando la ecuación:

$$20 \quad C\%_{\text{fucosa}} = (\int \text{metilos} / \int \text{anoméricos}) \times 100\%. \quad (3)$$

25 **[0040]** Según se desee, el contenido de fucosa determinado por ^{13}C -RMN cuantitativa puede compararse posteriormente con el contenido de fucosa según se determina mediante hidrólisis de la NASP como se describe anteriormente. Dado que el método de hidrólisis determina el contenido de monosacáridos individuales y ^{13}C -RMN determina el contenido de sacáridos en una NASP intacta, los valores determinados por los métodos respectivos pueden diferir ligeramente. Sin embargo, la diferencia en el contenido de sacáridos determinada por el método de hidrólisis y por ^{13}C -RMN no diferirá en más del 10%, como 8% o menos, como 7% o menos, como 6% o menos, como 5% o menos, tal como en un 4% o menos, tal como un 3% o menos, tal como en un 2% o menos, tal como un 1% o menos e inclusive en un 0,1% o menos. Por ejemplo, la diferencia en el contenido de sacáridos determinada por el método de hidrólisis a partir del contenido de sacáridos determinada por ^{13}C -RMN puede variar de 0,001% a 10%, tal como 0,005% a 9%, tal como 0,01% a 8% e incluyendo 0,1% a 5%.

35 **[0041]** Además de determinar el contenido de fucosa y alginato, se puede emplear ^{13}C -RMN para determinar cualitativamente la heterogeneidad del contenido de sacárido. La heterogeneidad del contenido de sacárido puede determinarse observando el grado de complejidad de las regiones anoméras y de carbono de azúcar de los espectros de ^{13}C -RMN. Sobre la base de la complejidad de las regiones anoméricas y de carbono del azúcar en los espectros de ^{13}C -RMN, se puede hacer una evaluación cualitativa de la heterogeneidad del contenido de sacáridos sobre la composición de la NASP. Por ejemplo, si se observa un espectro de ^{13}C -RMN altamente complejo en las regiones anoméricas y de carbono de azúcar, se puede determinar que la composición de NASP tiene una alta heterogeneidad. 40 En contraste, si el espectro de ^{13}C -RMN tiene poca complejidad en las regiones anoméricas y de carbono, se puede determinar que la composición de NASP tiene una heterogeneidad baja. Posteriormente, la heterogeneidad observada por el espectro de ^{13}C -RMN puede confirmarse cuantitativamente según se desee, tal como por hidrólisis de la composición de la NASP y analizarse mediante cromatografía iónica, espectrometría de masas, plasma acoplado inductivamente, cromatografía de gases, absorción atómica, absorción atómica de grafito del horno espectrometría, 45 espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo, espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo, espectrometría de absorción atómica de llama o algún otro protocolo conveniente, como se describe anteriormente.

50 **[0042]** En algunas realizaciones, la evaluación de la estructura molecular de una NASP incluye la determinación del grado de polimerización de la NASP. El término "grado de polimerización" se usa en su sentido convencional para referirse a la longitud del esqueleto de polisacárido de la NASP. En otras palabras, el grado de polimerización es el número de unidades de monosacáridos posicionadas a lo largo del esqueleto de polisacárido de la NASP. Por ejemplo, los métodos pueden incluir determinar que el NASP tiene un grado de polimerización que varía de 25 a 5000, como 50 a 2500, como 75 a 1500, como 100 a 1000 e inclusive de 125 a 500. En ciertas realizaciones, se puede determinar 55 que la NASP tiene un grado de polimerización que varía de 70 a 200, En algunos casos, los métodos incluyen determinar que la NASP tiene un grado de polimerización que es 20 o mayor, como 30 o mayor, como 50 o mayor, como 100 o más, como 125 o más e incluso 150 o más. En ciertos casos, los métodos incluyen determinar que la NASP tiene un grado de polimerización de 70 o más. El grado de polimerización se puede determinar utilizando cualquier protocolo conveniente, tal como, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño o fraccionamiento por tamaño usando ultrafiltración con una pluralidad de membranas de filtro de corte. Alternativamente, el grado de polimerización se puede determinar hidrolizando la NASP en sus monosacáridos correspondientes y analizando la composición de monosacáridos mediante espectrometría de masas, plasma acoplado inductivamente, cromatografía de iones, cromatografía de gases, absorción atómica, espectrometría de absorción atómica de horno de grafito, espectrometría de absorción atómica, plasma acoplado inductivamente 60 Espectrometría de masas, espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo, espectrometría de absorción atómica por llama o algún otro protocolo conveniente.

65

[0043] En ciertas realizaciones, la evaluación de la estructura molecular de la NASP incluye la determinación de la configuración del enlace glicosídico de la NASP. Por ejemplo, determinar la configuración del enlace glicosídico puede incluir determinar si la NASP es un polisacárido lineal, un polisacárido ramificado, o tanto lineal como ramificado. Por "polisacárido lineal" se entiende un polisacárido o parte de un polisacárido que contiene solo enlaces α -1,4 glicosídicos, enlaces α -1,2 glicosídicos o enlaces α -1,3 glicosídicos, o enlaces alternos α -1,2/ α -1,3/ α -1,4 glicosídicos. Por "polisacárido ramificado" se entiende un polisacárido o parte de un polisacárido que contiene dos o más enlaces glicosídicos a otros residuos de sacáridos, donde uno de los enlaces glicosídicos es un enlace α -1,4-glicosídico, enlaces glicosídicos α -1,2 o enlaces α -1,3 glicosídicos, o enlaces alternos α -1,2/ α -1,3/ α -1,4 glicosídicos, y el otro es un enlace α -1,6 glicosídico. Cuando la NASP es lineal y ramificada, los métodos pueden incluir además determinar el porcentaje relativo de porciones lineales del polisacárido a porciones ramificadas del polisacárido. Por ejemplo, el NASP puede ser un 10% lineal o más, tal como un 25% lineal o más, tal como un 50% lineal o más, tal como un 75% lineal o más e incluir un 90% lineal o más. Del mismo modo, la NASP puede ser 10% ramificada o más, tal como 25% ramificada o más, como 50% ramificada o más, tal como 75% ramificada o más e incluyendo 90% ramificada o más. En algunos casos, el porcentaje de la NASP que es lineal o ramificada varía de 1% a 90%, como 5% a 75% e incluye de 10% a 50%. La relación de residuos de sacáridos lineales a residuos de sacáridos ramificados en las NASP de interés puede ser 3 o menos, como 2,5 o menos, como 2 o menos, como 1,5 o menos, como 1,4 o menos, como 1,3 o menos, tales como 1,2 o menos e incluyendo 1 o menos. En algunos casos, la proporción de residuos de sacáridos lineales a residuos de ramificación varía de 0,5 a 3, como 1 a 2,5, como una proporción de 1,4. En otras palabras, en las NASP de interés, uno de cada 3 residuos de sacáridos tiene un resto de sacárido ramificado, como uno de cada 2,5 residuos de sacáridos o menos, como uno de cada 2 residuos de sacáridos, como uno de cada 1,5 residuos de sacáridos e incluyendo uno de cada 1,4 residuos de sacáridos tienen un residuo de sacárido ramificado adherido a él.

[0044] Se puede emplear cualquier protocolo conveniente para determinar la configuración del enlace glicosídico de la NASP y puede incluir, entre otros, espectroscopía de RMN, espectroscopía de RMN de 2-D (p.ej., Espectroscopia de correlación de protones (COSY), multiplicidad sensible de la fase protón-carbono editó correlación cuántica única heteronuclear (HSQC) y correlación de enlaces múltiples heteronucleares proton-carbono (HMBC)), espectroscopia de RMN 3-D (p.ej., HSQC-TOCSY), espectrometría de masas en tándem, espectroscopía de ionización por electrospray espectrometría de masas capilar, electroforesis capilar, espectroscopia IR, o cualquier combinación de los mismos.

[0045] En la evaluación de la estructura molecular de una NASP, los métodos también pueden incluir la determinación de la densidad de carga aniónica de la NASP. El término "densidad de carga aniónica" se utiliza en su sentido convencional para referirse a la medida de la carga negativa formal por residuo de sacárido de la NASP. En otras palabras, la densidad de carga aniónica es la carga negativa promedio por residuo de sacárido en la NASP. Por ejemplo, la densidad de carga aniónica de la NASP puede ser 0,1 o mayor, como 0,2 o más, como 0,3 o más, como 0,5 o más, como 0,6 o más e incluso 0,75 o más. En estas realizaciones, 10% o más de los residuos de sacáridos de la NASP pueden ser aniónicos, como 20% o más, como 30% o más, como 50% o más, como 60% o más e incluyendo 75% o El mayor de los residuos de sacáridos de la NASP puede ser aniónico. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen determinar que la densidad de carga aniónica de la NASP varía de 0,1 a 0,6, como 0,2 a 0,6, como 0,3 a 0,6, incluyendo 0,5 a 0,6, como 0,55. En algunas realizaciones, la densidad de carga aniónica es equivalente al grado de sulfatación, como se describe con mayor detalle a continuación.

[0046] En la evaluación de la estructura molecular de la NASP, los métodos también incluyen la determinación del contenido de azufre de la NASP, que incluye la determinación del porcentaje en peso de azufre en la NASP. Por ejemplo, se puede determinar que la NASP tiene un 10% o más de azufre en peso, como un 15% o más de azufre en peso, como un 20% o más de azufre en peso, incluido un 25% o más de azufre en peso. Se puede emplear cualquier protocolo conveniente para determinar el porcentaje en peso de azufre, como por ejemplo cromatografía de iones, cromatografía de gases, espectrometría de masas, plasma acoplado inductivamente, absorción atómica, espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, espectrometría de emisión atómica de acoplamiento inductivo acoplado, espectrometría de absorción atómica de llama, espectrometría de absorción atómica de horno de grafito, o cualquier combinación de los mismos.

[0047] En ciertas realizaciones, determinar el contenido de azufre puede incluir determinar la cantidad de azufre en la NASP que está presente como sulfato. El término "sulfato" se usa en su sentido convencional se refiere al oxianión de azufre, SO_4^{2-} , sin embargo, se puede emplear cualquier oxianión de azufre que tenga un átomo de azufre central unido a al menos un átomo de oxígeno, como sulfito, persulfato, hiposulfato o tiosulfato. Por ejemplo, se puede determinar que la NASP tiene un 10% o más de sulfato en peso, tal como un 15% o más de sulfato en peso, tal como un 20% o más de sulfato en peso, incluyendo un 25% o más de sulfato en peso. En algunos casos, se puede determinar que el NASP tiene un contenido de sulfato en peso que varía de 1% en peso de sulfato a 25% en peso de sulfato, tal como 3% a 20% e incluso de 5% a 15%. Se puede emplear cualquier protocolo conveniente para determinar la cantidad en peso de sulfato en los NASP, como los descritos anteriormente para determinar el contenido de azufre. Por ejemplo, los métodos para determinar la cantidad de sulfatación pueden incluir, entre otros, espectrometría de masas, plasma acoplado inductivamente, cromatografía iónica, cromatografía de gases, absorción atómica, espectrometría de absorción atómica de horno de grafito, espectrometría de masas acoplada por inducción, plasma acoplado inductivamente espectrometría de emisión atómica, espectrometría de absorción atómica de llama, titulación

acidimétrica, o cualquier combinación de las mismas.

[0048] Además, al determinar la cantidad de sulfato presente en la NASP, también se puede determinar el grado de sulfatación. El término "grado de sulfatación" se usa en su sentido convencional para referirse al número promedio de grupos sulfato por residuo de sacárido de la NASP. Por ejemplo, el grado de sulfatación de la NASP puede ser 0,1 o mayor, como 0,2 o mayor, como 0,3 o mayor, como 0,5 o mayor, como 0,6 o mayor, como 0,7 o mayor, como 0,9 o mayor, como 1,0 o mayor, como 1,25 o mayor e incluso 1,5 o mayor. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen determinar que el grado de sulfatación de la NASP varía de 0,1 a 0,6, tal como 0,15 a 0,6, tal como 0,2 a 0,6, tal como 0,3 a 0,6 y que incluye 0,5 a 0,6, tal como 0,55.

[0049] En algunas realizaciones, la evaluación de la estructura molecular de la NASP incluye determinar la configuración de sulfatación de la NASP. En otras palabras, los métodos pueden incluir la determinación del patrón de sulfato de los residuos de sacáridos sulfatados de una NASP. Por ejemplo, se puede determinar que el residuo de sacárido está sulfatado en la posición 4-O. En otros casos, se determina que el residuo de sacárido está sulfatado en la posición 3-O. En otros casos más, se determina que el residuo de sacárido está sulfatado en la posición 2-O. En ciertos casos, se puede determinar que el residuo de monosacárido está sulfatado tanto en la posición 4 como en la posición 3. En otros casos, cada residuo de sacárido puede determinarse como sulfatado en la posición 4-O y en la posición 2-O. En otros casos, se puede determinar que cada residuo de sacárido está sulfatado en la posición 3-O y en la posición 2-O. En otros casos más, se puede determinar que cada residuo de sacárido está sulfatado en la posición 4-O, en la posición 3-O y en la posición 2-O. Cada residuo de sacárido del esqueleto de polisacárido NASP puede tener la misma o diferentes configuraciones de sulfatación. Por ejemplo, se puede determinar que el 50% o más de los residuos de sacáridos sulfatados de un NASP están sulfatados en la posición 4-O, como el 60% o más, como el 75% o más, como el 90% o más, como el 95% o más, e incluyendo todos los residuos de monosacáridos sulfatados de un NASP, se puede determinar que está sulfatado en la posición 4-O. En algunos casos, se puede determinar que el porcentaje de residuos de sacáridos sulfatados de la NASP está sulfatado en la posición 4-O en un rango de 50% a 99%, tal como 55% a 90%, tal como 60% a 85 % e incluyendo 65% a 75%.

[0050] También se puede determinar el número de grupos sulfato unidos a cada residuo de sacárido en el esqueleto de polisacárido NASP. Por ejemplo, se puede determinar que cada residuo de sacárido (por ejemplo, fucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, glucosa, manosa, xilosa como se describió anteriormente) contiene uno (es decir, monosulfatado) o más (es decir, polisulfatados) restos de sulfato. En algunos casos, cada residuo de sacárido de la NASP puede tener el mismo número de grupos sulfato. Por ejemplo, al determinar el número de grupos sulfato unidos a cada residuo de monosacárido, se puede determinar que el 10% o más de los residuos de sacáridos de las NASP están monosulfatados, como el 15% o más de los residuos de sacáridos, como el 25% o más de los residuos de sacáridos, como el 50% o más de los residuos de sacáridos, como el 75% o más de los residuos de sacáridos, como el 90% o más de los residuos de sacáridos, como el 95% o más de los residuos de sacáridos, incluido el 99% o más de los residuos de sacáridos. En algunos casos, el porcentaje de residuos de sacáridos que son monosulfatados varía entre el 5% y el 99%, como el 10% al 90% e incluye el 15% y el 75%. En otras realizaciones, se determina que el 10% o más de los residuos de sacáridos de las NASP son polisulfatados, como el 15% o más de los residuos de sacáridos, como el 25% o más de los residuos de sacáridos, como el 50% o más de los residuos de sacáridos, como el 75% o más de los residuos de sacáridos, como el 90% o más de los residuos de sacáridos, como el 95% o más de los residuos de sacáridos, incluyendo el 99% o más de los residuos de sacáridos. En algunos casos, el porcentaje de residuos de sacáridos que son polisulfatados varía del 5% al 99%, como el 10% al 90% e incluye el 15% y el 75%. Cuando están presentes tanto residuos de sacáridos monosulfatados como polisulfatados, se puede calcular la relación de residuos monosulfatados a residuos polisulfatados en NASPs. Por ejemplo, la proporción calculada de residuos de sacáridos monosulfatados a polisulfatados puede oscilar entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1,000, o un rango de los mismos. Del mismo modo, la proporción calculada de residuos de sacárido polisulfatado a monosacárido puede oscilar entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1,000, o un rango de los mismos. Se puede emplear cualquier protocolo conveniente para determinar la sulfatación de los NASP, como se describe anteriormente. Por ejemplo, los métodos para determinar el grado de sulfatación, la configuración de sulfatación y el número de grupos sulfato en los residuos de sacáridos sulfatados de las NASP de interés pueden incluir, entre otros, espectrometría de masas, espectrometría de masas con trampa de ionización por electropulverización, electroforesis capilar, cromatografía de iones, análisis elemental, titulación acidimétrica, desulfatación, estabilidad de los ésteres de sulfato en alcali y análisis de metilación, espectroscopía de RMN, espectroscopía IR o cualquier combinación de los mismos.

[0051] En los casos en que se determinan la densidad de carga aniónica y el grado de sulfatación, los métodos también pueden incluir la comparación de la relación de la densidad de carga aniónica con el grado de sulfatación. Por ejemplo, la relación calculada de densidad de carga aniónica a grado de sulfatación puede oscilar entre 1:1 y 1:1,25; 1:1,25 y 1:1,5; 1:5 y 1:1,75; 1:75 y 1:2 o un rango de los mismos. Del mismo modo, la relación calculada entre el grado de sulfatación y la carga aniónica puede variar entre 1:1 y 1:1,25; 1:1,25 y 1:1,5; 1:5 y 1:1,75; 1:75 y 1:2 o un rango de los mismos. Al comparar la densidad de carga aniónica con el grado de sulfatación, se puede determinar el porcentaje de la densidad de carga aniónica de la NASP que está relacionada con la sulfatación del residuo de sacárido. Por ejemplo, los métodos pueden incluir determinar que 50% o más de la densidad de carga aniónica de la NASP está relacionada con la sulfatación de monosacáridos, como 60% o más, como 70% o más, como 80% o más, como 90%

o más, como 95% o más, incluida la determinación de que 99% o más de la densidad de carga aniónica de la NASP está relacionada con la sulfatación de monosacáridos. En ciertos casos, evaluar la estructura molecular de la NASP incluye determinar que toda la densidad de carga aniónica de la NASP está relacionada con la sulfatación de monosacáridos.

5
[0052] En la evaluación de una estructura molecular de NASP para determinar si la NASP puede ser adecuada para administrar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación de la sangre, los métodos pueden incluir además un exceso de sulfatación o la desulfatación de la NASP. El término "sobresulfatación" se utiliza en su sentido convencional para referirse a un aumento químico o enzimático del contenido de sulfato de la NASP. A la inversa, el término "desulfatar" se refiere a la disminución química o enzimática del contenido de sulfato de la NASP. Se puede usar cualquier protocolo conveniente para sulfatar químicamente una NASP, siempre que el contenido de sulfato de la NASP resultante aumente como resultado de nuevos restos de sulfato unidos covalentemente a la estructura de la NASP o para desulfatar químicamente una NASP siempre que el contenido de sulfato de la NASP resultante disminuye el resultado de la eliminación de restos de sulfato de la estructura NASP. Por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo libres a lo largo del esqueleto de polisacárido pueden sulfatarse uniendo uno o más aniones sulfato a los grupos hidroxilo libres a lo largo del esqueleto de polisacárido. En otros casos, se pueden emplear complejos de trióxido de azufre con piridina, trietilamina o con complejos estañosos (ver, por ejemplo, los métodos que se describen en la sección experimental a continuación, así como los métodos para sulfatar grupos hidroxilo en Calvo-Asin, JA, et al., J. Chem. Soc, Perkin Trans 1, 1997, 1079).

10
15
20
[0053] Al sobredulfatar o desulfatar la NASP, el impacto de la sulfatación en la actividad procoagulante y anticoagulante puede confirmarse aún más. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el impacto del grado de sulfatación en la actividad procoagulante o anticoagulante puede evaluarse sobredulfatando una NASP que tiene un grado predeterminado de sulfatación. Cuando un NASP está sobre-saturado, la extensión de la sobre-sulfatación puede variar según se desee. Por ejemplo, el NASP puede estar sobre sulfatado para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en el NASP en un 10% o más, como un 25% o más, como un 50% o más, como un 75% o más e incluyendo un exceso de sulfato para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP en un 90% o más. En algunos casos, la NASP puede estar sobre sulfatada para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP en un porcentaje que oscila entre el 5% y el 99%, como el 10% al 90% e incluso entre el 15% y el 75%. En otras realizaciones, la NASP está sobre sulfatada para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP 1,5 veces o más, como 2 veces o más, como 3 veces o más, e incluye la sobre sulfatación para aumentar el número de sulfatados. Los residuos de sacáridos en la NASP por 5 veces o más. En algunos casos, la NASP puede estar sobre sulfatada para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP en un rango de 2 a 10 veces, como 3 veces, como 4 veces e incluso sobre-sulfatar la NASP para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados por 5 veces. En ciertas realizaciones, la NASP puede estar sobre sulfatada a un grado deseado específico de sulfatación, como, por ejemplo, para determinar un valor umbral para un grado de sulfatación que sea adecuado para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea. Por ejemplo, una NASP puede estar sobre sulfatada para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP, de modo que la NASP tenga un grado final de sulfatación que sea 0,1 o mayor, como 0,2 o mayor, como 0,3 o mayor, como 0,75 o más, como 1,0 o más, como 1,25 o más, incluido el sobredimensionamiento de una NASP para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP, de modo que la NASP tenga un grado final de sulfatación de 1,5 o más. En ciertos casos, la NASP puede estar sobre sulfatada para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP, de modo que la NASP tenga un grado final de sulfatación de 0,5 o más. En algunos casos, la NASP está sobre sulfatada para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP, de modo que la NASP tiene un grado final de sulfatación que varía de 0,1 a 3,0, como 0,5 a 2,5, como 0,7 a 2,0 e incluido 1,0 a 1,5,

35
40
45
50
55
60
65
[0054] De manera similar, el impacto del grado de sulfatación sobre la actividad procoagulante o anticoagulante puede evaluarse de manera similar desulfatando una NASP que tiene un grado predeterminado de sulfatación. Por ejemplo, la NASP puede ser desulfatada para reducir el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP en un 10% o más, como un 25% o más, como un 50% o más, tal como un 75% o más e incluyendo la desulfatación para reducir el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP en un 90% o más. En algunos casos, la NASP puede ser desulfatada para disminuir el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP en un porcentaje que oscila entre el 5% y el 99%, como entre el 10% y el 90% e incluye entre el 15% y el 75%. En otras realizaciones, la NASP está desulfatada para reducir el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP en 1,5 veces o más, como 2 veces o más, como 3 veces o más e incluye la desulfatación para reducir el número de sulfatos. Los residuos de sacáridos en la NASP por 5 veces o más. En algunos casos, la NASP puede ser desulfatada para disminuir el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP en un rango de 2 a 10 veces, como 3 veces, como 4 veces e incluyendo sobre-sulfatar la NASP para aumentar el número de residuos de sacáridos sulfatados por 5 veces. En ciertas realizaciones, la NASP puede desulfatarse para reducir el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP a un grado deseado específico de sulfatación, como, por ejemplo, para determinar un valor umbral para un grado de sulfatación que sea adecuado para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación de la sangre. Por ejemplo, una NASP puede ser desulfatada para reducir el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP, de modo que la NASP tenga un grado final de sulfatación de 2,0 o menos, como 1,75 o menos, como 1,5 o menos, como 1,25 o menos, como 1,0 o menos, como 0,75 o menos e incluir la desulfatación de una NASP para reducir el número de residuos de sacáridos sulfatados en la NASP, de modo que la NASP tenga un grado final de sulfatación

de 0,5 o menos. En algunos casos, el NASP está desulfatado para disminuir el número de residuos de sacáridos sulfatados en el NASP, de modo que el NASP tiene un grado final de sulfatación que varía de 0,1 a 3,0, tal como 0,5 a 2,5, como 0,7 a 2,0 e incluido 1,0 a 1,5.

5 **[0055]** En algunas realizaciones, los aspectos de la presente invención pueden incluir sobre-sulfatación o desulfatación de una NASP seguida de determinar si la NASP sobre sulfatada o desulfatada tiene una actividad procoagulante incrementada, actividad anticoagulante disminuida o ambas actividad procoagulante incrementada y actividad anticoagulante disminuida en comparación con una NASP no modificada. Por ejemplo, el método puede incluir los pasos de: 1) determinar la actividad procoagulante o anticoagulante de una NASP (como se describe en detalle más arriba); 2) sobresulfatar o desulfatar la NASP; 3) determinar la actividad procoagulante o anticoagulante de la NASP sobresulfatada o desulfatada; 3) comparar la actividad procoagulante o anticoagulante de la NASP no modificada con la actividad procoagulante o anticoagulante de la NASP sobre sulfatada o desulfatada; y 4) determinar si la NASP sobresulfatada o desulfatada ha aumentado la actividad procoagulante, ha disminuido la actividad anticoagulante o ambos aumentaron la actividad procoagulante y disminuyó la actividad anticoagulante.

15 **[0056]** En otras realizaciones, los métodos de la invención pueden incluir un exceso de sulfatación o desulfatación de una NASP, seguido de la determinación de si uno o más de los NASP no modificados, NASP sobre sulfatados o NASP desulfatados pueden ser adecuados para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea. Por ejemplo, el método puede incluir los pasos de 1) determinar la actividad procoagulante o anticoagulante de una NASP; 2) sobresulfatar o desulfatar la NASP; 3) determinar la actividad procoagulante o anticoagulante de la NASP sobresulfatada o desulfatada; 3) la comparación de la actividad procoagulante o anticoagulante de la NASP no modificada con la actividad procoagulante o anticoagulante de la NASP sobre sulfatada o desulfatada; 4) determinar si la NASP sobresulfatada o desulfatada ha aumentado la actividad procoagulante, disminuyó la actividad anticoagulante o aumentó la actividad procoagulante y disminuyó la actividad anticoagulante en comparación con una NASP no modificada; y 5) determinar si uno o más de los NASP no modificados, NASP sobre sulfatados o NASP desulfatados pueden ser adecuados para tratar a un sujeto que tenga un trastorno de coagulación sanguínea basado en la actividad procoagulante y anticoagulante determinada de las NASP no modificadas, NASP sobre sulfatadas o NASP desulfatadas.

30 **[0057]** En ciertas realizaciones, la evaluación de la estructura molecular incluye la visualización de la NASP por electroforesis en gel. La visualización de la NASP por electroforesis en gel es una técnica eficiente para determinar la variabilidad de lote a lote de diferentes composiciones de NASP. Como tal, se puede emplear la electroforesis en gel para evaluar la consistencia de las composiciones de NASP obtenidas de diferentes fuentes. Además, la pureza general, la relación de tamaño molecular a carga y la afinidad por el bario se pueden determinar en base a la electroforesis en gel. Se puede emplear cualquier protocolo de electroforesis en gel para visualizar las composiciones de NASP y puede incluir, pero no se limita a, gel de agarosa o electroforesis en gel de poliacrilamida.

35 **[0058]** En la evaluación de una composición de NASP, los métodos también incluyen la evaluación de la composición química de la composición de NASP. Por "composición química" se entiende cualquier componente aparte de la NASP que está presente en la composición de la NASP. Como tal, la composición química de la composición de NASP puede incluir proteínas, polisacáridos, elementos traza, ácidos o bases, metales, iones y varias otras impurezas.

40 **[0059]** En algunas realizaciones, la evaluación de la composición química de la composición de NASP incluye un análisis elemental de la composición de NASP. El término "análisis elemental" se utiliza en su sentido convencional para referirse a la determinación de los componentes elementales e isotópicos de la composición de NASP. El análisis elemental puede ser cualitativo (es decir, determinar qué elementos están presentes) y cuantitativo (es decir, determinar cuánto de cada elemento está presente). En realizaciones de la invención, determinar los componentes elementales de la composición de NASP incluye determinar el contenido de impurezas, y puede incluir determinar el contenido de proteína (por ejemplo, determinando el contenido de nitrógeno) y el contenido de azufre elemental de la composición de NASP. El análisis elemental se puede realizar mediante cualquier protocolo conveniente, como por ejemplo análisis de combustión, gravimetría, espectroscopia atómica óptica, absorción atómica de llama, absorción atómica de horno de grafito, espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente, fusión de sodio, fluorescencia de rayos X, emisión de rayos X inducida por partículas, espectroscopia fotoelectrónica de rayos X, espectroscopia electrónica de Auger e incluso mediante análisis de plasma acoplado inductivamente.

45 **[0060]** En ciertos casos, el análisis elemental incluye determinar el contenido de azufre elemental de la composición de NASP. Como se discutió anteriormente, el azufre puede estar presente en las NASP en forma de sulfato. Como tal, la cantidad de azufre presente en la composición de NASP puede variar. Por ejemplo, la cantidad de azufre puede ser de 10 por ciento en peso o menos, como 9,5 por ciento en peso o menos, como 9,0 por ciento en peso o menos, como 8 por ciento en peso o menos, como 7 por ciento en peso o menos e incluyendo 5 en peso por ciento o menos. En algunos casos, la cantidad de azufre presente en la composición de NASP varía de 0,001 por ciento en peso a 10 por ciento en peso, como 0,01 por ciento en peso a 9 por ciento en peso, como 0,1 por ciento en peso a 8 por ciento en peso e incluye 1 por ciento en peso a 7 por ciento en peso por ciento. Cuando la composición de NASP incluye una alta cantidad de alginato (p.ej., presente en cantidades mayores que aproximadamente 0,5%), determinar el contenido de azufre elemental de la composición de NASP puede incluir además ajustar el porcentaje de azufre en

peso determinado por análisis elemental para excluir el contenido de alginato. Al eliminar el alginato, el peso total calculado de la composición de NASP disminuye y el porcentaje en peso de azufre en estas composiciones aumentará, dando una comparación más precisa de las composiciones de la cantidad de contenido de azufre de NASP. El contenido de azufre elemental se puede determinar utilizando cualquier protocolo conveniente, como se describe anteriormente. En ciertos casos, el contenido de azufre elemental se determina mediante técnicas de plasma de acoplamiento inductivo o espectroscopia de emisión atómica y se compara con el contenido de azufre elemental según lo determinado por la valoración colorimétrica.

[0061] Según la fuente, la composición de NASP puede contener impurezas. Por "impurezas" se entiende cualquier componente de la composición de NASP que puede ser indeseable o es perjudicial para su aplicación en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea. Por ejemplo, las impurezas pueden interferir (es decir, disminuir) o inhibir una propiedad deseable particular de la composición de NASP, tal como, por ejemplo, la actividad procoagulante. Alternativamente, las impurezas pueden no ser perjudiciales para la función de la NASP, pero pueden hacer que la composición de la NASP no sea adecuada para su administración a un sujeto, como por ejemplo que contenga niveles elevados de toxinas, contenido de bacterias o niveles altos de iones de metales traza (por ejemplo, arsénico, plomo, cadmio o mercurio) como se describe a continuación. Las impurezas pueden incluir, entre otras, impurezas orgánicas tales como proteínas, polisacáridos (por ejemplo, alginato, laminar y ácidos urónicos), ácido acético y glicerol e impurezas inorgánicas, como oligoelementos e iones metálicos.

[0062] En ciertas realizaciones, los métodos incluyen la determinación de la concentración de impurezas orgánicas en la composición de NASP. En algunos casos, las impurezas orgánicas incluyen proteínas impurezas. En estos casos, la concentración de aminoácidos, péptidos o proteínas presentes en la composición de NASP puede determinarse mediante ensayos específicos de proteínas (por ejemplo, ácido bicinínico, ensayo de Bradford, etc.) o mediante análisis elemental del contenido de nitrógeno. Dependiendo de la fuente de la composición de NASP, la concentración determinada de proteína puede variar, como 0,1% en peso o menos, como 0,05% en peso o menos e incluyendo 0,01% en peso o menos.

[0063] En otros casos, las impurezas orgánicas incluyen polisacáridos que no son NASP. Por ejemplo, puede determinarse la concentración de alginato y laminar. El alginato es un polisacárido compuesto de ácido manurónico con enlaces 1-4 y no es procoagulante ni anticoagulante. Laminaran está compuesto de residuos de glucosa con enlaces 1-3 y 1-6. El alginato y el laminar pueden cuantificarse mediante cualquier protocolo conveniente, que incluye ¹³C-RMN, cromatografía iónica o mediante ensayos específicos de ácido urónico (por ejemplo, análisis de carbazol).

[0064] En otras realizaciones, los métodos incluyen determinar el contenido de impureza inorgánica. Por ejemplo, las impurezas inorgánicas pueden incluir elementos traza e iones metálicos. En algunos casos, los métodos incluyen identificar y cuantificar uno o más de plata, aluminio, arsénico, boro, bario, berruto, calcio, cadmio, cobalt, cobre, hierro, germanio, mercurio, litio, magnesio, manganeso, molibdeno, sodio, níquel, fósforo, plomo, antimonio, aluminio, silicio, estaño, estroncio, titanio y zinc. Se puede determinar que los elementos traza y los iones metálicos (p.ej., As, Cd Hg, Pb) están presentes en las composiciones de NASP en cantidades que van desde 0,05 µg/g hasta 3,0 µg/g, como 0,1 µg/g hasta 2,5 µg/g, tal como 0,25 µg/ga 2,0 µg/g, e incluyendo 0,5 µg/ga 1,5 µg/g. Los elementos traza y los iones metálicos se pueden identificar y cuantificar utilizando cualquier protocolo conveniente, como por ejemplo espectrometría de masas, cromatografía iónica, absorción atómica, espectrometría de absorción atómica de horno de grafito, espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente, espectrometría de absorción atómica de llama, titulación acidimétrica, o cualquier combinación de las mismas.

[0065] Como se resume anteriormente, se evalúan una o más composiciones de NASP para determinar la actividad de coagulación y la composición química de la composición y la estructura molecular de NASP. Los métodos de la invención incluyen además determinar si cada composición de NASP es adecuada para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre basándose en las actividades de coagulación determinadas, composiciones químicas y estructuras moleculares de NASP. Para determinar si cada composición de NASP puede ser adecuada, un ser humano (ya sea solo o con la ayuda de una computadora, si utiliza un proceso automatizado por computadora inicialmente establecido bajo dirección humana, como se describe a continuación) evalúa las actividades de coagulación determinadas, las composiciones químicas y las estructuras moleculares de la NASP determinan si la composición de la NASP sería adecuada o inadecuada para administrar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación sanguínea.

[0066] La determinación de si una composición de NASP puede ser adecuada para administrar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre puede variar en términos de objetivos, donde en algunos casos las características deseadas de la composición de NASP son características que finalmente resultan en el tratamiento efectivo de un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación de la sangre.

[0067] Después de evaluar la actividad de coagulación de la composición de NASP, los métodos incluyen determinar que una composición de NASP puede ser adecuada para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre en el que la composición de NASP satisface las siguientes condiciones:

un valor de CE_{50} para la actividad procoagulante de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ o menos según lo determinado por CAT;
 una ventana procoagulante de 0,1 a 100 mg/mL ;
 una relación de la actividad procoagulante a la actividad anticoagulante de la composición que es 10 o mayor;
 un peso molecular de la NASP que es de 160 kDa o menos;
 un contenido de fucosa de la NASP que es 60% de fucosa o mayor;
 un contenido de alginato de la NASP que es un 10% de alginato o menos;
 un porcentaje en peso de azufre de la NASP que es 8% de azufre en peso o mayor; y
 un porcentaje en peso de impurezas en la composición que es 0,1% de impurezas en peso o menos.

[0068] Los métodos también pueden incluir determinar que una composición de NASP puede ser adecuada para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre en el que la composición de NASP además satisface una o más de las siguientes condiciones:

la composición de NASP aumenta en la tasa global de coagulación sanguínea en un 50% o más en comparación con un control adecuado, tal como en un 75%, tal como en un 95% e incluso en un 99% en comparación con un control adecuado;
 la composición de NASP reduce el tiempo requerido para que la sangre comience a coagular en un 50% o más en comparación con un control adecuado, tal como en un 75%, tal como en un 90% e incluyendo en un 95% en comparación con un control adecuado;
 la concentración de la composición de NASP requerida para producir la generación máxima de trombina varía de 0,1 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$, como 0,5 $\mu\text{g/ml}$, incluida 1 $\mu\text{g/ml}$;
 La composición de NASP corrige la generación de trombina en el plasma con factor inhibido a al menos 2 veces la que se encuentra en el plasma normal, como 2,5 veces la que se encuentra en el plasma normal, como 3 veces la que se encuentra en el plasma normal, incluidas 5 veces la que se encuentra en el plasma normal; La composición de NASP corrige la coagulación en plasma inhibido por FVIII a niveles normales en un rango de concentración de 0,1 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$, como por ejemplo, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, como 0,9 $\mu\text{g/ml}$, como 1,1 $\mu\text{g/ml}$, y incluyendo 1,3 $\mu\text{g/ml}$;
 el valor de CE_{50} para la actividad procoagulante de la composición NASP es de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ o menos, incluidos 0,1 o menos $\mu\text{g/ml}$; la relación de la actividad procoagulante a la actividad anticoagulante de la composición NASP es 15 o mayor, como 20, como 25, como 30, como 35, como 40, como 45 y hasta 50;
 la composición de NASP tiene una CE_{50} para la actividad inhibidora de TFPI de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ o menos, como 0,4 $\mu\text{g/ml}$, tal como 0,3 $\mu\text{g/ml}$, tal como 0,2 $\mu\text{g/ml}$, incluyendo 0,1 $\mu\text{g/ml}$; y
 la concentración a la que la composición NASP activa la vía de contacto es 20 veces mayor que la CE_{50} de la composición NASP, tal como 30 veces, tal como 35 veces, como 40 veces e incluso 50 veces más que la CE_{50} de la composición NASP.

[0069] En otros casos, después de evaluar la estructura molecular de una o más composiciones de NASP, se puede determinar que una composición de NASP es adecuada para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre en el que la composición de NASP satisface una o más de las siguientes condiciones:

el peso molecular de la NASP es de 150 kDa o menos, como 130 kDa e incluye un peso molecular que varía de 15 kDa a 41 kDa;
 la NASP tiene un grado de polimerización que varía de 70 a 200, tal como 75 a 175, tal como 100 a 150 e incluye un grado de polimerización de 125;
 la NASP tiene una proporción de residuos de sacáridos lineales a residuos de sacáridos de ramificación de 2,0 o menos, como 1,4, como 1,3, como 1,2 e incluido 1;
 la NASP tiene un contenido de fucosa de 75% o más en peso, como el 80% en peso e incluye el 90% de contenido de fucosa o por peso;
 la NASP tiene un contenido de alginato que es del 8% o menos en peso, incluido un contenido de alginato del 5% en peso;
 la NASP tiene un contenido de fucosa de 80% o más en peso y un contenido de alginato de 10% o menos en peso, como 85% de fucosa en peso y 5% de contenido de alginato en peso;
 la NASP tiene una densidad de carga aniónica que varía de 0,5 a 0,6, como 0,51, como 0,52 e incluye una densidad de carga aniónica de 0,55;
 la NASP tiene un grado de sulfatación de 0,5 o mayor, como 0,55, como 0,6, como 0,65, como 0,7, como 1,0 e incluso 1,5; o
 el contenido de azufre de la NASP es del 9% o más de azufre en peso, como el 10% de azufre en peso, incluido el 15% de azufre en peso.

[0070] Por ejemplo, en ciertos casos, se puede determinar que una composición de NASP es adecuada cuando la composición tiene además una relación de actividad procoagulante a actividad anticoagulante de 25 o mayor. En otros casos, determinar que una composición de NASP puede ser adecuada incluye determinar que la composición tiene además una CE_{50} para la actividad inhibidora de TFPI de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ o menos, un contenido de fucosa que es 70% o más en peso, un contenido de alginato que es 7% o menos en peso y ninguna activación de la vía de contacto Hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ o más. En otros casos, determinar que una composición de NASP puede ser adecuada incluye determinar que la composición incluya una NASP que además tiene un peso molecular que varía de 15 kDa a 41 kDa, un grado

de polimerización que varía de 70 a 200, un grado de sulfatación de 0,5 o mayor. En otros casos, determinar que una composición de NASP puede ser adecuada incluye determinar que la composición incluya una NASP que además tiene un peso molecular que varía de 15 kDa a 41 kDa, un grado de polimerización que varía de 70 a 200, un grado de sulfatación de 0,5 o mayor, un contenido de fucosa que es 70% o más en peso, y un contenido de alginato que es 7% o menos en peso. En otros casos, determinar que una composición de NASP puede ser adecuada incluye determinar que la composición tiene además una CE_{50} para la actividad inhibidora de TFPI de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ o menos e incluye una NASP que tiene un peso molecular que varía de 15 kDa a 41 kDa, densidad de carga aniónica de 0,5 a 0,6, un grado de polimerización de 70 a 200 y un grado de sulfatación de 0,5 a 0,6, un contenido de fucosa de 70% o más en peso, un contenido de alginato de 7% o menos por peso y sin activación de la vía de contacto hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ o más.

[0071] Cuando es inmediatamente evidente que una composición de NASP no es adecuada para administrar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre, la composición de NASP puede descartarse en cualquier momento durante los métodos de la invención. Por ejemplo, la composición de NASP puede descartarse inmediatamente después de determinar la actividad de coagulación, después de determinar la estructura molecular o después de determinar la composición química de la composición de NASP. En algunos casos, una composición de NASP se descarta inmediatamente porque contiene impurezas tóxicas. En otros casos, una composición de NASP se descarta de inmediato porque no muestra actividad procoagulante. En otros casos, una composición de NASP se descarta inmediatamente porque el peso molecular de la NASP es demasiado grande para ser biodisponible.

[0072] Los aspectos de la invención también incluyen. En ciertas realizaciones, métodos para seleccionar una pluralidad de composiciones de NASP para identificar una o más composiciones de NASP que pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre. Como tales, los métodos incluyen determinar la actividad de coagulación, composición química y la estructura molecular de NASP de una pluralidad de composiciones de NASP y comparar las actividades de coagulación determinadas, composiciones químicas y estructuras moleculares de NASP entre sí e identificar si una o más composiciones de NASP pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre. Después de determinar la actividad de coagulación, composición química y estructura molecular NASP de cada una de las composiciones de NASP, un ser humano (ya sea solo o con la ayuda de una computadora) compara las características determinadas de las composiciones de NASP para identificar una o más composiciones de NASP que pueden ser adecuadas.

[0073] La pluralidad de composiciones de NASP se evalúa determinando las actividades de coagulación, composiciones químicas y estructuras moleculares de NASP como se describió anteriormente. Después de evaluar las composiciones de NASP mediante la determinación de las actividades de coagulación, las composiciones químicas y las estructuras moleculares de NASP, los métodos incluyen la comparación de la pluralidad de composiciones de NASP para evaluar si una o más de las composiciones de NASP pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre.

[0074] En algunas realizaciones, la comparación de la pluralidad de las composiciones de NASP incluye la clasificación de las composiciones de NASP con respecto a cada característica deseada (por ejemplo, alta actividad procoagulante, ventana procoagulante amplia, alta actividad inhibidora de TFPI, baja activación de la vía de contacto, baja actividad anticoagulante, gran proporción de actividad procoagulante a actividad anticoagulante, alta biodisponibilidad, alta pureza, baja polidispersidad, alto contenido de fucosa, alto contenido de azufre, bajo contenido de alginato, NASP con bajo peso molecular, producción constante de lote a lote, y bajo contenido de impurezas). Como tal, a cada composición de NASP se le asigna una clasificación con respecto a cada característica. Después de clasificar las composiciones NASP con respecto a cada característica, se puede calcular una clasificación acumulativa total. Sobre la base de la clasificación acumulativa total, se determina la idoneidad de la composición de NASP para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre. Un ejemplo de selección de una pluralidad de composiciones de NASP para identificar si una o más de las composiciones pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea se ilustra en el Ejemplo 4 a continuación. Dependiendo del sujeto y tipo de trastorno de la coagulación sanguínea, la clasificación de la composición NASP en cada característica puede contribuir de manera diferente a la clasificación acumulativa total. En otras palabras, no todas las características contribuirán por igual a la clasificación acumulativa total, donde algunas características pueden ser más ponderadas que otras, dependiendo del objetivo final al emplear la composición NASP. Por ejemplo, a la actividad de coagulación se le puede dar un mayor énfasis que a las características estructurales. En otros casos, las características estructurales reciben un mayor énfasis que la actividad de coagulación. Por ejemplo, la actividad procoagulante de la composición de NASP puede contribuir más en la identificación de una composición de NASP adecuada que el peso molecular de la NASP. Del mismo modo, la actividad inhibidora de TFPI puede ponderarse más que el contenido de azufre.

[0075] La contribución de cada característica a la clasificación acumulativa total de la composición de NASP puede asignarse según se desee. En ciertas realizaciones, la actividad de coagulación de la composición de NASP hace una mayor contribución a la clasificación acumulativa total que la estructura molecular de la NASP. En otras realizaciones, la actividad procoagulante hace una mayor contribución a la clasificación acumulativa total que la actividad anticoagulante. En otras realizaciones más, el contenido de monosacáridos de la NASP hace una contribución mayor a la clasificación acumulativa total que el peso molecular de la NASP.

[0076] Después de calcular la clasificación acumulativa total, la idoneidad de la pluralidad de composiciones de NASP para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea se determina basándose en la clasificación acumulativa total.

5 **[0077]** En algunas realizaciones, se determina que una o más composiciones de NASP son adecuadas si su clasificación acumulativa total excede un umbral predeterminado. En estos casos, se puede determinar que cualquier número de la pluralidad de composiciones de NASP es adecuado (es decir, cero para todas las composiciones de NASP). Por ejemplo, ninguna de las composiciones de NASP examinadas puede exceder el umbral predeterminado y, por lo tanto, ninguna se identifica como adecuada. Alternativamente, todas las composiciones de NASP
10 seleccionadas pueden superar el umbral predeterminado y, por lo tanto, todas las composiciones de NASP se identifican como adecuadas.

[0078] En otros casos, solo se selecciona la composición NASP que tiene la clasificación total acumulativa total más alta. En otras palabras, solo la composición NASP con la clasificación más alta se considera un posible candidato para
15 tratar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación de la sangre.

[0079] En otras realizaciones, a cada composición de NASP se le puede dar un rango basado en el número de características deseadas que posee la composición de NASP. Por ejemplo, una composición NASP puede tener 2
20 características deseadas, como 3, como 4 como 5, que incluyen 10 características deseadas. En estas realizaciones, se puede determinar que una composición de NASP es adecuada si el número total de características deseadas que posee la composición de NASP supera un umbral predeterminado. Por ejemplo, el umbral puede ser 1 o más características deseadas, como 2, como 3, como 5, como 10 características deseadas. Alternativamente, en algunos casos, solo la composición NASP con el mayor número de características deseadas se selecciona como adecuada.

25 **COMPOSICIONES ADECUADAS PARA TRATAR UN SUJETO QUE TIENE UN TRASTORNO DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE**

[0080] Las composiciones de NASP que pueden ser adecuadas para administrar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre pueden variar en términos de objetivo, como se describe anteriormente, donde en algunos
30 casos las características deseadas de la composición de NASP son características que finalmente dan como resultado el tratamiento eficaz de un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación de la sangre. Como tales, las características deseadas de la composición de NASP pueden incluir una o más de: alta actividad procoagulante, ventana amplia procoagulante, alta actividad inhibidora de TFPI, baja activación de la vía de contacto, baja actividad anticoagulante, gran proporción de actividad procoagulante a anticoagulante, alta biodisponibilidad, alta pureza, baja polidispersidad,
35 alto contenido de fucosa, alto contenido de azufre, bajo contenido de alginato, alto grado de sulfatación, NASP con bajo peso molecular, producción constante de lote a lote y bajo contenido de impurezas o cualquier combinación de los mismos.

[0081] Las composiciones NASP de interés incluyen composiciones que satisfacen una o más de las siguientes
40 condiciones:

la composición de NASP aumenta en la tasa global de coagulación sanguínea en un 50% o más en comparación con un control adecuado, tal como en un 75%, tal como en un 95% e incluso en un 99% en comparación con un control adecuado;

45 la composición de NASP reduce el tiempo requerido para que la sangre comience a coagular en un 50% o más en comparación con un control adecuado, tal como en un 75%, tal como en un 90% e incluyendo en un 95% en comparación con un control adecuado;

la concentración de la composición de NASP requerida para producir la generación máxima de trombina varía de 0,1 a 1,5 µg/ml, como 0,5 µg/ml, incluida 1 µg/ml;

50 la ventana procoagulante de la composición de NASP oscila entre aproximadamente 0,1 y 100 µg/ml o menos; la composición de NASP corrige la generación de trombina en el plasma con factor inhibido a al menos 2 veces la que se encuentra en el plasma normal, como 2,5 veces la que se encuentra en el plasma normal, como 3 veces la que se encuentra en el plasma normal, incluidas 5 veces la que se encuentra en el plasma normal;

55 la composición de NASP corrige la coagulación en plasma inhibido por FVIII a niveles normales en un rango de concentración de 0,5 a 1,5 µg/ml, como por ejemplo, 0,7 µg/ml, como 0,9 µg/ml, como 1,1 µg/ml, y incluyendo 1,3 µg/ml;

el valor de CE₅₀ para la actividad procoagulante de la composición de NASP es de 0,5 µg/ml, como 0,4 µg/ml, como 0,3 µg/ml, como 0,2 µg/ml e incluyendo 0,1 µg/ml;

60 la relación de la actividad procoagulante a la actividad anticoagulante de la composición de NASP es 10 o mayor, tal como 15, como 20, como 25, como 30, como 35, como 40, como 45, e incluso 50;

la composición de NASP tiene una CE₅₀ para la actividad inhibidora de TFPI de 0,5 µg/ml o menos, como 0,4 µg/ml, tal como 0,3 µg/ml, tal como 0,2 µg/ml, incluyendo 0,1 µg/ml; y

65 la concentración a la que la composición NASP activa la vía de contacto es 30 veces o mayor que la CE₅₀ de la composición NASP, tal como 35 veces, tal como 40 veces e incluso 50 veces más que la CE₅₀ de la composición NASP;

el peso molecular de la NASP es de 160 kDa o menos, tal como 150 kDa, tal como 130 kDa e incluye un peso molecular que varía de 15 kDa a 41 kDa pero mayor o igual a 15 kDa;
 la NASP tiene un grado de polimerización que varía de 70 a 200, tal como 75 a 175, tal como 100 a 150 e incluye un grado de polimerización de 125;
 5 la NASP tiene una proporción de residuos de sacáridos lineales a residuos de sacáridos de ramificación de 2,0 o menos, como 1,6, como 1,5, como 1,4, como 1,3, como 1,2 y 1;
 la NASP tiene un contenido de fucosa que es 60% o mayor en peso, tal como 75%, tal como 80% y que incluye 90% de contenido de fucosa en peso;
 la NASP tiene un contenido de alginato que es del 10% en peso, tal como el 8% en peso, incluido el 5% de contenido de alginato en peso;
 10 la NASP tiene un contenido de fucosa de 60% o más en peso y un contenido de alginato de 10% en peso, tal como 75% de fucosa en peso y 5% de contenido de alginato en peso;
 la NASP tiene una densidad de carga aniónica que varía de 0,5 a 0,6, como 0,51, como 0,52 e incluye una densidad de carga aniónica de 0,55;
 15 la NASP tiene un grado de sulfatación de 0,5 o mayor, como 0,7, como 1,0 e incluso 1,5; o
 el contenido de azufre de la NASP es de 8% de azufre o más en peso, incluido el 10% de azufre en peso, incluido el 15% de azufre en peso;
 la composición de NASP tiene un contenido de impureza que es del 1% o menos en peso, tal como un 0,5% en peso, incluido un contenido de impureza que es del 0,1% en peso.

[0082] En algunas realizaciones, las composiciones de NASP adecuadas para administrar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea incluyen composiciones de NASP que poseen más de una de las características deseadas anteriores, tales como 2 de las características deseadas anteriores, tales como 3, tales como 5, tal como 6, tal como 7, tal como 8, e incluyendo 10 de las características deseadas anteriores.

[0083] En ciertas realizaciones, las composiciones de NASP de interés son composiciones que poseen propiedades particulares deseadas o incluyen NASP que tienen características estructurales específicas. Por ejemplo, en ciertos casos, las composiciones de NASP adecuadas incluyen composiciones de NASP que tienen una CE_{50} de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ o menos, una ventana procoagulante de 0,1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ y una relación de actividad procoagulante a actividad anticoagulante de 10 o más. En otros casos, las composiciones NASP adecuadas incluyen composiciones NASP que tienen un peso molecular de 160 kDa o menos, un contenido de fucosa que es 60% o mayor, un contenido de alginato que es 10% o menos y un porcentaje en peso de azufre que es 8% o mayor. En otros casos, las composiciones NASP adecuadas incluyen composiciones NASP que tienen una CE_{50} de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ o menos, una CE_{50} para la actividad inhibidora de TFPI de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ o menos, un peso molecular de 160 kDa o menos, un contenido de fucosa que es 70% o más en peso, un contenido de alginato que es 7% o menos en peso y no hay activación de la vía de contacto hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ o más. En otros casos, las composiciones de NASP adecuadas incluyen NASP que tienen un peso molecular que varía de 15 kDa a 41 kDa, un grado de polimerización que varía de 70 a 200, un grado de sulfatación de 0,5 o superior. Las composiciones de NASP adecuadas también pueden incluir composiciones de NASP que tienen un NASP que tiene un peso molecular que varía de 15 kDa a 41 kDa, un grado de polimerización que varía de 70 a 200, un grado de sulfatación de 0,5 o más, un contenido de fucosa del 70% o mayor en peso, un contenido de azufre de 8% o más en peso y un contenido de alginato que es de 7% o menos en peso. Las composiciones de NASP adecuadas también pueden incluir composiciones de NASP que tienen una CE_{50} de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ o menos, una CE_{50} para la actividad inhibidora de TFPI de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ o menos e incluye una NASP que tiene un peso molecular que varía de 15 kDa a 41 kDa, una densidad de carga aniónica que varía de 0,5 a 0,6, un grado de polimerización que varía de 70 a 200 y un grado de sulfatación que varía de 0,5 a 0,6, un contenido de fucosa que es 70% o más en peso, un contenido de azufre de 8% o más en peso, un contenido de alginato que es del 7% o menos en peso y sin activación por vía de contacto de hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ o más.

[0084] Algunas composiciones están compuestas por NASP del 50% o más en peso que satisfacen una o más de las condiciones mencionadas anteriormente, como el 80% o más en peso, como el 85% o más en peso, como el 90% o mayor en peso, como 95% o más en peso e incluyendo composiciones que están compuestas por 99% o más en NASP en peso que satisfacen una o más de las condiciones mencionadas anteriormente. En otras palabras, las composiciones de NASP son una composición enriquecida de NASP compuesta de al menos el 50% en peso de NASP que satisfacen una o más de las condiciones mencionadas anteriormente y no son simplemente mezclas que contienen una pequeña cantidad de NASP que satisfacen una o más de las condiciones mencionadas anteriormente. En algunos casos, las composiciones de interés incluyen composiciones de NASP que están compuestas por NASP que satisfacen una o más de las condiciones mencionadas anteriormente en una cantidad que oscila entre el 50% y el 99% en peso de la composición de NASP, como el 55% al 90%, tal como 60% a 85% e incluyendo 65% a 75% en peso de la composición de NASP.

[0085] Por ejemplo, en un caso, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas por NASP del 50% o más en peso que tienen un grado de sulfatación que es de 0,5 o más, tal como el 75% o más en peso e incluye el 95% o mayores en peso, las NASP que tienen un grado de sulfatación de 0,5 o mayor. En algunos casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas por NASP que tienen un grado de sulfatación que es de 0,5 o mayor en una cantidad que varía de 50% a 99% en peso de la composición de

NASP, tal como 55% a 90%, tal como 60% a 85% e incluyendo 65% a 75% en peso de la composición de NASP. En ciertas realizaciones, las composiciones de NASP de interés incluyen composiciones que están compuestas de un 50% o más por las NASP que tienen un grado de sulfatación que es de 1,0 o mayor y que incluye un grado de sulfatación de 1,3 o mayor.

[0086] En otros casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas por NASP del 50% o más en peso, que tienen un grado de polimerización que varía de 70 a 200, tal como 75% o más en peso e incluyendo 95% o más en peso, los NASP que tienen un grado de polimerización que varía de 70 a 200. En algunos casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas por NASP que tienen un grado de polimerización que varía de 70 a 200 en una cantidad que varía de 50% a 99% en peso de la composición de NASP, tal como 55% a 90%, tal como 60% a 85% e incluyendo 65% a 75% en peso de la composición de NASP.

[0087] En otros casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas por NASP del 50% o más en peso que tienen un contenido de fucosa que es de 60% o más, tal como el 75% o más en peso e incluyendo el 95% o más de NASPs de peso que tienen un contenido de fucosa del 60% o más. En ciertas realizaciones, las composiciones de NASP de interés incluyen composiciones que están compuestas por NASP del 50% o más en peso que tienen un contenido de fucosa que es del 90% o más. En algunos casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas por NASP que tienen un contenido de fucosa que es 60% o mayor en una cantidad que varía de 50% a 99% en peso de la composición de NASP, tal como 55% a 90%, tal como 60% a 85% e incluyendo 65% a 75% en peso de la composición de NASP.

[0088] En otros casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas por NASP del 50% o más en peso que tienen un valor de CE_{50} para la actividad procoagulante de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ o menos, como el 75% o más en peso e incluyen 95 NASPs en % o más en peso que tienen un valor de CE_{50} para la actividad procoagulante de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ o menos. En ciertas realizaciones, las composiciones de NASP de interés incluyen composiciones que están compuestas por NASP del 50% o más en peso que tienen un valor de CE_{50} para la actividad procoagulante de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o menos. En algunos casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que se componen de NASP que tienen un valor de CE_{50} para la actividad procoagulante de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ o menos en una cantidad que varía del 50% al 99% en peso de la composición de NASP, tal como 55% a 90%, tal como 60% a 85% e incluyendo 65% a 75% en peso de la composición de NASP.

[0089] En otros casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas por NASP del 50% o más en peso que tienen una relación de residuos de sacáridos lineales a residuos de sacáridos ramificados de 1,4 o menos, tal como 75% o más en peso y incluidos los NASP del 95% o más en peso que tienen una proporción de residuos de sacáridos lineales a residuos de sacáridos de ramificación de 1,4 o menos. En otras palabras, en estas realizaciones, las composiciones de interés de NASP están compuestas por NASP en las que uno de cada 1,4 residuos de sacáridos tiene un resto de sacárido ramificado unido a él. En ciertas realizaciones, las composiciones de NASP de interés incluyen composiciones que están compuestas por NASP del 50% o más en peso que tienen una proporción de residuos de sacáridos lineales a residuos de sacáridos de ramificación de 1 o menos. En algunos casos, las composiciones de NASP pueden incluir composiciones que están compuestas de NASP que tienen una proporción de residuos de sacáridos lineales a residuos de sacáridos de ramificación de 1,4 o menos en una cantidad que varía del 50% al 99% en peso de la composición de NASP, tal como 55% a 90%, tal como 60% a 85% e incluyendo 65% a 75% en peso de la composición de NASP.

[0090] Las composiciones de interés también pueden incluir uno o más factores de coagulación de la sangre. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una cantidad de una o más NASP en combinación con uno o más factores de coagulación de la sangre. Los factores de interés de coagulación de la sangre incluyen, entre otros, factor XI, factor XII, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular (HMWK), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, prekallekrein, y cininógeno de alto peso molecular, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa.

[0091] La cantidad (es decir, la masa) de cada una de las NASP y el factor de coagulación de la sangre en las composiciones puede variar, variando de 0,001 mg a 1000 mg, como 0,01 mg a 500 mg, tal como 0,1 mg a 250 mg, tal como 0,5 mg a 100 mg, como 1 mg a 50 mg, incluyendo 1 mg a 10 mg.

[0092] Las composiciones pueden ser homogéneas, que contienen un solo tipo de NASP. En otras realizaciones, las composiciones de interés son mezclas heterogéneas de dos o más NASP diferentes. Por ejemplo, las mezclas heterogéneas pueden contener dos o más NASP que varían con respecto al contenido de monosacáridos, el contenido de azufre, el grado de sulfatación, así como las NASP que tienen distribuciones heterogéneas u homogéneas de peso molecular.

[0093] Las composiciones pueden incluir además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables como parte de una composición farmacéutica. Los excipientes pueden incluir, entre otros, carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, surfactantes, tampones, ácidos, bases y cualquier combinación de los mismos. Los excipientes adecuados para composiciones inyectables pueden incluir agua, alcoholes, polioles, glicerina, aceites vegetales, fosfolípidos y surfactantes. También se puede emplear un carbohidrato tal como un

azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar. Algunos excipientes de carbohidratos de interés incluyen, por ejemplo, monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosilo sorbitol, mioinositol y similares. Las sales inorgánicas pueden incluir, entre otras, ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y cualquier combinación de los mismos.

[0094] Las composiciones también pueden incluir un agente antimicrobiano para prevenir o disuadir el crecimiento microbiano, como por ejemplo cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato de fenilmercúrico, timersol y cualquier combinación de los mismos.

[0095] También se pueden emplear uno o más antioxidantes. Los antioxidantes, que pueden reducir o prevenir la oxidación y, por lo tanto, el deterioro de la composición, pueden incluir, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, sulfato de sodio, formaldehído sulfato de sodio, sulfato de sodio y cualquier combinación de los mismos.

[0096] Se pueden incluir uno o más tensioactivos en las composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, los agentes adecuados pueden incluir, pero no están limitados a polisorbatos, como "Tween 20" y "Tween 80", y pluronics como F68 y F88 (BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, como el colesterol; agentes quelantes, tales como EDTA; y zinc y otros cationes.

[0097] Los ácidos o bases también pueden estar presentes en las composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, los ácidos pueden incluir, entre otros, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de bases incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumerato de potasio, y cualquier combinación de los mismos.

[0098] La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la naturaleza y función del excipiente y las necesidades particulares de la composición. Por lo general, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de la experimentación rutinaria, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que van de bajo a alto), examinando la estabilidad y otros parámetros, y luego determinando el rango en el que el rendimiento óptimo se alcanza sin efectos adversos significativos. En general, sin embargo, el o los excipientes estarán presentes en la composición en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso, tal como desde aproximadamente 5% a aproximadamente 98% en peso, tal como desde aproximadamente 15 a aproximadamente 95% en peso del excipiente, incluido menos del 30% en peso. Los excipientes farmacéuticos junto con otros excipientes que pueden emplearse en las composiciones descritas en el presente documento se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª edición, Williams & Williams, (1995), "Physician's Desk Reference", 52ª edición, Medical Economics, Montvale, NJ (1998), y Kibbe, AH, Handbook of Pharmaceutical Excipients, tercera edición, American Pharmaceutical Association, Washington, DC, 2000,

[0099] Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por cualquier modo conveniente de administración. Como tal, la formulación puede variar. Por ejemplo, las composiciones pueden ser una inyección, por ejemplo, polvos o liofilizados que pueden reconstituirse con un solvente antes de su uso, así como preparadas para soluciones o suspensiones inyectables, composiciones secas insolubles para combinación con un vehículo antes de su uso, y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de la administración. Cuando las composiciones se emplean para inyecciones, los diluyentes para reconstituir composiciones sólidas antes de la inyección pueden incluir, pero no se limitan a, agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5% en agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada y cualquier combinación de los mismos. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una solución o suspensión líquida, jarabe, crema, pomada, tableta, cápsula, polvo, gel, matriz, supositorio o cualquier combinación de los mismos.

[0100] Las composiciones descritas en el presente documento pueden precargarse en una jeringa, un dispositivo de implantación, o similar, dependiendo del modo previsto de suministro y uso. En ciertas realizaciones, las composiciones están en forma de dosificación unitaria, de modo que una cantidad de la composición está lista en una dosis única, en una forma premedida o pre-ensvasada.

SISTEMAS PARA EVALUAR UNA O MÁS COMPOSICIONES DE NASP

[0101] También se describen los sistemas para practicar los métodos de la invención. Dichos sistemas incluyen una computadora que incluye un medio de almacenamiento legible por computadora que tiene un programa de

computadora almacenado en ella, donde el programa de computadora cuando se carga en una computadora opera la computadora para: recibir datos de actividad de coagulación, datos de composición química y datos de estructura molecular sobre una o más composiciones de NASP incluyen un procesador para evaluar los datos de actividad de coagulación introducidos, los datos de composición química y los datos de estructura molecular para determinar si una o más de las composiciones de NASP pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea.

[0102] El sistema puede incluir un módulo de entrada, un módulo de procesamiento y un módulo de salida. En algunas realizaciones, los sistemas en cuestión pueden incluir un módulo de entrada que está conectado a Internet de tal manera que los datos de las composiciones de NASP determinadas pueden ingresarse desde una ubicación remota. El módulo de procesamiento incluye memoria que tiene una pluralidad de instrucciones para evaluar la actividad de coagulación, composición química y estructura molecular NASP de una o más composiciones de NASP. El módulo de procesamiento también está configurado con un algoritmo para determinar si una o más de las composiciones de NASP pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre basado en la evaluación de los datos de actividad de la coagulación, los datos de composición química y la estructura molecular de NASP. Datos recibidos de un usuario. Por ejemplo, el procesador está configurado con memoria con instrucciones para realizar los pasos descritos anteriormente para evaluar si una o más composiciones de NASP pueden ser adecuadas o para detectar una pluralidad de composiciones de NASP.

[0103] Después de que el módulo de procesamiento haya evaluado la actividad de coagulación, la composición química y la estructura molecular de la una o más composiciones de NASP y haya determinado si una o más de las composiciones de NASP pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre, un módulo de salida comunica los resultados al usuario, por ejemplo, mostrándolos en un monitor o imprimiendo un informe.

[0104] Los sistemas en cuestión pueden incluir componentes de hardware y software, donde los componentes de hardware pueden tomar la forma de una o más plataformas, por ejemplo, en forma de servidores, de manera tal que los elementos funcionales, es decir, aquellos elementos del sistema que realizan tareas específicas (como la gestión de la entrada y la salida de información, el procesamiento de información, etc.) del sistema pueden llevarse a cabo mediante la ejecución de aplicaciones de software en una o más plataformas informáticas representadas en el sistema.

[0105] Los sistemas pueden incluir una pantalla y un dispositivo de entrada del operador. Los dispositivos de entrada del operador pueden ser, por ejemplo, un teclado, un mouse o similares. El módulo de procesamiento incluye un procesador que tiene acceso a una memoria que tiene instrucciones almacenadas en él para evaluar los datos ingresados sobre las composiciones de NASP y determinar si una o más de las composiciones de NASP pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre. El módulo de procesamiento puede incluir un sistema operativo, un controlador de interfaz gráfica de usuario (GUI), una memoria del sistema, dispositivos de almacenamiento de memoria y controladores de entrada-salida, memoria caché, una unidad de respaldo de datos y muchos otros dispositivos. El procesador puede ser un procesador disponible comercialmente o puede ser uno de los otros procesadores que están o estarán disponibles. El procesador ejecuta el sistema operativo y las interfaces del sistema operativo con el firmware y el hardware de una manera bien conocida, y facilitan al procesador la coordinación y ejecución de las funciones de varios programas de computadora que pueden estar escritos en una variedad de lenguajes de programación, como Java, Perl, C ++, otros lenguajes de alto o bajo nivel, así como combinaciones de los mismos, como se conoce en la técnica. El sistema operativo, típicamente en cooperación con el procesador, coordina y ejecuta las funciones de los otros componentes de la computadora. El sistema operativo también proporciona programación, control de entrada-salida, administración de archivos y datos, administración de memoria y control de comunicación y servicios relacionados, todo de acuerdo con las técnicas conocidas.

[0106] La memoria del sistema puede ser cualquiera de una variedad de dispositivos de almacenamiento de memoria conocidos o futuros. Los ejemplos incluyen cualquier memoria de acceso aleatorio (RAM) comúnmente disponible, un medio magnético como un disco duro o una cinta residentes, un medio óptico como un disco compacto de lectura y escritura, dispositivos de memoria flash u otro dispositivo de almacenamiento de memoria. El dispositivo de almacenamiento en memoria puede ser cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos o futuros, que incluyen una unidad de disco compacto, una unidad de cinta, una unidad de disco duro extraíble o una unidad de disquete. Estos tipos de dispositivos de almacenamiento de memoria normalmente leen y/o escriben en un medio de almacenamiento de programas (no se muestra) como, por ejemplo, un disco compacto, cinta magnética, disco duro extraíble o disquete. Cualquiera de estos medios de almacenamiento de programas, u otros actualmente en uso o que pueden desarrollarse más adelante, pueden considerarse un producto de programa de computadora. Como se apreciará, estos medios de almacenamiento de programas generalmente almacenan un programa de software de computadora y/o datos. Los programas de software, también llamados lógica de control de computadora, generalmente se almacenan en la memoria del sistema y/o el dispositivo de almacenamiento de programas que se usa junto con el dispositivo de almacenamiento de memoria.

[0107] En algunas realizaciones, se describe un producto de programa informático que comprende un medio utilizable por ordenador que tiene una lógica de control (programa de software informático, incluido el código de programa)

almacenado en él. La lógica de control, cuando es ejecutada por el procesador de la computadora, hace que el procesador realice las funciones descritas en este documento. En otras realizaciones, algunas funciones se implementan principalmente en hardware utilizando, por ejemplo, una máquina de estado de hardware. La implementación de la máquina de estado de hardware para realizar las funciones descritas en este documento será evidente para los expertos en las técnicas relevantes.

[0108] La memoria puede ser cualquier dispositivo adecuado en el que el procesador pueda almacenar y recuperar datos, tales como dispositivos de almacenamiento de estado sólido, magnéticos o ópticos (incluidos discos magnéticos u ópticos o cinta o RAM, o cualquier otro dispositivo adecuado, ya sea fijo o portátil). El procesador puede incluir un microprocesador digital de propósito general adecuadamente programado desde un medio legible por computadora que contenga el código de programa necesario. La programación puede proporcionarse de forma remota al procesador a través de un canal de comunicación, o guardarse previamente en un producto de programa informático como la memoria o algún otro medio de almacenamiento legible por computadora portátil o fijo que use cualquiera de esos dispositivos en conexión con la memoria. Por ejemplo, un disco magnético u óptico puede llevar la programación, y puede ser leído por un escritor/lector de discos. Los sistemas también pueden incluir programación, por ejemplo, en forma de productos de programas informáticos, algoritmos para usar en la práctica de los métodos descritos anteriormente. La programación se puede grabar en medios legibles por computadora, por ejemplo, cualquier medio que pueda leerse y accederse directamente por una computadora. Tales medios incluyen, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnético, como disquetes, medio de almacenamiento en disco duro y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico tales como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.

[0109] El procesador también puede tener acceso a un canal de comunicación para comunicarse con un usuario en una ubicación remota. Por ubicación remota se entiende que el usuario no está directamente en contacto con el sistema y transmite información de entrada a un administrador de entrada desde un dispositivo externo, como una computadora conectada a una red de área amplia ("WAN"), red telefónica, red satelital o cualquier otro canal de comunicación adecuado, incluido un teléfono móvil (es decir, un teléfono inteligente). En estas realizaciones, el administrador de entrada recibe información, por ejemplo, datos de actividad de coagulación, datos de composición química, datos de estructura molecular, etc., de un usuario, por ejemplo, a través de Internet, teléfono o red de satélite. El administrador de entrada procesa y reenvía esta información al módulo de procesamiento. Estas funciones se realizan utilizando cualquier técnica conveniente.

[0110] Los controladores de salida pueden incluir controladores para cualquiera de una variedad de dispositivos de visualización conocidos para presentar información a un usuario, ya sea un ser humano o una máquina, ya sea local o remoto. Si uno de los dispositivos de visualización proporciona información visual, esta información generalmente se puede organizar lógicamente y/o físicamente como una matriz de elementos de imagen. Un controlador de interfaz gráfica de usuario (GUI) puede incluir cualquiera de una variedad de programas de software conocidos o futuros para proporcionar interfaces gráficas de entrada y salida entre el sistema y un usuario, y para procesar entradas de usuario. Los elementos funcionales de la computadora pueden comunicarse entre sí a través del bus del sistema. Algunas de estas comunicaciones pueden llevarse a cabo en realizaciones alternativas utilizando la red u otros tipos de comunicaciones remotas. El administrador de salida también puede proporcionar información generada por el módulo de procesamiento (por ejemplo, la identidad de una o más composiciones de NASP que pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación) a un usuario en una ubicación remota, por ejemplo, a través de Internet, red telefónica o satelital, de acuerdo con técnicas conocidas. La presentación de datos por parte del administrador de salida puede implementarse de acuerdo con una variedad de técnicas conocidas. Como algunos ejemplos, los datos pueden incluir documentos SQL, HTML o XML, correo electrónico u otros archivos, o datos en otras formas. Los datos pueden incluir direcciones URL de Internet para que un usuario pueda recuperar SQL, HTML, XML u otros documentos o datos adicionales de fuentes remotas. Una o más plataformas presentes en los sistemas en cuestión pueden ser cualquier tipo de plataforma de computadora conocida o un tipo que se desarrollará en el futuro, aunque típicamente serán de una clase de computadora comúnmente conocida como servidores. Sin embargo, también pueden ser una computadora central, una estación de trabajo u otro tipo de computadora. Pueden conectarse a través de cualquier tipo de cableado conocido o futuro u otro sistema de comunicación, incluidos los sistemas inalámbricos, ya sea en red o de otra manera. Pueden estar colocados o separados físicamente. Se pueden emplear diversos sistemas operativos en cualquiera de las plataformas de computadora, posiblemente dependiendo del tipo y/o marca de la plataforma de computadora elegida. Los sistemas operativos apropiados incluyen Windows NT®, Windows XP, Windows 7, Sun Solaris, Linux, OS/400, Compaq Tru64 Unix, SGI IRIX, Siemens Reliant Unix y otros.

[0111] Durante el uso, un usuario ingresa información sobre la actividad de coagulación, la composición química y la estructura molecular de una o más composiciones de NASP que usan los dispositivos de entrada del sistema, según lo determinan los métodos descritos en detalle anteriormente. El módulo de procesamiento está configurado para evaluar los datos de actividad de coagulación, datos de composición química y datos de estructura molecular de las composiciones de NASP y determinar si una o más composiciones de NASP son adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre. Los sistemas descritos en este documento pueden detectar una pluralidad de composiciones de NASP, como al comparar y clasificar las composiciones de NASP, como se describe anteriormente, o los sistemas pueden evaluar una o más composiciones de NASP y determinar si cada composición de NASP es adecuada utilizando el método de las características deseadas.

5 [0112] En ciertas realizaciones, el módulo de procesamiento también está configurado para incluir un administrador de personalización de datos. El administrador de personalización de datos es un elemento funcional que le permite al usuario ingresar varios parámetros para evaluar los datos de actividad de coagulación, datos de composición química y datos de estructura molecular de NASP. Además, el administrador de personalización de datos también está configurado para que un usuario pueda ingresar o cambiar los criterios utilizados para determinar si una composición de NASP es adecuada para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre. Por ejemplo, al usar el administrador de personalización de datos, un usuario puede personalizar qué características de los datos de composición de NASP tienen un mayor peso en la determinación de la idoneidad de una composición de NASP. De esta manera, el administrador de personalización de datos es un elemento funcional que le permite al usuario personalizar el protocolo de evaluación utilizado para determinar si una composición NASP es adecuada para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación.

15 [0113] En ciertas realizaciones, el módulo de procesamiento también está configurado para incluir un administrador de información de entrada. El administrador de información de entrada proporciona información a un usuario con respecto a los criterios empleados por el procesador para determinar si una NASP es adecuada para tratar a un sujeto con un trastorno de coagulación de la sangre. Por ejemplo, el administrador de información de entrada proporciona un historial de información de entrada a un usuario a petición del usuario. La información de entrada puede estar en forma de un compendio de datos de actividad de coagulación, datos de composición química y datos de estructura molecular para composiciones NASP particulares, así como parámetros utilizados para determinar si es adecuado para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea y puede organizarse temporalmente o según algún otro criterio, etc. Como tal, el administrador de información de entrada proporciona al usuario la capacidad de volver sobre los pasos empleados en el diseño de un protocolo para determinar la idoneidad de la composición de NASP, de modo que el conocimiento de los datos que se incluyó en el desarrollo del protocolo puede ser fácilmente obtenido y utilizado.

25 [0114] En ciertas realizaciones, el módulo de procesamiento está configurado para incluir un administrador de comparación de composición NASP. El administrador de comparación es un elemento funcional que está configurado para comparar una o más composiciones de NASP entre sí o con una base de datos de composiciones de NASP. Al comparar una composición NASP dada entre sí o con una base de datos de la composición NASP, el administrador de comparación puede buscar composiciones NASP similares en la base de datos, y permitir al usuario comparar visualmente los datos de actividad de coagulación, datos de composición química y datos de estructura molecular NASP de la composición NASP del sujeto con una pluralidad de composiciones NASP en la base de datos. El administrador de comparación también puede comparar la composición de NASP del sujeto con la base de datos de composiciones de NASP e identificar, con base en esta comparación, las características de por qué la composición de NASP puede o no ser adecuada para tratar a un sujeto con un trastorno de coagulación en comparación con los de la composición.

35 [0115] En ciertas realizaciones, el módulo de procesamiento del sistema está configurado además para incluir un administrador de colaboración configurado para permitir que al menos dos usuarios diferentes proporcionen datos de forma conjunta sobre una o más composiciones de NASP.

40 [0116] Al usar los sistemas en cuestión, un usuario ingresa la actividad de coagulación, composición química y estructura molecular NASP (tal como se determina por los métodos descritos anteriormente) en el módulo de entrada del sistema, por ejemplo, a través de una computadora de usuario. En ciertas realizaciones, el sistema toma la información proporcionada y genera un informe que identifica una o más composiciones de NASP que pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea. El informe se reenvía al usuario, por ejemplo, a través de la pantalla de salida o se imprime. En algunos casos, el informe y la actividad de coagulación, la composición química y los datos de estructura molecular utilizados para generar el informe se almacenan en el sistema en un elemento de memoria adecuado, donde se puede acceder a la información almacenada en un momento posterior, como para comparar cGon otra composición de NASP.

50 [0117] Los sistemas descritos en el presente documento pueden incluir además un administrador de salida que genera un informe basado en la información recibida de uno o más usuarios, por ejemplo, actividad de coagulación, composición química o información de estructura molecular. El administrador de salida es un elemento funcional que produce un informe en respuesta a recibir información y determinar si una o más composiciones de NASP son adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre.

UTILIDAD

60 [0118] Los métodos del sujeto encuentran uso en cualquier situación en la que exista el deseo de identificar una o más composiciones que puedan mejorar la coagulación de la sangre en un sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos del sujeto se pueden emplear para identificar una o más composiciones para tratar trastornos hemorrágicos, tales como un trastorno hemorrágico crónico o agudo, un trastorno de coagulación congénita causado por una deficiencia del factor sanguíneo, un trastorno de coagulación adquirido y la administración de un anticoagulante. La invención proporciona un método para seleccionar una pluralidad de composiciones y comparar características de las composiciones para determinar si una o más de las composiciones pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea. Los trastornos hemorrágicos pueden incluir, entre otros, hemofilia A,

hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto, como Factor XI, Factor XII, precalicreína y quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragia clínicamente significativa, como el factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, que incluye afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa2-antiplasmina y sangrado excesivo como el causado por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo.

[0119] Los métodos del sujeto también encuentran uso en la identificación de composiciones que pueden ser adecuadas para mejorar la coagulación de la sangre para tratar un trastorno de coagulación congénita o un trastorno de la coagulación adquirida causada por una deficiencia de factor sanguíneo. La deficiencia del factor sanguíneo puede ser causada por deficiencias de uno o más factores, incluidos, entre otros, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, factor XIII y factor de von Willebrand.

EXPERIMENTAL

[0120] Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

[0121] Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p.ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se deben permitir algunos errores experimentales y desviaciones.

Materiales y métodos

Fucoidanos y otros reactivos

[0122] Se evaluaron lotes de fucoidano de cuatro especies diferentes de algas pardas: *Laminaria japonica* (Lj.) (Baxter Innovations GmbH, Austria); y *Fucus vesiculosus* (Fv), *Undaria pinnatifida* (Up) y *Ecklonia maxima* (Em) (Marinova, Australia). Los productos químicos y los reactivos fueron todos de grado analítico.

Ensayos de coagulación

Trombografía automatizada calibrada (TAC)

[0123] La actividad procoagulante de los fucoidanos se monitorizó mediante trombografía automatizada calibrada (CAT) como se describe por Hemker et al. (Pathophysiol. Haemost. Thromb. 33: pp. 4-15). Como modelo para la deficiencia de FVIII mediada por anticuerpos, se incubó un grupo de plasma humano normal (George King Biomedical, Overland Park, KS) con plasma de anti-FVIII humano criado en cabra (Baxter Bioscience, Austria). Un proceso de inactivación por calor optimizado aseguró que los factores de coagulación de la cabra en el plasma del inhibidor estuvieran inactivos. La concentración final del inhibidor en el plasma fue de 50 unidades de Bethesda (BU/mL), que se determinó experimentalmente para bloquear completamente la actividad del FVIII. Para la inhibición específica del factor XIIa, los plasmas se mezclaron con el inhibidor de la tripsina del maíz (CTI) (Hematologic Technologies, Inc., Essex Junction, VT, EE.UU.). Proporcionando una concentración final de CTI de 40 µg/ml. A cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Immulon 2HB, fondo en U; Thermo Electron), se agregaron 80 µl de muestra de plasma precalentado (37°C). Se añadió un intervalo de 0,02 a 300 µg/ml de cada preparación de fucoidano al plasma (10 ml). La generación de trombina se monitorizó a 37°C en un lector Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia) utilizando reactivos FluCa y PPP (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos). La generación de trombina se desencadenó mediante factor tisular 1 pM y fosfolípidos 4 µM y se inició dispensando 20 µl de reactivo FluCa (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos) que contenía sustrato fluorogénico y solución de CaCl₂ tamponada con HEPES (100 µM) en cada pocillo. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un lector Fluoroskan Ascent® (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia; filtros de excitación de 390 nm y emisión de 460 nm) a 37°C. Todas las muestras se analizaron por duplicado y en al menos dos ensayos independientes.

[0124] Los parámetros de las curvas de generación de trombina resultantes se calcularon utilizando el software Thrombinoscope™ (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos). Con el calibrador de trombina como referencia, se derivó la concentración molar de trombina en los pocillos de prueba. Las cantidades de trombina en el pico de cada curva de generación de trombina (pico de trombina, nM), tiempo de retardo (intervalo de tiempo entre el inicio de la medición y el inicio de la generación de trombina), tiempo máximo (intervalo de tiempo entre el inicio de la medición y el máximo de trombina) y potencial de trombina endógeno (área bajo la curva de la concentración de trombina en función del tiempo) se registraron. El efecto procoagulante se evaluó trazando el pico de trombina contra la concentración dentro de la parte inclinada del perfil. La CE₅₀ se derivó utilizando el software SigmaPlot 12 de la curva sigmoidal resultante.

[0125] Para evaluar la activación por contacto de los fucoidanos, los ensayos de CAT se realizaron en un grupo de plasma humano normal como se describe anteriormente con y sin CTI.

TFPI - Ensayo de tiempo de protrombina diluida (TFPI-dPT)

5 **[0126]** Se usó un ensayo de dPT con TFPI añadido (TFPI-dPT) para demostrar el efecto inhibitor de TFPI de las NASP en plasma humano normal (George King Biomedical). Las muestras de plasma se incubaron previamente con 0,5 µg/ml de TFPI de longitud completa (aa 1-276, producidas de forma constitutiva por las células SKHep1) y muestras de NASP (0,03 - 10 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

10 **[0127]** La inhibición de TFPI se ensayó utilizando el reactivo de factor tisular TriniClot PT Excel S (Trinity Biotech), que se diluyó en solución salina tamponada con Hepes 1:666 con BSA al 0,5% se añadió a las muestras de plasma en un analizador de hemostasis ACL Pro Elite. La coagulación se inició con CaCl₂ 25 mM. La relación de volumen de plasma: TF: CaCl₂ fue 1:1:1, el trazado del tiempo de coagulación contra el registro de la concentración de fucoidano dio lugar a una curva sigmoidal. La CE₅₀ se derivó utilizando el software SigmaPlot 12 del gráfico.

15 Ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT)

[0128] El ensayo aPTT se realizó como se describe en Liu, et al. (Thromb. Haemost. 95: pp. 68-76). Brevemente, se mezclaron 50 µl de plasma humano normal descongelado (George King Biomedical, Overland Park, KS) con 5 µl de muestra de fucoidano (0-60 µg/ml concentración plasmática final). Los fucoianos se diluyeron en tampón de imidazol (3,4 g/L de imidazol; 5,85 g/L de NaCl, pH 7,4) que contenía albúmina al 1% (Baxter, Austria). Después de la adición de 50 µl de reactivo aPTT (STA APTT, Roche), las muestras se incubaron durante 4 minutos a 37°C. La coagulación se inició con 50 µl de una solución de CaCl₂ 25 mM (Baxter, Austria) y se registró durante hasta 5 minutos. Todos los pasos de pipeteo y las mediciones del tiempo de coagulación se llevaron a cabo con un instrumento ACL Pro Elite (Laboratorio de Instrumentación, Bedford, MA). Las muestras se analizaron por duplicado. El aPTT se representó en función de la concentración de NASP y la concentración a la que se informó un aumento del 50% en el tiempo de coagulación con respecto al inicio.

Ensayo de tiempo de protrombina diluida (dPT)

30 **[0129]** Un ensayo de dPT para uso en el presente documento es un ensayo clínico de PT estándar modificado. Los métodos de detalles para el ensayo dPT pueden encontrarse en Nordfang et al. (1991) Thromb Haemost 66: 464-467; Welsch et al. (1991) Thrombosis Research 64: 213-222, Se puede usar un ensayo de tiempo de protrombina diluida con inhibidor de la vía del factor tisular agregado (TFPI-dPT) para demostrar el efecto inhibitor de TFPI del fucoidano BAX513 en el plasma de pacientes hemofílicos (George King Biomedical). Las muestras de plasma se preincuban con 0,3 µg/ml de TFPI de longitud completa (aa 1-276, producida de forma constitutiva por SKHep1) y BAX513 (0,03-1 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El reactivo TF TriniClot PT Excel S (Trinity Biotech), diluido en solución salina tamponada con Hepes 1:400 con BSA al 0,5% se agrega a las muestras de plasma en un analizador de hemostasia ACL Pro Elite (Laboratorio de Instrumentación). La coagulación se inicia con CaCl₂ 25 mM. La relación de volumen de plasma: TF: CaCl₂ fue 1:1:1, El tiempo para la coagulación plasmática se mide con un analizador de hemostasia ProLite de ACL. Para el análisis de datos, TFPI-dPT se grafica contra la concentración logarítmica. Los valores de concentraciones efectivas medias máximas (CE₅₀) se determinan utilizando un ajuste de curva sigmoidal.

Estudios de interacción de resonancia de plasmón superficial

45 **[0130]** Se realizaron experimentos de resonancia de plasmón de superficie (Biacore T200, GE Healthcare) para estudiar la interacción de fucoianos seleccionados con TFPI de longitud completa humana (aa 1 - 276) y una proteína TFPI 1-160 truncada. fl-TFPI (TFPI de longitud completa) se acopló covalentemente a un chip CM5 (GE Healthcare) usando química de acoplamiento de amina a pH 5,0 (acetato de sodio 10 mM) dando como resultado la inmovilización de 1000 unidades de respuesta (RU) para fl-TFPI. Para el análisis cinético, las superficies se equilibraron a un caudal de 30 µl/minuto con tampón HBS-N (HEPES 0,01 M, pH 7,4; NaCl 0,15 M, GE Healthcare) a la que se añadió Tween-80 al 0,1% (Merck). Después de 60 segundos, se inyectaron muestras de fucoidano (0,1 - 50 µg/ml) disueltas en tampón de equilibrio durante 360 segundos seguidos de un tiempo de disociación de 600 s. El chip se regeneró inyectando 22,5 µl de NaCl 2,5 M seguido de 15 µl de NaOH 10 mM, NaCl 1 M. El caudal se mantuvo a 30 µl/min. Cada sensorgram fue referenciado contra el tampón y la célula en blanco. La evaluación se realizó en el software de evaluación Biacore T200, El procedimiento para la unión de fucoidano/TFPI1-160 se llevó a cabo de la misma manera.

Estructura molecular

Fraccionamiento de carga

60 **[0131]** El fucoidano F.v. se fraccionó mediante un sistema GE Healthcare LC, ÄKTA Purifier 100 con una columna DEAE (dietilaminoetil) Sefarosa F. F. (5 x 22 cm, volumen de columna, 431 ml). Los disolventes A y B fueron agua Milli-Q y NaCl₂M. Se aplicó un gradiente lineal para 16 volúmenes de columna a un caudal de 49 ml/min. El eluido recogido se cuantificó para determinar el contenido de carbohidratos fuera de línea con un ensayo de ácido fenol-sulfúrico.

65

Fraccionamiento de tamaño.

[0132] El fucoidano de *F.v.* se fraccionó usando ultrafiltración con membranas de diferentes tamaños de corte. Se obtuvieron y analizaron fracciones con diferentes rangos de Mw.

Ensayo de ácido fenol-sulfúrico

[0133] Los ensayos de ácido fenol-sulfúrico se llevaron a cabo en un tubo de vidrio. A 200 μ l (pequeña escala)/300 μ l (gran escala) de eluato, se agregaron 100 μ l de fenol acuoso al 5% (p/v) seguido de 1 μ l de ácido sulfúrico concentrado. Las reacciones se incubaron a 100°C en un horno durante 10 minutos. Una vez que las soluciones reaccionadas se enfriaron a temperatura ambiente, se transfirieron a una placa de 96 pocillos (200 μ l en cada célula) y se midió la absorbancia a 490 nm con un lector de placas. Los cromatogramas se generaron representando la absorbancia en función del tiempo de retención o del número de tubos.

Análisis de gel de agarosa

[0134] Los fucoidanos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se usó una célula Bio-Rad Mini-Sub para moldear el gel. Se aplicaron muestras (10-20 mg de cada una) a un gel de agarosa al 0,5% en un tampón de acetato de bario 0,04 M (pH 5,3) y se corrieron durante 2 horas a 100 mA en 0,05 M 1, 3-diaminopropano-acetato (pH ajustado a 9,0 con ácido acético). El gel se tiñó en solución acuosa de Alcian Blue durante 30 minutos y se destiñó en agua Milli-Q durante la noche para limpiar el fondo.

Determinación de peso molecular promedio (Mw) y polidispersidad (poliD) utilizando cromatografía de exclusión por tamaño y dispersión de luz láser de múltiples ángulos (SEC-MALLS)

[0135] Se usó un sistema de HPLC Agilent acoplado con los detectores DAAT HELEOS, QELS (dispersión de luz cuasi elástica) de Wyatt Technology y Optilab rEX de índice de refracción diferencial (DRI) para medir el peso molecular y las polidispersidades de diferentes fucoidanos. Cada fucoidano (aproximadamente 5 mg de sólido) se disolvió en 250 μ l de fase móvil PBS, y se inyectó 50 μ l en una columna, Superdex 200 (10 mm/300 mm, GE Healthcare, Piscataway, NJ). El cambio en el índice de refracción/cambio en la concentración (dn/dc) valor (0,113 ml/g) se determinó en una muestra de *F.v.* fucoidano. Este valor se utilizó para calcular el peso molecular de todas las muestras de NASP.

Análisis de monosacáridos mediante el intercambio de aniones de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAE-PAD)

[0136] Cada muestra se hidrolizó a monosacáridos utilizando ácido trifluoroacético 2 M (TFA) en una concentración de 2 μ g/ml a 100°C durante 5 h. El exceso de TFA en cada muestra se eliminó secando la muestra en una centrifuga de vacío y los hidrolizados se secaron utilizando un concentrador SpeedVac. El hidrosilato seco se volvió a disolver en el mismo volumen de agua y el pH se ajustó a neutro con NaOH diluido después de que se volvió a disolver en el mismo volumen de agua.

[0137] Se usó un sistema Dionex ICS 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA) equipado con detector amperométrico pulsado, columna protectora Dboex CarboPac® PA10 (2X50 mm) y columna analítica Dionex CarboPac® PA1 (4X250 mm) para analizar su monosacárido composiciones. Se realizó un gradiente isocrático de NaOH 15 mM (0-10 minutos) a 1 ml/min para separar primero los azúcares neutros, seguido de un gradiente de NaOAc (0-200 mM) con NaOH fijo 15 mM (10-40 minutos) para separar el ácido azúcares. El volumen de inyección fue de aproximadamente 25 μ l. La temperatura de la columna fue de 30°C. La forma de onda del PAD fue el programa predeterminado de Dionex para los carbohidratos. El sistema HPAE-PAD fue controlado por el software Chromeleon (versión 6,80). Se usaron siete monosacáridos como estándares: glucosa, galactosa, manosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y fucosa (Sigma, St. Louis, MO).

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

[0138] Se usó un espectrómetro de RMN Bruker Avance III que funcionaba a una frecuencia 1H de 600 MHz con una sonda criogénica $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ doble para adquirir los espectros cuantitativos de ^{13}C -RMN. Aproximadamente 20 mg de cada fucoidano se disolvieron en 0,6 ml de D_2O con 0,02% de sodio deuterio-3-trimetilsililprionato (TMS⁺) (Cambridge Isotope Lab., Andover, MA) y se transfirieron a tubos de RMN. El retraso de la relajación para ^{13}C RMN se optimizó para obtener datos cuantitativos. Los espectros ^{13}C -RMN con retrasos de relajación de 1s, 2s, 5s, 10s, 30s y 60s, se adquirieron en la muestra *L.j.* fucoidano, para determinar un tiempo de retardo adecuado para la relajación completa de los grupos carbonilo. Para evitar la mejora de Överhauser nuclear (NOE) de todas las señales en los espectros de ^{13}C -RMN, el desacoplador se activó solo durante el tiempo de adquisición de datos. Se utilizaron demoras de reciclaje de 5 s y un tiempo de adquisición de 0,1 s para la relajación completa de los grupos carbonilo y para evitar el aumento de NOE de todas las señales en los espectros de ^{13}C -RMN. Los espectros se procesaron utilizando el software Topspin 2,1 (Bruker, Alemania).

[0139] Se disolvieron aproximadamente 20 mg de cada NASP en 0,6 ml de D₂O con 0,02% de sodio deuterio-3-trimetilsililprionato (TMSP) (Cambridge Isotope Lab., Andover, MA) como referencia de cambio químico. ¹H-RMN espectros de ¹³C RMN, bidimensionales (2D) 1H-1H espectroscopia de correlación (COSY), ¹H-¹³C multiplicidad sensible a la fase editada Heteronuclear Quantum Single Correlation (HSQC), ¹H-¹³C magnitud modo Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) y los espectros 3D HSQC-TOCSY se adquirieron y procesaron utilizando el software Topspin 3,0 (Bruker Biospin Corporation, Billerica, MA).

Sobresulfatación de los NASP

[0140] Las reacciones de sobresulfatación se llevaron a cabo en un fucoidano que tenía un MW de aproximadamente 50 kDa. El fucoidano (0,2 g) se agitó en 4 ml de DMF y 6 ml de piridina a 90°C durante 30 minutos. Se agregaron diferentes cantidades (1,4 y 0,4 g) de reactivo de sulfatación (complejo de trióxido de azufre-piridina) para producir fucoidanos con dos niveles de sobre sulfatación. Para cada preparación, correspondiente a los grados de sobresulfatación más altos y más bajos, la mezcla se agitó a 90°C durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró para obtener un sólido blanco. Este sólido se disolvió en 10 ml de solución saturada de NaHCO₃. El sólido seco fue desalado y liofilizado.

Desulfatación de NASPs

[0141] Una mezcla de DMSO (45 ml) y tolueno (15 ml) se sometió a reflujo en condiciones de Dean Stark hasta que se eliminaron 15 ml de la solución. La solución se enfrió a 120°C y se agregaron 1,0 g de fucoidano. Después de 5 minutos, se añadieron 2,5 ml de piridina, 0,75 g de ácido piromelítico y 0,5 g de NaF. Luego, se agregaron 5 mL de piridina adicional. La reacción se llevó a cabo a 120°C bajo argón. Para obtener diferentes grados de desulfatación, se extrajeron dos alícuotas de la mezcla a las 1 y 2 horas. Cuando las partes alícuotas se enfriaron a temperatura ambiente, se agregaron 40 ml de EtOAc a cada parte alícuota y se mantuvieron a 5 - 8°C durante 2 horas. Cada alícuota se filtró y el sólido blanco producido se lavó con EtOAc (5 ml). El sólido blanco se disolvió en agua desionizada (10 ml) y se añadió a 1,5 ml de NaHCO₃ saturado. La solución se desalificó y se liofilizó para producir el fucoidano desulfatado final.

Composición química

Análisis elemental

Análisis de plasma acoplado inductivamente (ICP)

[0142] Se realizó una combinación de análisis de espectrometría de masas (MS) y espectroscopia de emisión atómica (AES) para obtener el perfil elemental de los diferentes fucodanos. Los análisis de ICP-MS se realizaron utilizando un ICP-MS 2 de Thermo Scientific X-Series 2 configurado con nebulizador de micro flujo PFA-ST y cámara de rociado de perlas de impacto de vidrio. El instrumento fue operado con y sin la célula de colisión (gas de célula de colisión de hidrógeno/helio al 7%). El escandio y el indio se utilizaron como estándares internos para los análisis ICP-MS. Los análisis de ICP-AES se realizaron utilizando un sistema radial de Varian ICP-AES. La solución de prueba para ICP-AES se mezcló en línea con una solución que contenía 2 ppm de itrio como patrón interno y 2% de cloruro de cesio como supresor de la ionización. Los instrumentos se estandarizaron utilizando las soluciones estándar de inventario rastreables por NIST (High Purity Standards, Inc y Inorganic Ventures).

[0143] Las muestras se prepararon al 0,5% (p/v, 0,1 g de muestra en 20 ml de solución) en aqua regia al 5% (HCl/HNO₃) para análisis. Muestras de prueba representativas se complementaron con los elementos de destino. La recuperación analítica de cada elemento se calculó y comparó con un criterio de aceptación de 100 ± 30%. La cantidad más baja determinable (LQD) se estableció como diez veces la desviación estándar de la respuesta en blanco para cada elemento. La respuesta estándar calificada más baja se utilizó como límite de informe para cada elemento.

Análisis adicionales de C, N, H y S

[0144] El analizador de PE 2400 CHN se usó para las mediciones de C, H y N. El azufre se analizó mediante valoración colorimétrica.

Ejemplo 1

Actividad de coagulación

[0145] La actividad biológica se ensayó utilizando candidatos de fucoidano para determinar candidatos adecuados para el desarrollo de un nuevo tratamiento para sujetos con trastornos de la coagulación de la sangre. Los fucoidanos exhiben actividad procoagulante al inhibir el TFPI y al acelerar la formación de FVa dependiente de trombina. Los fucoidanos ensayados mostraron una inhibición del TFPI de longitud completa. Los fucoidanos también demostraron cierta actividad anticoagulante. La potenciación de los inhibidores de la trombina antitrombina III y/o cofactor de heparina II se ha descrito como un mecanismo anticoagulante. La activación del sistema de contacto y la generación

subsiguiente de bradiquina también se observó en algunos fucoidanos. La ventana procoagulante de los fucoidanos analizados se encontraba dentro del rango de concentración de cuatro magnitudes ($\geq 0,1 - 100 \mu\text{g/ml}$, como se muestra en la Figura 2). Además, estos fucoidanos aumentan la generación de trombina en plasma normal, demostrando una actividad procoagulante independiente de los factores hemofílicos. Para seleccionar al candidato a NASP con la más alta calidad, se evaluaron y compararon todas las actividades procoagulantes y anticoagulantes. Dos candidatos, *L.j.* y *F.v.* fucoidano exhibieron actividad procoagulante alta y anticoagulante baja (Figuras 2 y 3 y Tabla 7); *E.m.* fucoidano tiene una actividad procoagulante que difiere de los otros tres fucoidanos con una mejora de la generación de trombina hasta dos veces superior al nivel normal 1; *U.p.* fucoidano tiene una mayor actividad anticoagulante. *L.j.* y *E.m.* fucoidanos activan la vía de contacto en concentraciones $>5 \mu\text{g/ml}$ (ver Figuras 4a-j). *U.p.* y *F.v.* fucoidano no activaron la vía de contacto hasta una concentración 30 veces mayor que sus valores óptimos de procoagulante.

Actividad procoagulante

[0146] Varios fucoidanos ensayados mostraron una mejora en los parámetros de coagulación a través de la vía extrínseca de la coagulación mediante la inhibición de TFPI. Para identificar si un fucoidano puede ser adecuado para tratar a un sujeto con un trastorno de la coagulación de la sangre, los fucoidanos de cuatro especies diferentes: *L. j.*, *U. p.*, *E. m.* y *F. v.* (Figura 1) se evaluaron para sus actividades procoagulantes y anticoagulantes. Primero, sus actividades pro y anticoagulantes en plasma inhibido por FVIII se evaluaron mediante trombografía automática calibrada (CAT). La generación de trombina dependiente de la concentración de los candidatos a fucoidano se muestra en la Figura 2. Todos los fucoidanos analizados pudieron corregir la coagulación del plasma hemofílico a niveles normales a aproximadamente $1 \mu\text{g/ml}$. Aunque la actividad procoagulante disminuye a concentraciones superiores a $10 \mu\text{g/ml}$, todavía supera los efectos anticoagulantes. Un fucoidano extraído de *E. m.* alcanzó un nivel de generación de trombina del doble del nivel plasmático normal. Los niveles medio máximos (valores de CE_{50} en la Tabla 7) variaron de $0,2$ a $0,8 \mu\text{g/ml}$ dependiendo de la fuente biológica (es decir, especies de algas). Todas las NASP fueron igualmente capaces de mejorar los parámetros de coagulación de la sangre total inhibida por FVIII, como se demostró mediante el análisis de la tromboelastometría de rotación (ROTEM) (datos no presentados).

[0147] Las Figuras 2a-2d muestran los efectos de los fucoidanos de cuatro especies diferentes de algas pardas en la generación de trombina. La coagulación del plasma humano se desencadenó con 1 pM de factor tisular en el ensayo CAT en presencia de $0-300 \mu\text{g/ml}$ de fucoidano. La Figura 2a muestra los perfiles de generación de trombina de *L.j.* fucoidano; La Figura 2b es fucoidano arriba; La Figura 2c es *E.m.* fucoidano y la Figura 2d es *F.v.* fucoidano. Se muestran los picos de trombina (nM, círculos negros) y el tiempo máximo (min, triángulos blancos). Todos los fucoidanos tuvieron un efecto dependiente de la concentración en la generación de trombina y pudieron corregir la coagulación del plasma inhibido por FVIII (línea negra inferior) a niveles normales (línea negra superior) a alrededor de $\sim 1 \mu\text{g/ml}$.

[0148] Con el fin de identificar si las NASP que tienen ciertas densidades de carga y el grado de características de sulfatación pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación sanguínea, las NASP obtenidas por fraccionamiento de la carga de muestras de fucoidano *F.v.* utilizando la cromatografía de intercambio iónico DEAE se examinaron para determinar su actividad procoagulante. La actividad procoagulante para las fracciones C2 - C6 se determinó usando las condiciones de ensayo descritas anteriormente. En el ensayo CAT, las fracciones C2-C6 mostraron un efecto procoagulante entre aproximadamente $0,05$ y $10 \mu\text{g/ml}$, y las CE_{50} para la actividad procoagulante para las fracciones C2-C6 fueron aproximadamente $0,2 \mu\text{g/ml}$. La Tabla 1 resume la actividad procoagulante de NASP obtenida por fraccionamiento de carga de muestras de fucoidano *F.v.*

Tabla 1. Grado de sulfatación y actividad procoagulante de los NASP de fracciones separadas por carga de *F.v.* fucoidano

Fracciones	Grado de sulfatación	CAT CE_{50} (mg/mL)
C1	0,28	$1,3 \pm 0,48$
C2	0,49	$0,2 \pm 0,02$
C3	0,72	$0,2 \pm 0,04$
C4	0,72	$0,2 \pm 0,08$
C5	0,8	$0,2 \pm 0,01$
C6	0,8	$0,2 \pm 0,09$
<i>F.v.</i> Fucoidano	0,6	$0,1 \pm 0,04$

[0149] Con el fin de identificar si las NASP que tienen ciertos pesos moleculares y el grado de polimerización pueden ser adecuados para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación sanguínea, las NASP obtenidas mediante fraccionamiento separado por tamaño de muestras de fucoidano *F.v.* usando ultrafiltración se seleccionaron para su actividad procoagulante. Los resultados del TAC se muestran en la Figura 5a y se resumen en la Tabla 2. La relación de la actividad procoagulante de peso molecular de las NASP se muestra en la Figura 5c. Se determinó que la actividad procoagulante estaba relacionada con el peso molecular. En este ejemplo, un peso molecular igual o

superior a 15 kDa mostró una actividad elevada, mientras que la actividad procoagulante de las NASP con un peso molecular inferior a 15 kDa fue significativamente menor. El grado de polimerización se calculó a partir de los MW y el grado de sulfatación. En este ejemplo, un grado de polimerización de al menos 70 mostró una alta actividad, mientras que la actividad procoagulante de las NASP con un grado de polimerización por debajo de aproximadamente 70 fue significativamente menor.

Tabla 2. Peso molecular, grado de polimerización y actividad procoagulante de fracciones separadas por tamaño de *F.v.* fucoidano

Número de fracción	Peso molecular (kDa)	Grado de polimerización	CAT CE ₅₀ (mg/mL)
S1	174	840	0,3 ± 0,07
S2	124	590	0,3 ± 0,02
S3	40	200	0,6 ± 0,06
S4	15	70	0,7 ± 0,11
S5	10	50	1,8 ± 0,22
S6	8	40	3,0 ± 0,26

[0150] Los fucoidanos *F.v.* desulfatados y sobresulfatados también se usaron para investigar el impacto de la densidad de carga y el grado de sulfatación en la actividad procoagulante. En el ensayo CAT, la actividad procoagulante de los fucoidanos químicamente sulfatados mostró una dependencia aproximada de la densidad de carga. Como se muestra en la Tabla 3 y en las Figuras 6a y 6c, la actividad procoagulante disminuye a medida que el grado de polimerización disminuye de 1,3 a 0,4. Los dos fucoidanos sobresulfatados mostraron un efecto procoagulante entre 0,01 y 10 µg/ml, y los valores de CE₅₀ CAT fueron de 0,09 y 0,12 µg/ml. Mientras tanto los dos fucoidanos desulfatados mostraron un mayor rango de concentración efectiva y los valores de CE₅₀ que indican una actividad procoagulante más baja que la del fucoidano no modificado. La actividad procoagulante CE₅₀ se representó en función del grado de polimerización en la Figura 6c.

Tabla 3. Actividad procoagulante de *F.v.* Fucoidano sobre sulfatado y desulfatado

Muestra	Grado de sulfatación	Peso molecular (kDa)	Grado de polimerización	CAT CE ₅₀ (µg/mL)
Fucoidano 1 sobre sulfatado	1,34	65	230	0,09 ± 0,01
Fucoidano 2 sobre sulfatado	1,03	55	220	0,12 ± 0,01
Fucoidano no modificado	0,63	51	240	0,30 ± 0,01
Fucoidano no sulfatado 1	0,50	24	120	0,70 ± 0,21
Fucoidano no sulfatado 2	0,37	15	80	2,62 ± 0,38

Inhibición de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)

[0151] Los NASP exhibieron actividad neutralizadora de TFPI en estudios mecánicos. Los fucoidanos se analizaron para determinar la actividad inhibidora de TFPI utilizando un ensayo de tiempo de protrombina diluido TFPI (TFPI-dPT), experimentos de CAT y estudios de resonancia de plasmón de superficie (Biacore). Los fucoidanos ensayados mostraron efectos similares en el TFPI de longitud completa agregado al plasma humano normal. Se invirtió el tiempo de coagulación prolongado inducido por el TFPI con concentraciones medio máximas de aproximadamente 0,4 µg/ml (Figura 7). Además, los fucoidanos no tuvieron efecto procoagulante en los TAC con plasma agotados en TFPI. Esto apoya el mecanismo de inhibición de TFPI de los fucoidanos. La interacción de los NASP con TFPI de longitud completa también se confirmó mediante experimentos de unión de resonancia de plasmones de superficie.

[0152] La Figura 7 muestra un ensayo de tiempo de protrombina diluido en el que se usó un inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI-dPT) para evaluar el efecto inhibidor de TFPI de diferentes fucoidanos. El plasma humano normal agrupado se preincubó con 0,5 µg/ml de TFPI de longitud completa (aa1-276) y el respectivo fucoidano (0,03-1 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Cada uno de los fucoidano que se analizaron mostraron actividades inhibitoras de TFPI con un CE₅₀ de ~ 0,4 µg/ml.

[0153] La inhibición de TFPI por NASPs obtenida por fraccionamiento de carga de muestras de fucoidano *F.v.* usando cromatografía de intercambio iónico DEAE y fraccionamiento de tamaño por ultrafiltración se evaluó con un ensayo de tiempo de protrombina diluida (dPT) con TFPI de longitud completa añadido. Todos los NASPs fueron capaces de revertir el efecto anticoagulante de este inhibidor de la coagulación. Al igual que en los experimentos CAT, la actividad del fucoidano en el ensayo TFPI-dPT aumentó con un mayor grado de sulfatación. Los valores de CE₅₀ de la inhibición de TFPI correspondieron bien a los determinados por los ensayos de generación de trombina, lo que sugiere que el bloqueo de TFPI es el mecanismo de la acción procoagulante de las NASP. Se determinó que la actividad de bloqueo

de TFPI dependía del grado de sulfatación de los NASP. La interacción de los NASP seleccionados con TFPI se confirmó mediante estudios de resonancia de plasmones de superficie (Figura 19). Todos los NASP se unieron a TFPI de longitud completa pero no a una forma TFPI1-160 truncada en el extremo C-terminal. Esto indica que el peso molecular y el grado de sulfatación están relacionados con la actividad procoagulante de los NASP. La fracción de fraccionamiento de tamaño S5 con un tamaño de 10 kDa no interactuó sustancialmente con el TFPI, lo que indica que un umbral de peso molecular de aproximadamente 15 kDa puede ser adecuado para una inhibición suficiente del TFPI.

[0154] La inhibición del efecto anticoagulante TFPI y la unión de fucoidanos a TFPI se representa en las Figuras 19a y 19b. La inhibición de TFPI por fucoidanos se analizó en un ensayo de dPT modificado donde se añadió fl-TFPI (Figura 19a). Los fucoidanos revierten el efecto anticoagulante del TFPI de una manera dependiente de la dosis. La inhibición de TFPI se incrementó o disminuyó por sobre-sulfatación o desulfatación del fucoidano, respectivamente. Por lo tanto, se demostró que la inhibición de TFPI depende de la densidad de carga de la NASP. Interacción de fucoidanos con fl-TFPI en experimentos de Biacore. (Figura 19b) Los fucoides interactúan de manera dependiente de la dosis con el TFPI. La respuesta también aumentó con mayor peso molecular y grado de sulfatación.

Actividad anticoagulante

[0155] Los NASP ensayados exhiben actividad anticoagulante en concentraciones más altas (>4 µg/ml) de acuerdo con los experimentos CAT y aPTT. Para medir su efecto anticoagulante se realizaron ensayos de aTPT y se determinó la concentración a la que se produjo un aumento del 50% en el tiempo de coagulación en comparación con el plasma humano normal. Los datos muestran que *U.p.* fucoidano tenía aproximadamente el doble de actividad anticoagulante que *L.j.*, *F.v.* y *E.m.* fucoidanos (Figura 3 y Tabla 7). Todos los fucoidanos mostraron un aumento de las actividades anticoagulantes comenzando aproximadamente diez veces por encima de la concentración procoagulante óptima. Se calculó la proporción de las actividades procoagulantes y anticoagulantes de la NASP (Tabla 7). *F.v.* y *L.j.* fucoidano mostraron buena actividad procoagulante y poco efecto anticoagulante.

[0156] La Figura 3 muestra la actividad anticoagulante de varios fucoidanos ensayados. El efecto anticoagulante de los fucoidanos en concentraciones de 0-60 µg/ml se evaluó mediante el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada en plasma humano normal. Se muestra el aumento dependiente de la concentración en el tiempo de coagulación para cuatro candidatos representativos. El fucoidano (triángulos blancos) mostró una mayor actividad anticoagulante que los otros fucoidanos.

[0157] Con el fin de identificar si las NASP que tienen ciertas densidades de carga y el grado de las características de sulfatación pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación sanguínea, las NASP obtenidas por fraccionamiento de la carga de muestras de fucoidano *F.v.* utilizando la cromatografía de intercambio iónico DEAE se examinaron para determinar su actividad anticoagulante. La actividad anticoagulante para las fracciones C₁ - C₆ se determinó usando las condiciones de ensayo descritas anteriormente. Las concentraciones a las que se produjo un aumento del 50% en el tiempo de coagulación en comparación con el plasma humano normal se determinaron mediante el ensayo aPTT y se resumen en la Tabla 4. Todas las NASPs obtenidas por fraccionamiento separado por carga mostraron actividad anticoagulante en concentraciones más altas (>5 µg/ml) según los experimentos de aPTT.

Tabla 4. Grado de sulfatación y actividad anticoagulante de las fracciones separadas por carga de *F.v.* fucoidano

Fracciones	Grado de sulfatación	aPTT +50% concentración (µg/mL)
C1	0,28	24,7 ± 0
C2	0,49	7,5 ± 0,42
C3	0,72	5,9 ± 0,35
C4	0,72	6,9 ± 1,45
C5	0,8	6,1 ± 0,64
C6	0,8	6,1 ± 0,55
<i>F.v.</i> Fucoidano	0,6	4,0 ± 0,28

[0158] Con el fin de identificar si las NASP que tienen ciertos pesos moleculares y el grado de polimerización pueden ser adecuados para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación sanguínea, las NASP obtenidas por fraccionamiento separado por tamaño de muestras de fucoidano *F.v.* usando ultrafiltración se examinaron para determinar su actividad anticoagulante. Los resultados de aPTT se muestran en las Figuras 5B y 5D y se resumen en la Tabla 5. Se determinó que la actividad anticoagulante estaba relacionada con el peso molecular. En este ejemplo, un peso molecular igual o superior a 41 kDa mostró una actividad anticoagulante alta, aumentando el tiempo de coagulación en un 50% a 5 µg/ml, mientras que las NASP que tienen un peso molecular de menos de 41 kDa requieren una mayor concentración. El grado de polimerización también se investigó de manera similar. En este ejemplo, un grado de polimerización igual o superior a 200 mostró una alta actividad anticoagulante, mientras que la actividad anticoagulante de las NASP que tenían un grado de polimerización por debajo de aproximadamente 200 fue

significativamente menor.

Tabla 5. Peso molecular, grado de polimerización y actividad anticoagulante de fracciones separadas por tamaño de *F.v.* fucoidano

Número de fracción	Peso molecular (kDa)	Grado de polimerización	aPTT +50% conc. (µg/mL)
S1	174	840	4,4 ± 0,14
S2	124	590	4,5 ± 0,14
S3	40	200	7,3 ± 0,49
S4	15	70	11,6 ± 0,14
S5	10	50	18,8 ± 0,64
S6	8	40	23,6 ± 3,54

Los fucoidanos *F.v.* desulfatados y sobre sulfatados también se utilizaron para investigar el impacto de la densidad de carga y el grado de sulfatación en la actividad anticoagulante. Los dos fucoidanos sobresulfatados aumentaron el tiempo de coagulación a 50% por encima de lo normal en concentraciones mucho más bajas en un ensayo aPTT que los dos fucoidanos desulfatados (Tabla 6). Por lo tanto, la actividad anticoagulante sigue la misma tendencia que se observa con la actividad procoagulante.

Tabla 6. Actividad anticoagulante de *F.v.* Fucoidano Sobresulfatado y desulfatado

Muestra	Grado de sulfatación	Peso molecular (kDa)	Grado de polimerización	aPTT +50% conc. (µg/mL)
Fucoidano 1 sobre sulfatado	1,34	65	230	2,9 ± 0,02
Fucoidano 2 sobre sulfatado	1,03	55	220	3,0 ± 0,23
Fucoidano no modificado	0,63	51	240	7,0 ± 0,57
Fucoidano no sulfatado 1	0,50	24	120	17,3 ± 0,25
Fucoidano no sulfatado 2	0,37	15	80	53,6 ± 2,74

Activación de ruta de contacto

[0159] Se sabe que muchos polímeros aniónicos, tales como glicosaminoglicanos y polifosfatos sulfatados, activan la coagulación a través de la vía de contacto intrínseca. Sin embargo, la activación de la vía de contacto es perjudicial para tratar un trastorno de coagulación de la sangre debido a su asociación con la inflamación. Los fucoidanos se ensayaron para su activación de la vía de contacto. La adición de CTI (inhibidor de la tripsina del maíz) bloquea FXIIa y, por lo tanto, bloquea la vía de contacto. Por lo tanto, los fucoidanos se ensayaron en ensayos de generación de trombina utilizando un grupo de plasma humano normal en presencia y ausencia de CTI para determinar la activación por contacto. Los cuatro fucoidanos mejoraron la generación de trombina, lo que indica su modo de acción independiente del FVIII. *L.j.* fucoidano mostró un claro aumento en la generación de trombina en ausencia de CTI en comparación con el control de plasma con CTI en concentraciones superiores a 5 µg/ml. *E.m.* fucoidano tuvo un ligero efecto a una mayor concentración. Por el contrario, *U.p.* y *F.v.* fucoidanos no activaron la vía de contacto hasta una concentración 30 veces superior a su óptimo procoagulante (Figura 4).

[0160] Las Figuras 4a-4j representan la activación de la ruta de contacto por los fucoidanos ensayados, así como por NASP sobre sulfatados y fracciones de NASP S1, S2 y S5 del fraccionamiento separado por tamaño como se describe con mayor detalle a continuación. El ensayo CAT desencadenado por factor tisular en plasma humano normal se realizó en ausencia y presencia (40 µg/ml) del inhibidor de FXIIa CTI. Las Figuras 4a-j muestran los perfiles de generación de trombina de *L.j.* fucoidano, *U.p.* fucoidano, *E.m.* fucoidano y *F.v.* fucoidano, así como NASP sobresulfatados y fracciones de NASP S1, S2 y S5 del fraccionamiento separado por tamaño con y sin inhibidor de FXIIa CTI. Todos los fucoidanos mostraron actividad procoagulante en plasma normal: picos de trombina (nM, círculos negros) y control de plasma normal (línea negra). *L.j.* y *E.m.* fucoidanos muestran una mayor formación de trombina en ausencia de CTI en concentraciones > 5 µg/ml (triángulos blancos). Esto indica la activación de la vía de contacto.

Tabla 7. Actividad de muestras de Fucoidano de cuatro especies diferentes y tres lotes de fucoidanos de algas pardas *F.v.*

5

10

	<i>L.j.</i> Fucoidano	<i>U.p.</i> Fucoidano	<i>E.m.</i> Fucoidano	<i>F.v.</i> Fucoidano		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3
CE ₅₀ (µg/mL)	0,3	0,4	0,8	0,2	0,3	0,2
aPTT (µg/mL)	7	4,5	8,7	6,5	6,3	6,2
Relación aPTT/CE ₅₀	23,3	11,3	10,9	32,5	21,0	31,0

15

[0161] Se descubrió que la sobresulfatación puede estimular una activación de la ruta de contacto. En ausencia del inhibidor de FXIIa CTI, el fucoidano altamente sobre sulfatado indujo un aumento de la generación de trombina en concentraciones tan bajas como 1 µg/ml. El fucoidano no modificado y desulfatado no mostró este efecto.

20

[0162] En base a los resultados obtenidos de las NASP a partir de muestras fraccionadas por tamaño de fucoidano Fv, el fucoidano más grande con un MW de 174 K_d también activó ligeramente la vía de contacto en ausencia de CTI. Sin embargo, la activación por contacto no se produjo hasta un grado de polimerización 600.

Ejemplo 2

Estructura molecular

25

[0163] También se realizó una comparación de la estructura molecular de los fucoidanos ensayados. Tres lotes de *F.v.* Fucoidano se caracterizaron por la consistencia del producto.

Gel de agarosa

30

[0164] Se usó electroforesis para comparar fucoidanos. En este trabajo, se aplicaron geles de agarosa a los fucoidanos ensayados. (Figura 8). Las diversas especies se distinguieron por la migración de los fucoidanos en el gel de agarosa, y los tres lotes parecen similares en el gel, lo que implica una buena reproducibilidad de fabricación lote a lote. La pureza, la relación de tamaño molecular a carga y la afinidad al bario son propiedades que determinan la migración de una muestra en el gel. El gel para el análisis de diferentes fucoidanos se muestra en la Figura 8. Los fucoidanos de diferentes fuentes se distinguieron fácilmente y también se confirmó el rendimiento constante de los lotes de *F.v.* fucoidano en el gel.

35

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

40

[0165] Se analizaron diferentes lotes de fucoidano mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y sus pesos moleculares podrían clasificarse de manera aproximada.

Determinación de peso molecular y polidispersidad por cromatografía de exclusión por tamaño - dispersión de luz láser de múltiples ángulos (SEC-MALLS)

45

[0166] El peso molecular y las polidispersidades de diferentes fucoidanos se enumeran en la Tabla 8. Se midió el valor dn/dc específico para el *F.v.* fucoidano (0,113 ml/g) y se usó para calcular el peso molecular promedio de todos los fucoidanos analizados. De los datos de SEC-MALLS, los fucoidanos *F.v.* tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 130 a 160 kDa y los *L.j.* fucoidanos tienen un peso molecular promedio similar de aproximadamente 170 kDa. Los *E.m.* fucoidanos tienen el mayor peso molecular ensayado de más de 1000 kDa; y el peso molecular de *U.p.* fucoidano también es grande a más de 500 kDa. La polidispersidad, que es un reflejo de la heterogeneidad de tamaño, es similar para todos los fucoidanos en este informe.

50

55

Tabla 8. Pesos moleculares (Mw) y polidispersidades (PoliD) determinados por SEC-MALLS

60

	<i>L.j.</i> Fucoidano	<i>U.p.</i> Fucoidano	<i>E.m.</i> Fucoidano	<i>F.v.</i> Fucoidano		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3
Promedio de Mw. (KDa)	170	620	1360	160	150	130
PoliD	1,8	1,6	1,5	1,6	1,7	1,7

Análisis de monosacáridos mediante cromatografía iónica (CI)

65

[0167] Las muestras de fucoidano se hidrolizaron a monosacáridos. La hidrólisis se controló por TLC. La separación de los estándares de monosacáridos y un cromatograma de muestra representativo se muestran en la Figura 9. Los

resultados de la composición de monosacáridos se enumeran en la Tabla 9. Se observaron tres componentes, fucosa, galactosa y xilosa, en *L.j.* fucoidano; Se observaron fucosa y galactosa en *U.p.* y *E.m.* fucoidanos. *F.v.* fucoidanos contenía fucosa casi en su totalidad.

5 Tabla 9. Composición de monosacáridos determinada por CI

Área relativa (%)	<i>L.j.</i> Fucoidano	<i>U.p.</i> Fucoidano	<i>E.m.</i> Fucoidano	<i>F.v.</i> Fucoidano		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3
Fucosa	39	58	38	73	75	76
Galactosa	35	37	41	15	15	14
Glucosa	1	3	8	1	0	0
Xilosa	21	1	5	9	8	8
Manosa	4	1	8	2	2	2

15 Determinaciones de fucosa, alginato y heterogeneidad utilizando ¹³C-RMN

[0168] La estructura de los fucoidanos ensayados se caracterizó cuantitativamente por ¹³C-RMN. Esta es la primera vez que se utiliza un enfoque cuantitativo de ¹³C-RMN como un método para evaluar los fucoidanos para identificar si una o más de las composiciones pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de la coagulación de la sangre.

[0169] La Figura 11 representa las integrales de la ¹³C-RMN representada en función de su tiempo de retardo de relajación (D1). La secuencia de pulsos empleada fue tal que el desacoplador se activó solo durante el tiempo de adquisición. Las integrales relativas de los carbonilos aumentaron cuando D1 se varió de 1 segundo a 5 segundos. Los grupos carbonilo se relajaron completamente después de un retraso de 5 segundos. Las integrales de los grupos metilo tuvieron una respuesta diferente a las de los grupos carbonilo. Las integrales de los grupos metilo disminuyeron cuando D1 se varió de 1 segundo a 5 segundos debido a que la mejora del Overhauser nuclear no se eliminó completamente hasta que el D1 fue más largo que 5 segundos. Las integrales para los otros carbonos en el anillo de azúcar tuvieron un comportamiento similar al de los grupos metilo, es decir, disminuyeron en intensidad hasta un D1 de 5 segundos y se nivelaron con valores D1 más largos. Las integrales para los carbonos anoméricos no cambiaron significativamente con D1, Según estos datos, el mínimo de D1 para la relajación completa de los carbonilos es de 5 segundos. Todos los espectros de RMN de carbono de los candidatos de fucoidano se adquirieron con un tiempo de retardo de 5 segundos para obtener los datos cuantitativos.

[0170] Los espectros de ¹³C se integraron en los intervalos que se muestran en la Figura 10. Se observaron grupos carbonilo del alginato en δ 170-185 ppm, los picos anoméricos se observaron en δ 88-112 ppm, los otros carbonos en el anillo de azúcar fueron observados a δ 55 - 88 ppm, y el grupo metilo de la fucosa se observó a δ 9-20 ppm. El contenido de alginato (% mol de polinacárido alginato/mol) se calculó basándose en el hecho de que la molécula de alginato contiene un residuo carbonilo por sacárido, mientras que cada residuo de azúcar, de cualquier monosacárido, tiene un carbono anomérico. Por lo tanto:

$$C\% \text{ alginato} = \frac{f \text{ carbonilos}}{f \text{ anoméricos}} \times 100\% \quad \text{Ec. [1]}$$

cuando f carbonilos = integral de grupos de carbonilo; f anoméricos = integral de la región anomérica.

El contenido de fucosa (% mol fucosa/mol fucoidano) se calculó basándose en el hecho de que hay un grupo metilo por residuo de fucosa, excluyendo la contribución de la impureza de alginato al polisacárido total. Por lo tanto:

$$C\% \text{ fucosa} = \frac{f \text{ metilos}}{f \text{ anoméricos} - f \text{ carbonilos}} \times 100\% \quad \text{Ec. [2]}$$

cuando f metilos = integral de grupos de metilos.

Algunas muestras de fucoidano tenían un contenido de alginato insignificante (<10%) y, para esas muestras, la ecuación 2 se simplificó a:

$$C\% \text{ fucosa} = \frac{f \text{ metilos}}{f \text{ anoméricos}} \times 100\% \quad \text{Ec. [3]}$$

[0171] Los contenidos de alginato y fucosa se enumeran en la Tabla 10, *L.j.* y *E.m.* fucoidanos contenían cantidades relativamente altas de alginato, mientras que *U.p.* y *F.v.* fucoidanos solo contenían pequeñas cantidades. *F.v.*

fucoidano contenía casi en su totalidad fucosa. *L.j.* y *U.p.* fucoidano contenían 55-59% de fucosa, y *E.m.* fucoidano contenía solo 39% de fucosa. Una comparación de los contenidos de fucosa de CI y RMN (Tabla 9 y Tabla 10) estuvieron generalmente de acuerdo. La cromatografía iónica y la RMN difieren en que la CI depende de la hidrólisis de los polisacáridos para producir los monómeros, mientras que la solución RMN observa los polisacáridos intactos que están completamente disueltos.

Tabla 10. Contenido de alginato y fucosa basado en el análisis de ^{13}C -RMN

	<i>L.j.</i> Fucoidano	<i>U.p.</i> Fucoidano	<i>E.m.</i> Fucoidano	<i>F.v.</i> Fucoidano		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3
Contenido de alginato (%) ^a	28	2	25	7	6	5
Contenido de fucosa (%)	55 ^b	59 ^c	39 ^b	83 ^c	86 ^c	83 ^c
a, calculado utilizando Ec [1]; b, calculado utilizando Ec [2]; c, calculado utilizando Ec [3]						

Cargar el fraccionamiento separado para determinar la densidad de carga y el grado de sulfatación

[0172] Las muestras de fucoidano se fraccionaron usando cromatografía de intercambio iónico como se describe anteriormente. Se recogieron seis fracciones (C1-C6) de la columna DEAE. Tanto la densidad de carga como el grado de sulfatación se determinaron independientemente. El grado de sulfatación se calculó a partir del contenido de azufre medido por valoración colorimétrica.

[0173] El grado de sulfatación de las fracciones eluidas fue consistente con el orden de elución, (Tabla 11) donde cuánto mayor sea el grado de sulfatación, más tarde se eluyó la fracción. El análisis de monosacáridos reveló que las composiciones de azúcar de estas fracciones también eran diferentes entre sí. La fracción C1 contiene altos niveles de xilosa (44%) y manosa (17%), niveles relativamente bajos de fucosa (aproximadamente 34%) y pequeñas cantidades de otros azúcares. La fracción C2 contiene aumento de fucosa (alrededor del 60%), baja en xilosa (alrededor del 18%) y manosa (alrededor del 7%) y tiene el mayor contenido de galactosa (16%). Las fracciones C3-C6 tienen contenidos de fucosa en aumento que van del 78% al 94%, disminuyendo el contenido de galactosa en el rango de 14% a 6% y cantidades insignificantes de xilosa y manosa. Sin embargo, a diferencia de la densidad de carga, el grado de sulfatación y la composición del azúcar, el promedio molecular de las NASP en las fracciones C2-C6 es similar y varía de aproximadamente 100 a aproximadamente 160 kDa. El peso molecular promedio de las NASP en la fracción C1 fue de aproximadamente 280 kDa.

Tabla 11. Grado de sulfatación (DS), peso molecular y composición de monosacáridos de *F.v.* fucoidano separado por carga

Fracciones	DS	Mw (kD)	Mol (%)						
			Fucosa	Ranmosa	Arabinosa	Galactosa	Glucosa	Manosa	Xilosa
C1	0.28	282	33.5	0.3	0.1	3.9	1.1	17.0	44.2
C2	0.49	121	58.5	0.5	0.2	15.7	0.6	6.8	17.8
C3	0.72	136	78.0	0.1	0.3	14.3	N/A	1.3	6.0
C4	0.72	161	81.6	0.1	0.2	13.9	N/A	1.0	3.2
C5	0.80	151	93.3	0.1	N/A	6.3	0.3	N/A	N/A
C6	0.80	117	93.8	N/A	N/A	6.0	0.2	N/A	N/A
Fucoidano original	0.63	124	74.3	0.1	0.1	10.3	0.3	3.8	11.7

Fraccionamiento separado por tamaño para determinar tamaño y grado de polimerización.

[0174] Los fucoidanos fraccionados por tamaño se prepararon a partir de *F.v.* fucoidano por ultrafiltración. Se produjeron y estudiaron fracciones separadas de seis tamaños. Los pesos moleculares de cada fracción se determinaron con SEC-MALLS y se resumen en la Tabla 12. Los cromatogramas de índice de refracción superpuestos de las fracciones separadas por tamaño se muestran en la Figura 12. El peso molecular de las fracciones varió de aproximadamente 8 kD a aproximadamente 170 kD. Los espectros de RMN (Figura 13) de seis fracciones S1-S6 se obtuvieron y demostraron propiedades estructurales similares. Utilizando el peso molecular, el contenido de azufre y la composición del azúcar, los grados de polimerización (es decir, la longitud de la cadena de azúcar) se calcularon y

se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Peso molecular y grado de sulfatación del *F.v.* fucoidano separado por fraccionamiento separado por tamaño

Fracciones	Peso molecular (kDa)	Grado de polimerización
S1	174	840
S2	124	590
S3	40	200
S4	15	70
S5	10	50
S6	8	40

Elucidación de la estructura de NASP utilizando 2-D y 3-D RMN

[0175] Se adquirieron espectros de RMN de una y dos dimensiones en las fracciones separadas por carga descritas anteriormente para dilucidar la estructura molecular. En todas las fracciones separadas por carga, excepto para C6, hubo un solapamiento significativo de picos en los espectros de 1D y 2D RMN, lo que indica una mezcla de subestructuras, lo que excluyó la asignación de picos específicos y la elucidación de estructuras discretas.

[0176] La estructura de la fracción C6 se aclaró. La fracción C6 obtenida como se describió anteriormente fue asignada por 2-D COSY (Figura 14A) y espectros HSQC (Figura 14B). Las etiquetas "C" y "H" se usan para indicar el átomo en la estructura NASP, un superíndice A o B se usa para indicar el tipo de residuo de fucosa y un número de subíndice para indicar la posición en el residuo de monosacárido. El HSQC-TOCSY tridimensional también se utilizó para aclarar las asignaciones de picos (Figura 15). La fracción C6 incluía al menos dos tipos de residuos de fucosa, A y B. Los cambios químicos, que fueron calibrados por el estándar interno TMSP, se enumeran en la Tabla 13. Los cambios químicos de $^1\text{H}_4$ y $^{13}\text{C}_4$ son 4,60 ppm y 83,9 ppm, respectivamente. Estos cambios químicos relativamente altos indican O-sulfatación en el hidroxilo en $^1\text{C}_4$. Los desplazamientos químicos de otras posiciones son relativamente bajos, lo que indica que no hay sustituciones. Por lo tanto, los residuos A son residuos de fucosa 4-O-sulfatados terminales. Tanto $^1\text{H}_4$ como $^{13}\text{C}_4$ también tienen grandes desplazamientos químicos similares a los de la posición 4 en el residuo A, lo que indica una sulfatación en la posición 4 del residuo B. El cambio químico de $^{13}\text{C}_3$ tiene un valor de 78,8 ppm, mientras que el del $^1\text{H}_3$ correspondiente tiene un valor de 4,03 ppm. Estos cambios químicos indican que la posición 3 es la posición de enlace. Por lo tanto, se determina que los residuos B son residuos de fucosa 4-O-sulfatada con enlaces α -1-3. Las estructuras químicas de los residuos A y B se muestran en la Figura 16. Los picos cruzados del residuo A en el espectro de HSQC son relativamente intensos, lo que indica una abundancia de residuos A en esta fracción. Dado que A es un residuo terminal, la fracción C6 contiene un polisacárido altamente ramificado con un esqueleto de residuos B conectados a ramas compuestas de residuos A. La relación de residuos B a residuos A es aproximadamente 1,4, lo que indica que aproximadamente uno de cada 1,4 B residuos tiene una rama con un residuo A.

[0177] La estructura de la fracción C6 también fue asignada por HMBC (Figura 17). Como se muestra en la Figura 17, no se observó una correlación inequívoca entre los residuos A y los residuos B a través del oxígeno en los enlaces glicosídicos. Los cambios químicos de protones y carbono de la posición 1 en estos dos residuos están cerca uno del otro. El pico cruzado etiquetado como $^{13}\text{C}_3$ - $^1\text{H}_1$ en la Figura 16 es la correlación entre $^{13}\text{C}_3$ y $^1\text{H}_1$ o la correlación entre $^{13}\text{C}_3$ y $^1\text{H}_1$, ambos pares de los cuales están separados por 3 enlaces. El patrón de ramificación se determinó que la mayoría de los residuos A y B no están directamente vinculados entre sí, y la mayoría de los residuos B no forman parte de la cadena ramificada. Por lo tanto, se determinó que la estructura principal de esta fracción era un polifucano con enlaces α -1-3, 4-O-sulfatado y altamente ramificado, en el que la mayoría de las ramas son fucosa 4-O-sulfatada en 2 o 4 posiciones.

Tabla 13. Desplazamientos químicos de residuos en la estructura de NASPs en la fracción C6.

	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6	
5	Desplazamientos químicos de proton (ppm)						
	A	5,11	3,75	4,00	4,60	4,49	1,24
	B	5,10	3,83	4,03	4,76	4,491	1,27
10	Desplazamientos químicos de carbón (ppm)						
	A	100,4	71,6	71,7	83,9	69,5	18,6
	B	100,9	70,1	78,8	82,5	69,5	18,6

Desulfatación y sobresulfatación de NASPs

15 **[0178]** Los fucoidanos fueron desulfatados y sobresulfatados usando el método descrito anteriormente. Los espectros de ¹H RMN de fucoidanos modificados químicamente se muestran en la Figura 18. Los espectros de ¹H RMN de fucoidanos sobresulfatados (OSF) se muestran en la parte superior de la Figura 3, La muestra 1 de fucoidano sobresulfatado (OSF 1) se preparó con una alta cantidad de reactivo de sulfatación y la muestra 2 de fucoidano sobre sulfatado (OSF 2) se preparó con una baja cantidad de reactivo de sulfatación. Los espectros de ¹H RMN de fucoidanos desulfatados (DSF) se muestran en la parte inferior de la Figura 18. La muestra 1 de fucoidano desulfatado (DSF 1) se sometió a 1 hora de reacción de desulfatación. La muestra 2 de fucoidano desulfatado (DSF2) se sometió a 2 horas de reacción de desulfatación. También se analizó una muestra de fucoidano no modificado y en la Figura 18 se muestra la ¹H RMN para el fucoidano no modificado como referencia.

25 **[0179]** Una comparación de los espectros revela que la mayoría de los picos en el rango de 3,2 a 5,9 ppm cambiaron gradualmente de alta a baja frecuencia, lo que implica que el grado de sulfatación sigue una tendencia decreciente. El grado de sulfatación calculado en base a las mediciones de azufre de estos fucoidanos modificados químicamente se enumeran en la Tabla 14 y fueron consistentes con los resultados del análisis de RMN.

30 Tabla 14. Grado de sulfatación y grado de polimerización de *F.v.* Fucoidano sobresulfatado y desulfatado

Muestra	Grado de de sulfatación	Peso molecular (kDa)	Grado de polimerización
Fucoidano sobresulfatado 1	1,34	65	230
Fucoidano sobresulfatado 2	1,03	55	220
Fucoidano no modificado	0,63	51	240
Fucoidano desulfatado 1	0,50	24	120
Fucoidano desulfatado 2	0,37	15	80

45 **[0180]** El peso molecular y el grado de polimerización también se determinaron y se enumeraron en la Tabla 14. Los resultados indicaron que se produjo una despolimerización con desulfatación, y el cambio en el grado de despolimerización depende del tiempo de reacción. Por otro lado, el grado de polimerización de los fucoidanos sobre sulfatados es similar al del fucoidano no modificado, lo que indica que no se produce despolimerización durante la sobresulfatación. El cambio en el peso molecular es el resultado de la adición de grupos sulfato.

Ejemplo 3

Composición química

55 **[0181]** El contenido de azufre también se usó para caracterizar los fucoidanos ensayados. *L.j.* y *E.m.* mostraron un bajo contenido de azufre, pero los contenidos cuantificados de bajo contenido de azufre se vieron parcialmente afectados por un alto contenido de alginato y, por lo tanto, puede no ser una indicación completa de un bajo contenido de azufre en los fucoidanos. Por ejemplo, el contenido de azufre de *L.j.* fucoidano se ajustó de 5,8 a 8,5% en peso después de que se excluyó el alginato (en la Tabla 5 se muestran otros S% ajustados).

60 **[0182]** Las impurezas en la composición de NASP pueden afectar la actividad de coagulación de NASP, aumentar la posibilidad de toxicidad y afectar el control de calidad en el procesamiento. Así, se analizaron las impurezas orgánicas e inorgánicas.

65 **[0183]** Los polisacáridos no NASP se extraen conjuntamente con fucoidanos en algas pardas, tales como alginato y laminaran. El alginato está compuesto de ácido manurónico y gularónico con enlaces 1-4 y no es ni pro ni anticoagulante en el rango de concentración relevante para los fucoidanos ensayados. Los grupos carbonilo del alginato observados en los espectros ¹³C-RMN se integraron los espectros y se calcularon los contenidos de alginato.

El contenido de alginato también se puede cuantificar mediante un ensayo específico del ácido urónico, el ensayo de carbazol. Laminaran está compuesto de glucosa con enlaces 1-3 y 1-6. La glucosa determinada por el análisis de la composición de monosacáridos (Tabla 9) indicó la presencia de laminaran. El contenido de glucosa de los fucoidanos analizados fue pequeño y, por lo tanto, el contenido de laminaran fue insignificante en los fucoidanos analizados.

[0184] El análisis elemental para el contenido de proteína de nitrógeno indicado. Todos estos fucoidanos contenían pequeñas cantidades de proteínas ($N \leq 0,12\%$).

[0185] Otras impurezas orgánicas podrían provenir del proceso de fabricación, tales como ácido acético, glicerol, etc. Se usó ^1H -RMN unidimensional con 2D (^1H - ^1H y ^1H - ^{13}C) RMN para ensayar el ácido acético y el glicerol.

[0186] La Tabla 15 muestra el análisis elemental de muestras seleccionadas de fucoidano. Como se muestra en la Tabla 15, las impurezas inorgánicas solo se detectaron en cantidades traza.

Tabla 15. Análisis elemental con PIC.

Especies/Lotes	L.j. Fucoidano	U.p. Fucoidano	E.m. Fucoidano	F.v. Fucoidano		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3
Ag	<0,1	<0,1	3,8	0,2	<0,1	<0,1
Al	17	74	743	16	13	5,1 ^a
As	<0,1	<0,1	0,9	0,1	<0,1	<0,1
B	<2,8	3,2 ^a	4,7 ^a	<2,8	<2,8	<2,8
Ba	37	2,2 ^a	8,7 ^a	4,7 ^a	2,7 ^a	3,0 ^a
Be	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Bi	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ca wt%	1,8	0,1	0,9	0,2	0,1	0,1
Cd	<0,1	<0,1	0,8	<0,1	<0,1	<0,1
Co	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cu	<0,2	0,3	12,7	0,8	1,2	1,3
Fe	45	100	181	48	15	10
Ge	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hg	<0,1	<0,1	0,4	<0,1	<0,1	<0,1
Li	<0,1	0,2	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Mg	901	1783	3848	1703	61	70
Mn	0,3	3,3	8,4	11,4	1,2	1,2
Mo	0,4	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Na wt%	7,5	7,0	6,9	6,3	6,9	7,2
Ni	1,6	0,3	1,9	0,7	0,4	0,3
P	30	227	763	20 ^a	<26	12 ^a
Pb	<0,1	0,2	1,3	0,2	<0,1	<0,1
S wt%	5,8	10	6,0	8,7	9,1	9,9
S teórico wt% de fucoidana ^b	8,5	10,2	8,4	9,5	9,8	10,5
Sb	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Se	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Si	13	46	1238	140	275	80
Sn	<0,2	4,2	0,3	0,2	<0,2	0,3
Sr	344	103	168	226	177	194
Ti	14	<6,7	11	<6,7	<6,7	<6,7
Zn	1,4 ^a	6,4 ^a	23	5 ^a	1,8 ^a	1,8 ^a

a, indica un valor de lectura entre el LQD y el estándar más bajo; b, el % en peso teórico se calculó a partir del % en peso, el contenido de alginato en la Tabla 10 y la composición de monosacáridos en la Tabla 9.

Análisis elemental

[0187] Se analizaron treinta elementos utilizando ICP (Tablas 15 y 16). El contenido de azufre de los fucoidanos seleccionados varió de 5,8% (% en peso) para L.j. a 10% (% en peso) para U.p. fucoidano. El sodio, que correspondió

al contraíón primario, osciló entre 6,3 y 7,5% en peso, mientras que también se observaron menores cantidades de calcio y magnesio: 1,8 y $\leq 0,1\%$ en peso para *L.j.*; 0,9 y $\leq 0,4\%$ en peso para *E.m.*; y $\leq 0,2\%$ para otros fucoidanos, respectivamente. El arsénico es una toxina de interés para los fucoidanos de origen algas. Solo se detectaron trazas de As, en las que el valor más alto fue de 0,9 mg/g en *E.m.*; y otros fucoidanos contenían $\leq 0,1$ mg/g. La concentración de los otros elementos determinados varió de $\leq 0,00001\%$ (0,1 mg/g) a 0,13%.

Tabla 16. Análisis elemental de As, Ca Me, Na S y % en peso teórico.

Especies/Lotes	<i>L.j.</i> Fucoidano	<i>U.p.</i> fucoidano	<i>E.m.</i> Fucoidano	<i>F.v.</i> Fucoidano		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3
As (µg/g)	<0,1	<0,1	0,9	0,1	<0,1	<0,1
Ca % en peso	1,8	0,1	0,9	0,2	0,1	0,1
Mg (µg/g)	901	1783	3848	1703	61	70
Na% en peso	7,5	7,0	6,9	6,3	6,9	7,2
S% en peso	5,8	10	6,0	8,7	8,7	9,9
S ajustado % en peso de fucoidano ^a	8,5	10,2	8,4	9,5	9,5	10,5

a, el S % en peso teórico se calculó a partir del% en peso, el contenido de alginato en la Tabla 4 y la composición de monosacáridos en la Tabla 3,

Titulación colorimétrica

[0188] Los contenidos de azufre de la titulación colorimétrica (Tabla 17) fueron consistentes con los de ICP. Los contenidos de carbono e hidrógeno fueron similares entre todas las fracciones. Un mayor contenido de nitrógeno, se observó un 0,6% en peso en *E.m.* y un $\leq 0,1\%$ de nitrógeno se observó en todos los demás fucoidanos, lo que implica que *E.m.* fucoidano contenía mayores cantidades de proteínas.

Tabla 17. Análisis elemental con analizador CNH y titulación colométrica.

Área relativa (%)	<i>L.j.</i> Fucoidano	<i>U.p.</i> fucoidano	<i>E.m.</i> Fucoidano	<i>F.v.</i> Fucoidano		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3
C %	27,8	23,4	27,8	25,3	26,2	26,4
H %	4,7	4,6	4,8	4,9	4,7	4,8
N %	<0,05	<0,05	0,6	<0,05	0,1	0,07
S %	3,4	9,6	5,0	8,1	8,9	9,2

Ejemplo 4

Cribado de una pluralidad de composiciones de NASP (Fucoidano)

[0189] Se seleccionó una pluralidad de composiciones de fucoidano evaluando actividades de coagulación, composiciones químicas y estructura molecular de NASP para identificar si una o más de las composiciones de fucoidano pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre. En la selección de las composiciones de fucoidano, cada una de las actividades de coagulación determinadas, composiciones químicas y estructura molecular NASP como se describe en los Ejemplos 1-3 se compararon y clasificaron de la manera descrita anteriormente. Dado que cada categoría contribuye a una clasificación acumulativa total, un (1) indicó el rango más bajo posible y (4) fue el rango más alto en este ejemplo. Se consideraron numerosos factores: actividad procoagulante, actividad anticoagulante, tamaño molecular, polidispersidad, heterogeneidad estructural e impurezas. El puntaje para cada categoría para los seis NASP seleccionados se muestra en la Tabla 18,

[0190] En este ejemplo, a la actividad se le dio la mayor prioridad para el cribado de las composiciones de NASP. La heterogeneidad estructural y las impurezas se evaluaron para identificar composiciones de NASP que serían fáciles para el control de calidad y la fabricación.

[0191] Las actividades procoagulantes y anticoagulantes, la proporción de estas dos actividades y la activación por contacto se compararon y clasificaron como se muestra en la Tabla 18. La activación de la vía de contacto se clasificó de (1) a (2), donde (1) indica la concentración más baja para activar la vía de contacto. Basándose en esta comparación, el candidato con la actividad más alta y la ventana terapéutica más amplia (es decir, *F.v.* fucoidano) se identificó como adecuado para tratar a un sujeto con un trastorno de coagulación de la sangre.

[0192] Los fucoidanos de mayor peso molecular tienen menor solubilidad y biodisponibilidad reducida. Por lo tanto, a los fucoidanos de mayor peso molecular (*E.m.* y *U.p.* fucoidanos) se les asignó una clasificación más baja en comparación con los fucoidanos de menor peso molecular (*L.j.* y *F.v.* fucoidanos). La alta polidispersidad y la heterogeneidad estructural pueden dificultar el control de calidad y complicar los estudios de biodisponibilidad y farmacocinética. Por lo tanto, los fucoidanos que tienen mayor polidispersidad y heterogeneidad obtuvieron clasificaciones más bajas.

[0193] Por ejemplo, según el grado de complejidad de las regiones anómeras y las otras regiones de carbono en los espectros de ¹³C-RMN (como se muestra, por ejemplo, en la Figura 6), el orden de heterogeneidad se clasificó aproximadamente de (1) a (4), donde (1) es la mayor heterogeneidad. La heterogeneidad ensayada por ¹³C-RMN reflejó no solo las composiciones de azúcar, que coincidían con los resultados de CI, sino también los complejos patrones de sulfatación y los vínculos entre los diferentes fucoidanos. *L.j.* fucoidano tuvo la mayor heterogeneidad y, por lo tanto, se le asignó una clasificación (1). *F.v.* Fucoidano tuvo la menor heterogeneidad y, por lo tanto, se le asignó una clasificación (4) en este ejemplo.

[0194] En este ejemplo, solo se clasificó la impureza de alginato, ya que todas las demás impurezas fueron insignificantes o no se detectaron. *E.m.* y *L.j.* fucoidano mostraron la mayor cantidad de alginato, mientras que *U.p.* y *F.v.* fucoidanos mostraron la menor cantidad de alginato.

[0195] Después de clasificar cada categoría, que se muestra en la Tabla 18, se calculó la clasificación acumulativa total y se seleccionó el fucoidano que tenía la clasificación acumulada más alta (es decir, *F.v.* fucoidanos) como adecuado para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre.

Tabla 18. Selección de una pluralidad de composiciones de NASP (fucoidano)

Especies/Lotes	<i>L.j.</i> Fucoidano	<i>U.p.</i> fucoidano	<i>E.m.</i> Fucoidano	<i>F.v.</i> Fucoidano		
				Lote 1	Lote 2	Lote 3
Actividad procoagulante ^a	(3)	(2)	(1)	(3)	(3)	(3)
Anticoagulante ^b	(2)	(1)	(3)	(2)	(2)	(2)
Ratio ^c	(2)	(1)	(1)	(3)	(2)	(3)
Acto de vía de contacto ^d	(1)	(2)	(1)	(2)	(2)	(2)
Mw ^e	(3)	(2)	(1)	(3)	(3)	(3)
Composición de monosacáridos ^f	(1)	(3)	(2)	(4)	(4)	(4)
Heterogeneidad ensayada por RMN ^g	(1)	(3)	(2)	(4)	(4)	(4)
Impureza de alginato ^h	(1)	(2)	(1)	(2)	(2)	(3)
Suma ⁱ	(14)	(16)	(12)	(23)	(22)	(23)

a. Las actividades procoagulantes se clasificaron en un rango pequeño de (1) a (3), donde (1) indica la mayor concentración de CE₅₀;
 b. Las actividades anticoagulantes se clasificaron de (1) a (3), donde (1) indica la concentración más baja para aumentar el 50% del tiempo de coagulación;
 c. La proporción de actividades pro y anticoagulantes se clasificó de (1) a (3), donde (1) indica la proporción más baja;
 d. Las activaciones de la ruta de contacto se clasificaron de (1) a (2), donde (1) indica la concentración más baja para activar la ruta.
 e. Orden de MW clasificado de (1) a (3), donde (1) indica el MW más alto;
 f. Basándose en las composiciones de monosacáridos enumeradas en la Tabla 3, su complejidad se clasificó de (1) a (4), donde (1) es la más compleja;
 g. Según el grado de complejidad de los anoméricos y la recuperación de otros carbonos en los espectros de ¹³C-RMN. El orden de heterogeneidad se clasificó aproximadamente de (1) a (4), donde (1) es la heterogeneidad más alta;
 h. Según los datos de la Tabla 4, el contenido de alginato se clasificó de (1) a (2), donde (1) es >10% y (2) <10%;
 i. La suma de las clasificaciones para cada candidato, los fucoidanos de puntuación más alta (es decir, *F.v.* fucoidanos) se seleccionaron como adecuados para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación de la sangre.

[0196] Todos los ejemplos y el lenguaje condicional aquí citado están principalmente destinados a ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para promover la técnica, y se debe interpretar que no están limitados a tales ejemplos específicamente citados. Y condiciones. Además, todas las declaraciones en el presente documento que recitan los principios, aspectos y realizaciones de la invención, así como sus ejemplos específicos, pretenden abarcar tanto los equivalentes estructurales como los funcionales de la misma. Además, se pretende que dichos equivalentes incluyan tanto los equivalentes actualmente conocidos como los equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función,

independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende limitarse a las realizaciones mostradas y descritas en este documento. Más bien, el alcance de la presente invención se materializa en las reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 **1.** Un método para evaluar o seleccionar una pluralidad de composiciones que comprenden un NASP (polisacárido sulfatado no anticoagulante) para identificar una composición que sea adecuada para tratar a un sujeto que tenga un trastorno de coagulación de la sangre, comprendiendo el método:
determinar las características de:

10 la actividad de coagulación y composición química de cada composición;
la estructura molecular de cada NASP;
10 en donde dicha determinación de la actividad de coagulación comprende evaluar la CE_{50} para la actividad procoagulante de la composición mediante trombografía automatizada calibrada (CAT), la ventana procoagulante de la composición, y calcular la relación de la actividad procoagulante a la actividad anticoagulante de la composición;
15 en donde dicha determinación de la estructura molecular comprende determinar el peso molecular de la NASP, el porcentaje en peso de azufre de la NASP y el contenido de fucosa y alginato de la NASP; y
en donde dicha determinación de la composición química comprende determinar los componentes elementales de la composición, y en donde dicha determinación de los componentes elementales de la composición comprende determinar el contenido de impureza de la composición;
20 en donde dicho método comprende además comparar las características determinadas de la pluralidad de composiciones que comprenden un NASP;
en donde dicho método comprende además determinar que una o más de la pluralidad de composiciones pueden ser adecuadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de coagulación sanguínea cuando la composición comprende:

25 un valor de CE_{50} para la actividad procoagulante de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ o menos según lo determinado por CAT;
una ventana procoagulante de 0,1 a 100 $\mu\text{g/ml}$;
una relación de la actividad procoagulante a la actividad anticoagulante de la composición que es 10 o mayor;
30 un peso molecular de la NASP que es de 160 kDa o menos;
un contenido de fucosa de la NASP que es 60% de fucosa o mayor;
un contenido de alginato de la NASP que es un 10% de alginato o menos;
un porcentaje en peso de azufre de la NASP que es 8% de azufre en peso o mayor; y
35 un porcentaje en peso de impurezas en la composición que es 0,1% de impurezas en peso o menos.

2. Método según la reivindicación 1, en el que determinar la actividad de coagulación de la composición comprende además evaluar la actividad inhibidora de TFPI de la NASP.

3. Método según la reivindicación 1, en el que determinar la actividad de coagulación de la composición comprende además determinar el efecto de la composición sobre la activación de la vía de contacto.

4. Método según la reivindicación 1, en el que determinar la estructura molecular de la NASP comprende además uno o más de:

45 determinar la polidispersidad de la NASP;
medir el contenido de alginato y contenido de fucosa de la NASP por ^{13}C RMN cuantitativa; y
determinar la configuración del enlace glicosídico de la NASP.

50

55

60

65

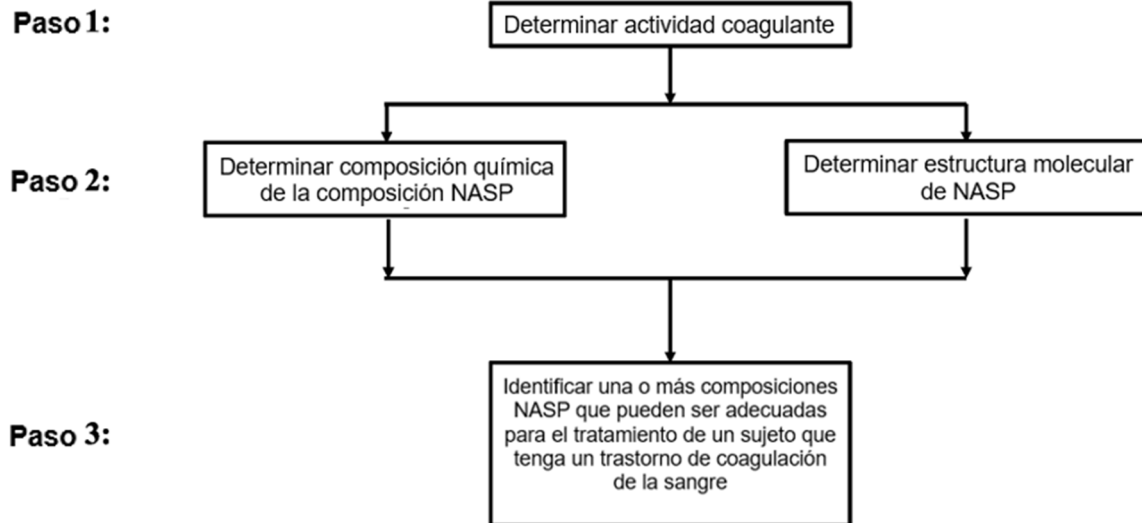


Figura 1a

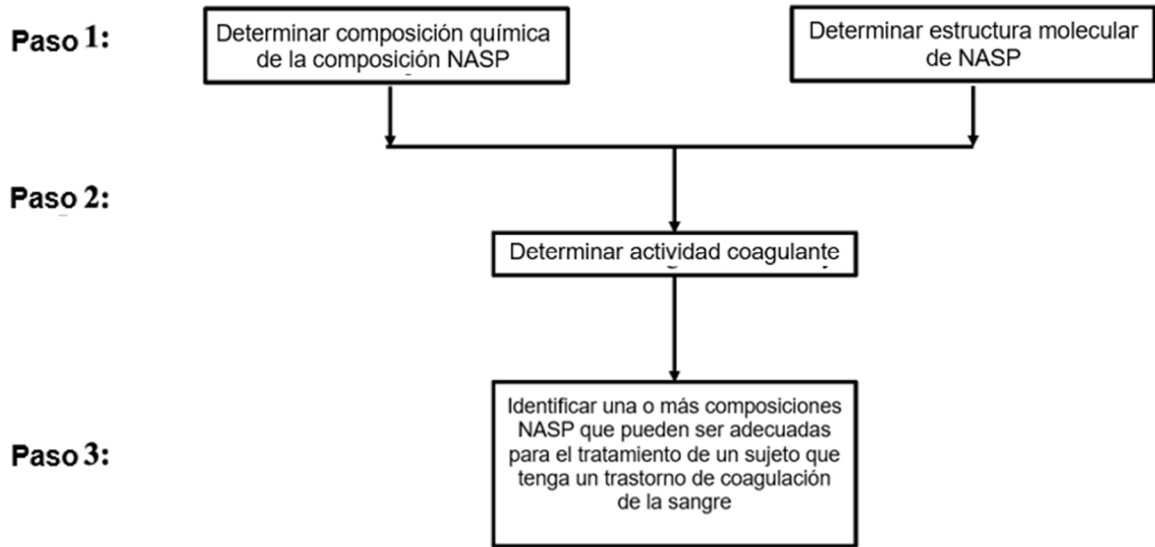


Figura 1b

Generación de trombina dependiente de concentración

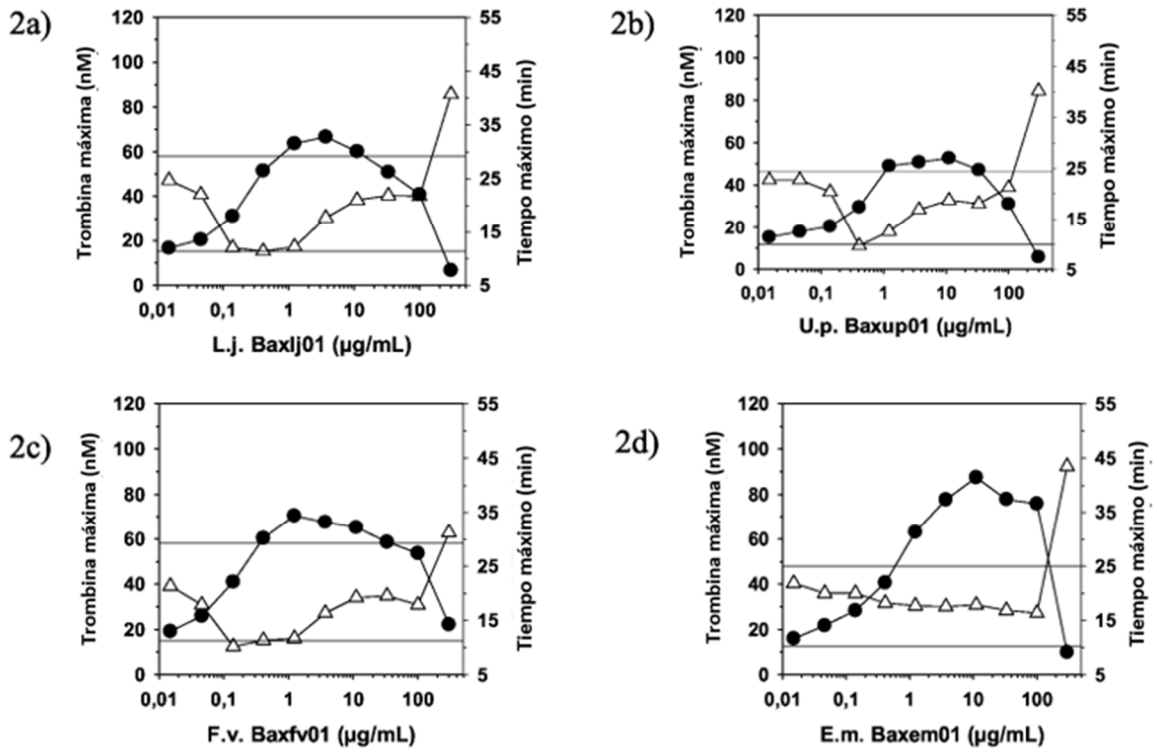


Figura 2

Actividad anticoagulante de composiciones de NASP por ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada

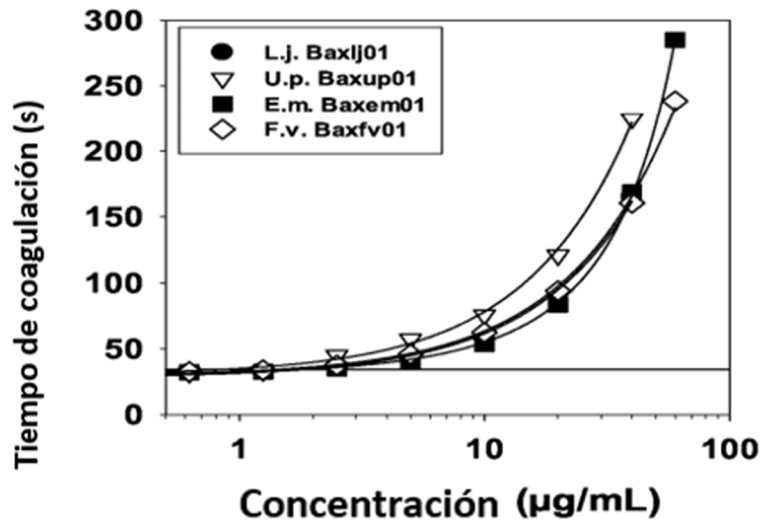


Figura 3

Activación de la vía de contacto

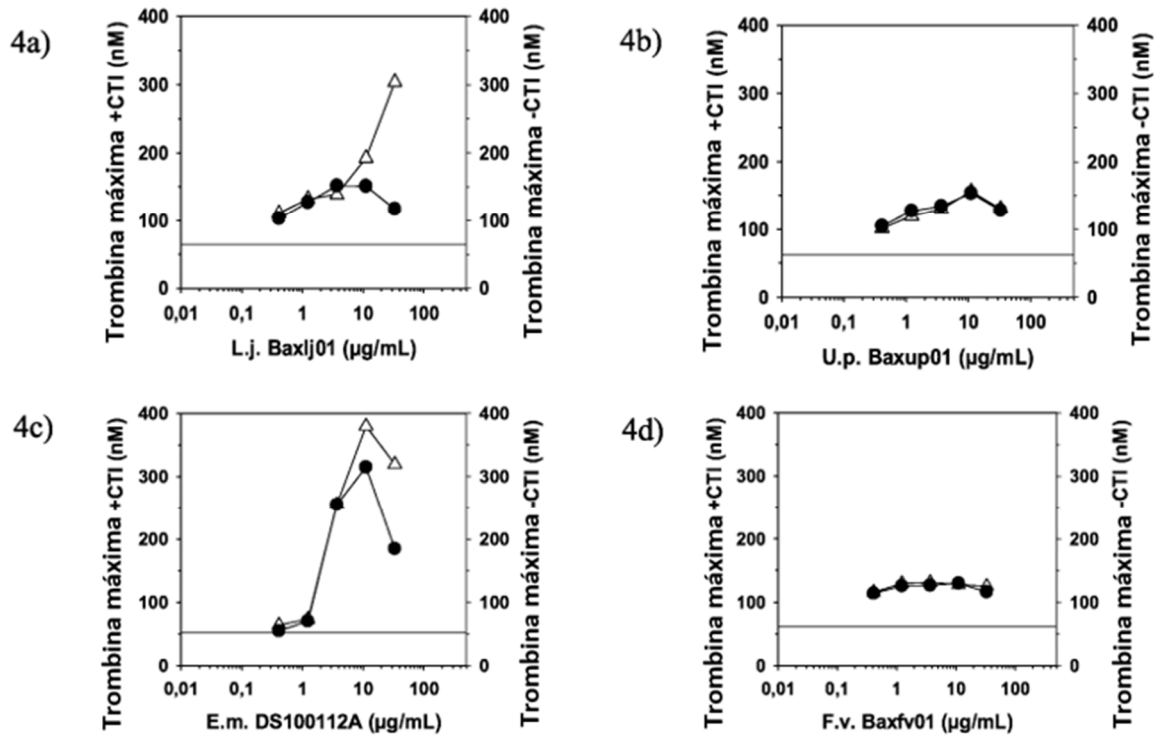


Figura 4

Activación de la vía de contacto

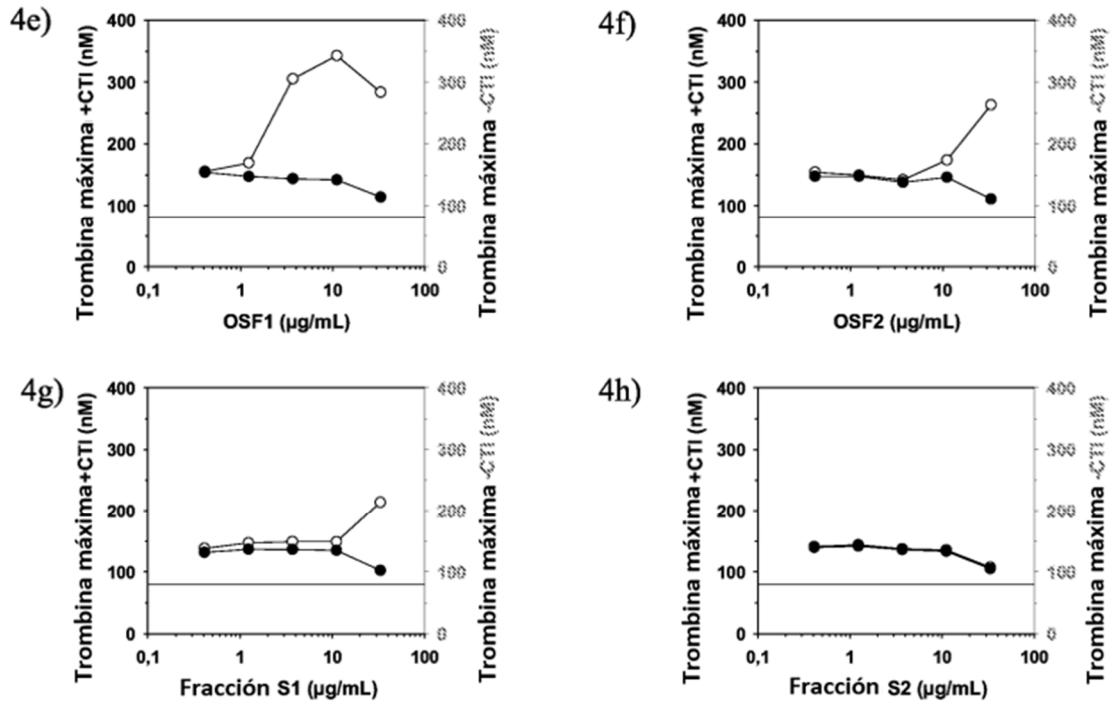


Figura 4 (cont.)

Activación de la vía de contacto

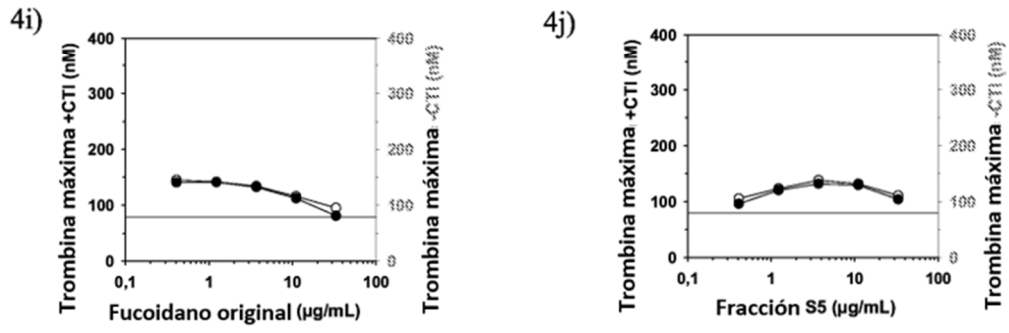


Figura 4 (cont.)

Generación de trombina dependiente de concentración

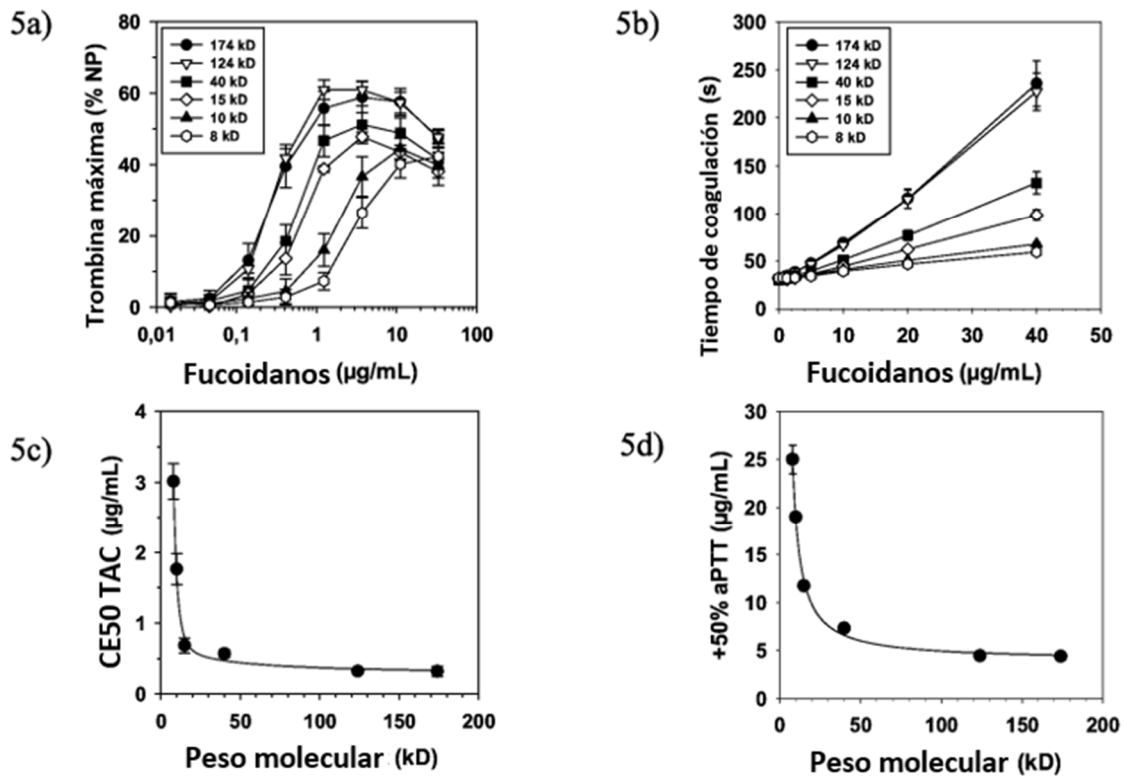


Figura 5

Generación de trombina dependiente de concentración

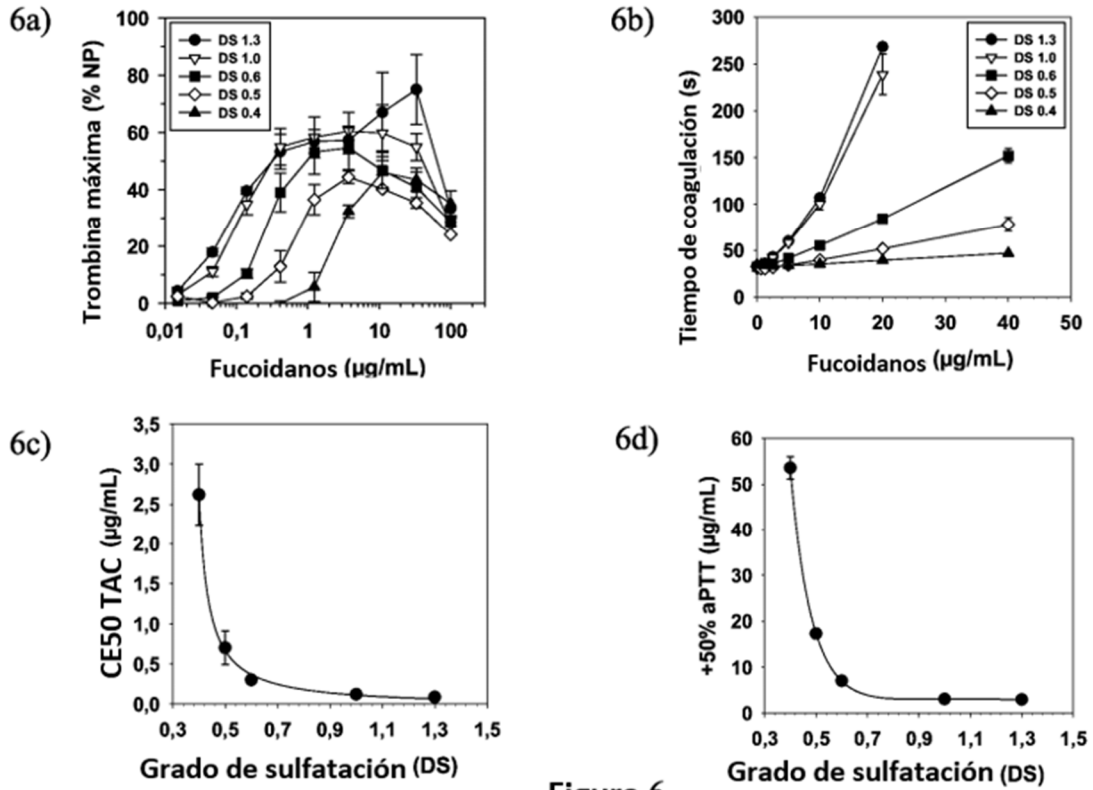


Figura 6

**Inhibición de inhibidor de vía de factor de tejido
tiempo de protrombina de dilución (dPT)**

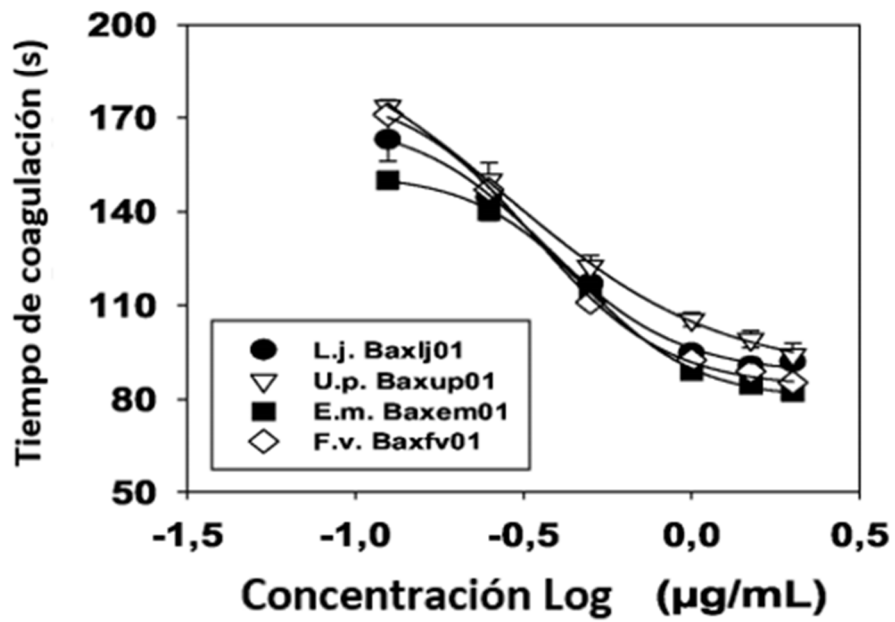


Figura 7

Electroforesis de gel de agarosa

L.j. Fucoidano

U.p. Fucoidano

E.m. Fucoidano

F.v. Fucoidano 1

F.v. Fucoidano 2

F.v. Fucoidano 2

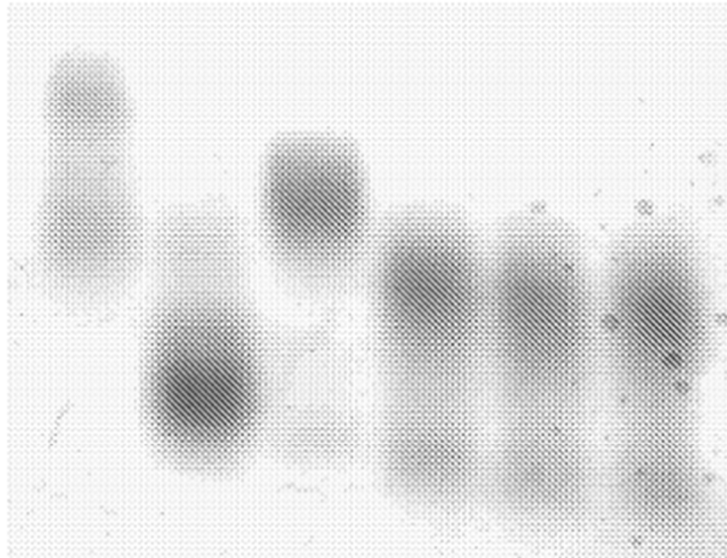


Figura 8

Análisis de monosacárido por cromatografía de iónica

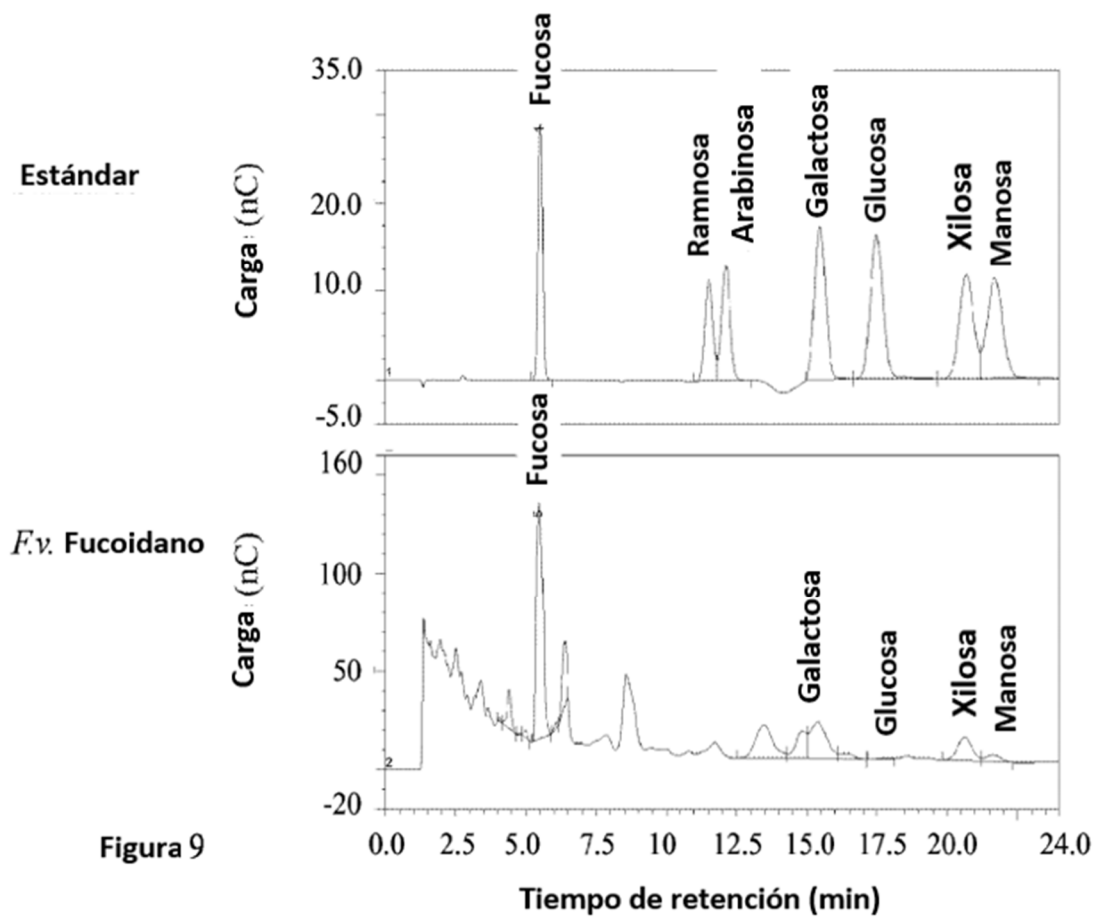


Figura 9

Estructura molecular por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ¹³carbon

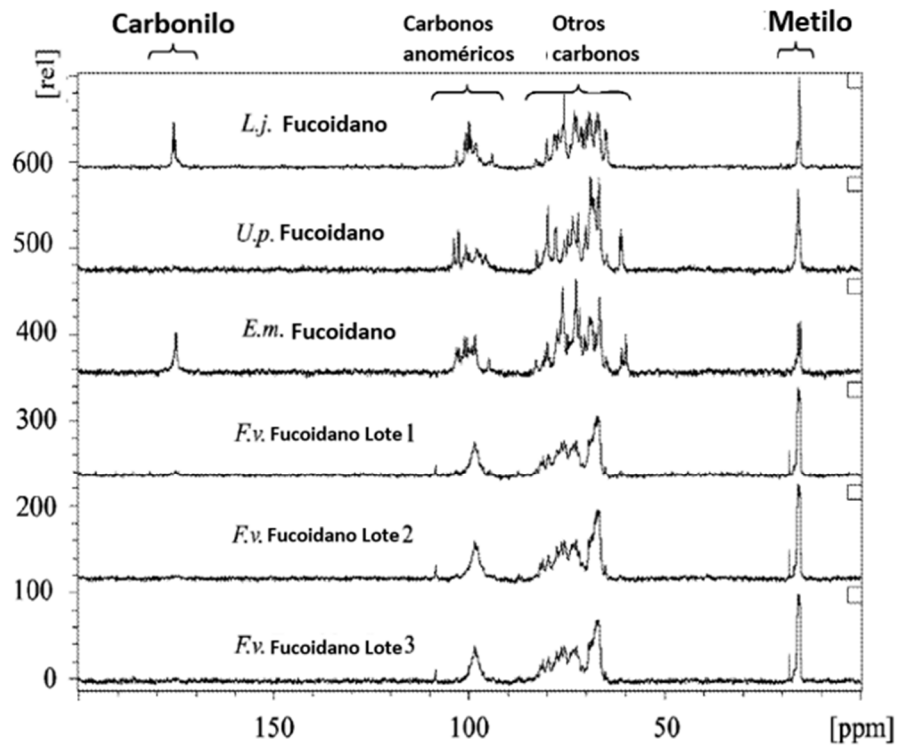


Figura 10

Estructura molecular por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ¹³carbon

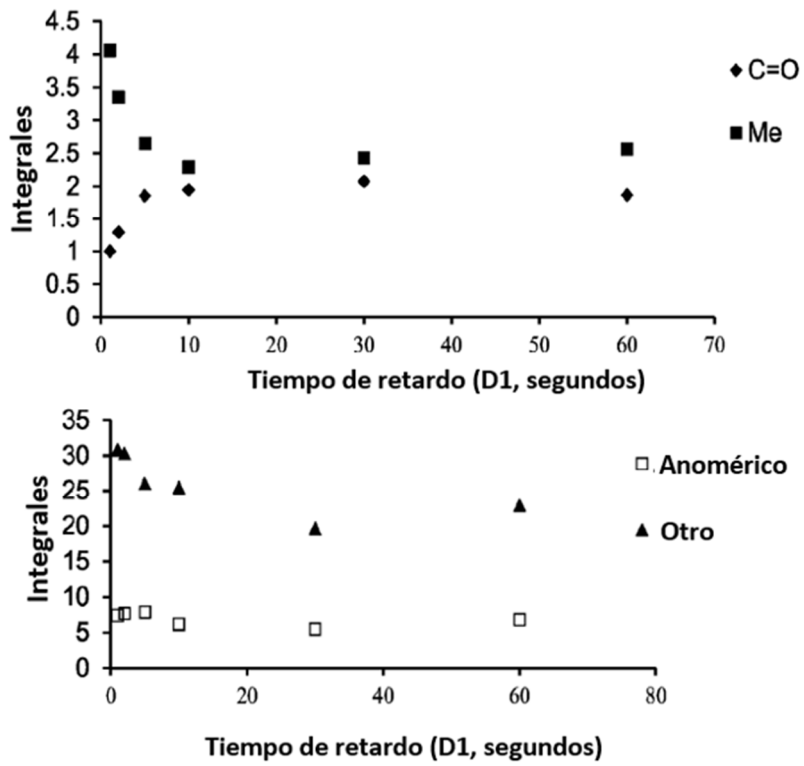


Figura 11

Superposición de índice refractivo de cromatografía de exclusión de tamaño

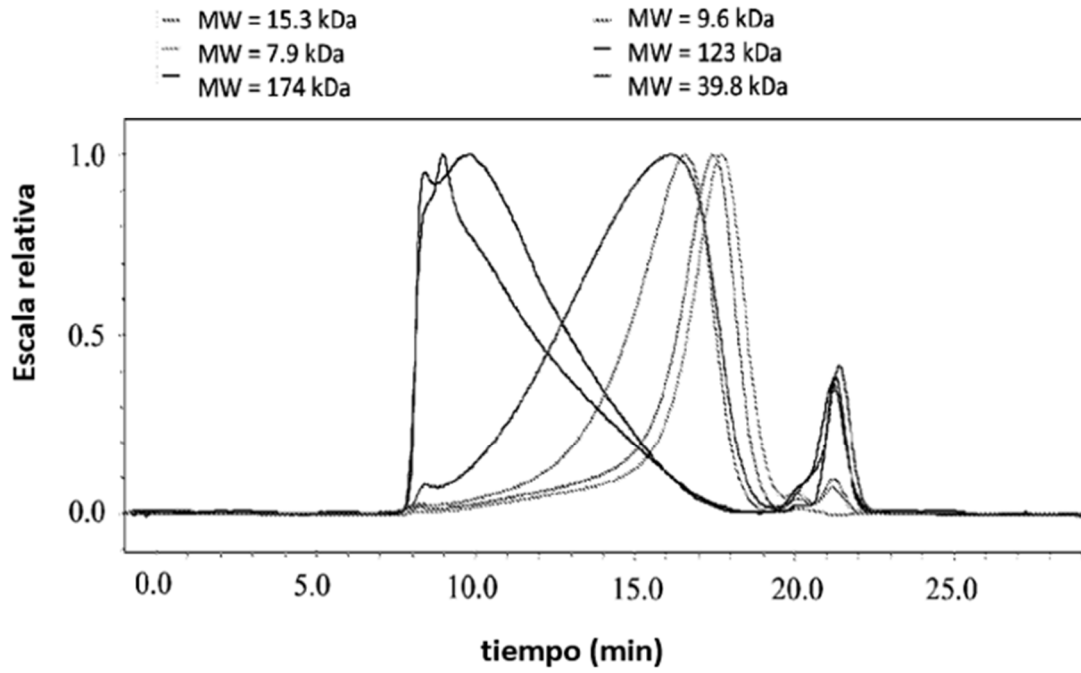


Figura 12

Espectros ^1H y ^{13}C RMN superpuestos de fracciones separadas por tamaño de *F.v.* fucoidano.

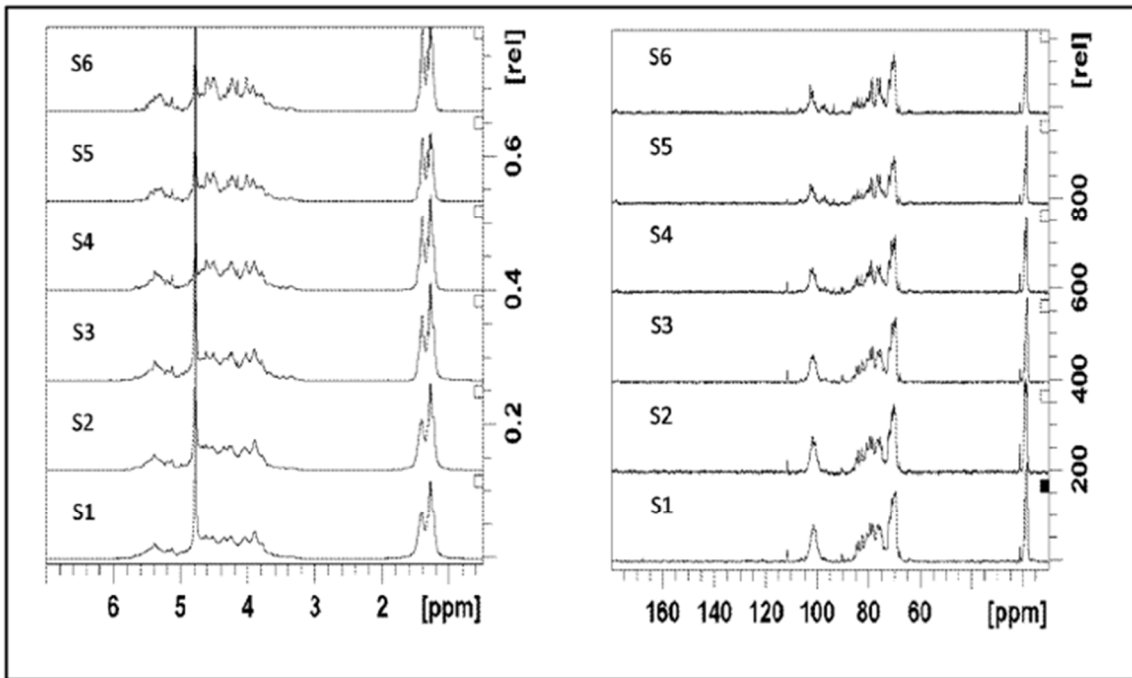


Figura 13

Espectroscopio 2-D RMN COSY y HSQC RMN

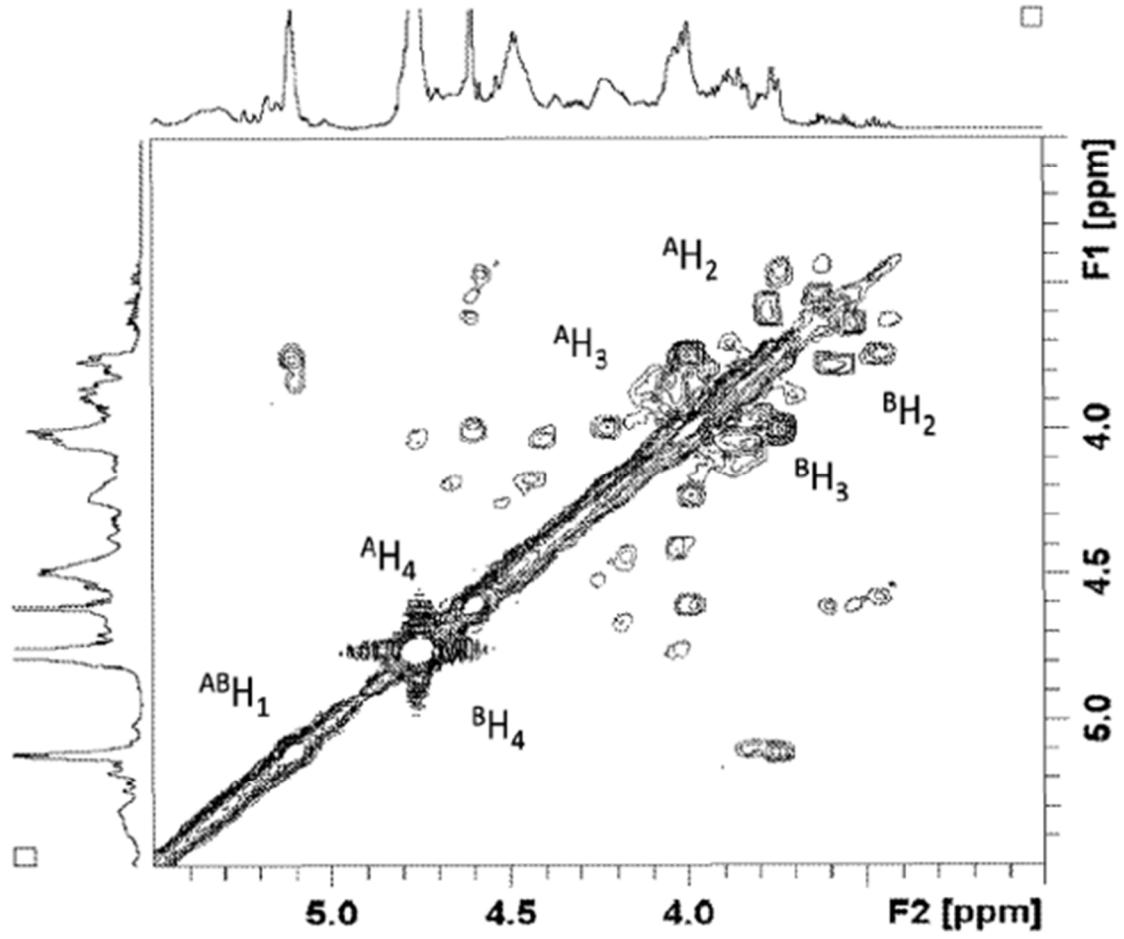


Figura 14a

Espectroscopio 2-D RMN COSY y HSQC RMN

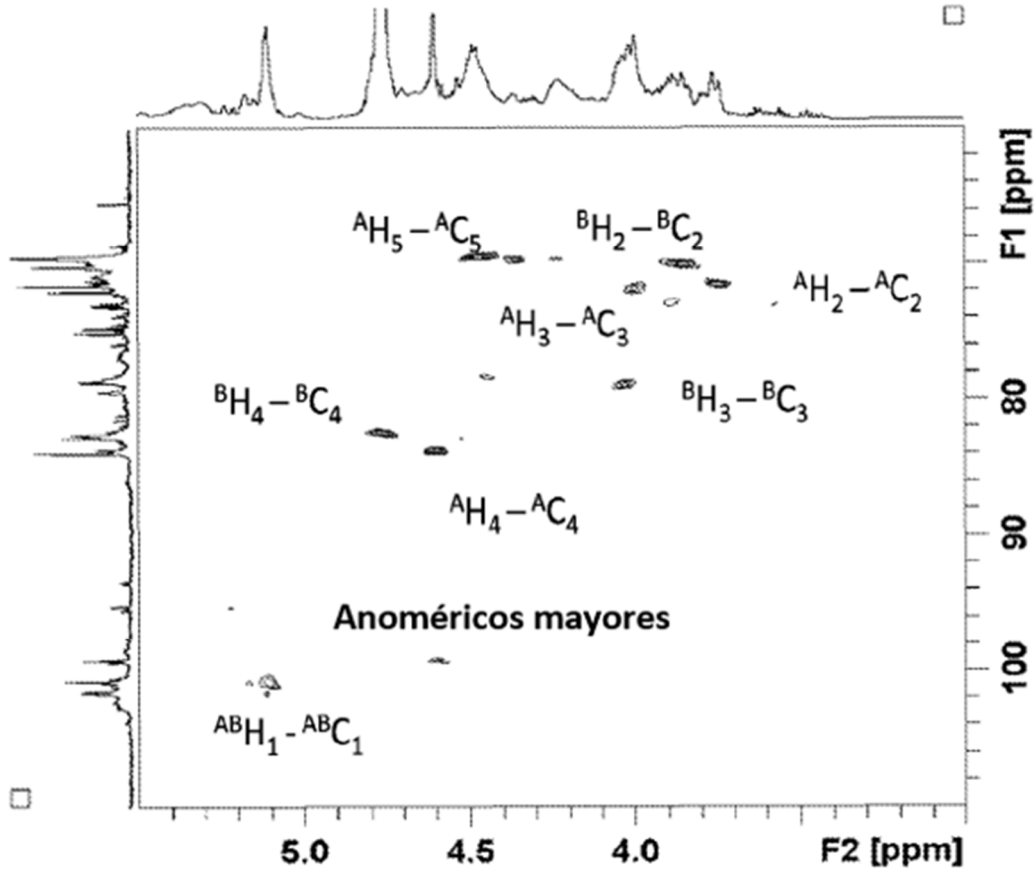


Figura 14b

Espectroscopia 3-D HSQC-TOCSY RMN

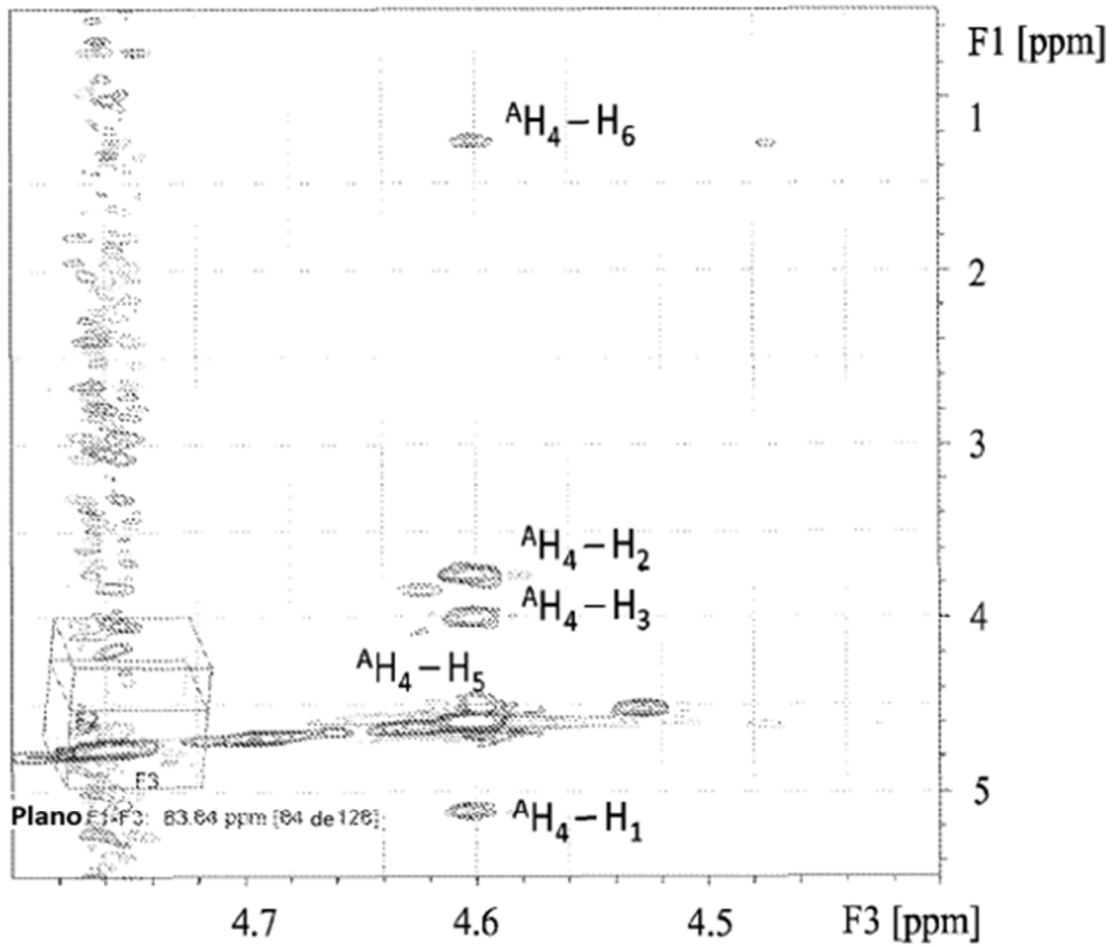
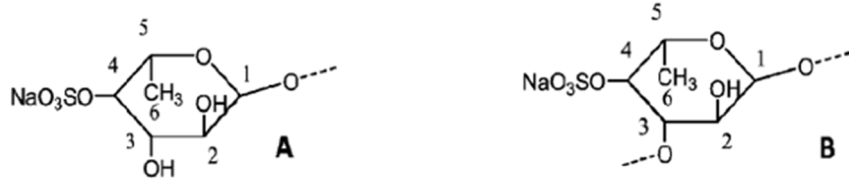


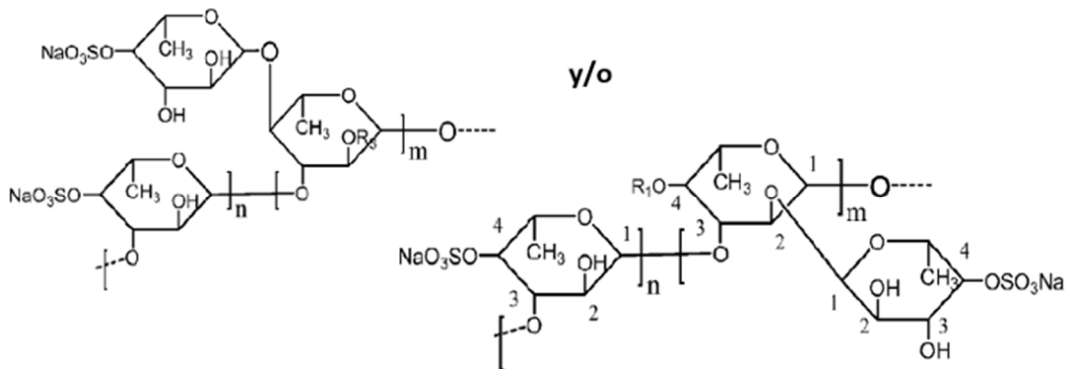
Figura 15

Configuración de sulfatación y enlace glicosídico

Residuos A y B



Estructuras grandes de fracción C6



Donde $R_1 = \text{SO}_3\text{Na}$ (8%, mol%) o H (92%, mol%); $n = 276$; $m = 191$. Estos números fueron calculados utilizando el contenido de azufre y peso molecular de esta fracción

Figura 16

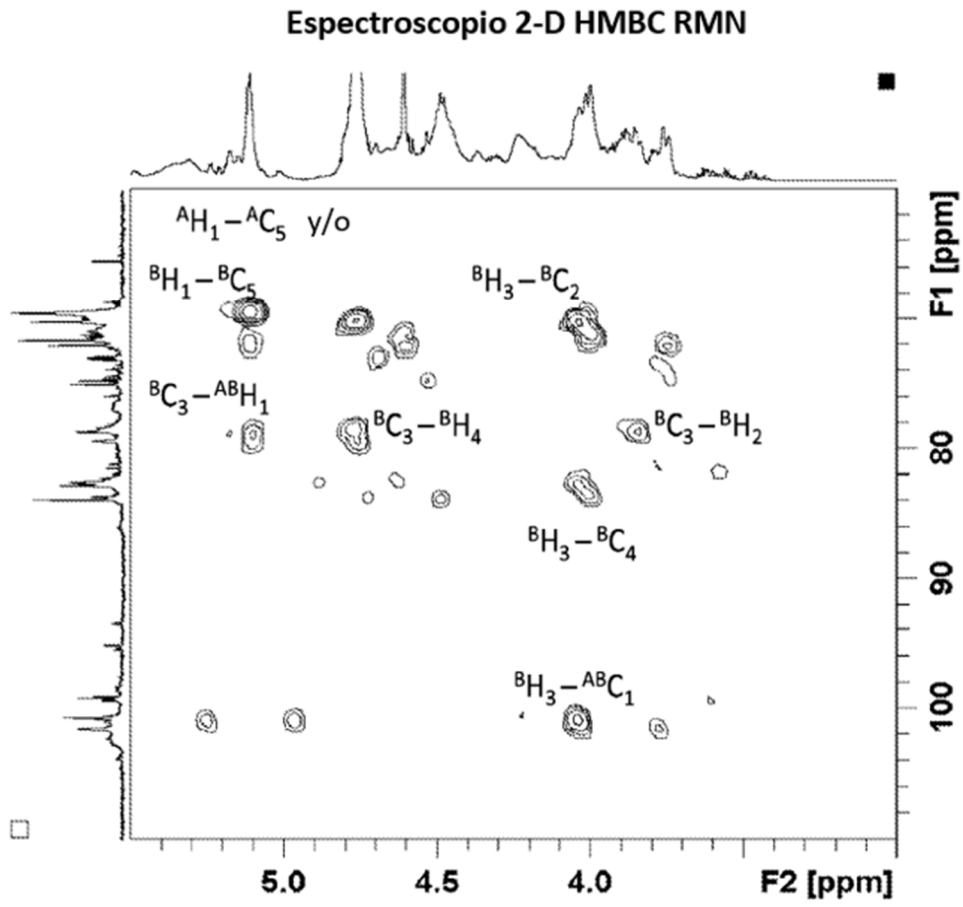


Figura 17

Espectroscopio de ^1H -RMN de NASPs sobresulfatados y desulfatados

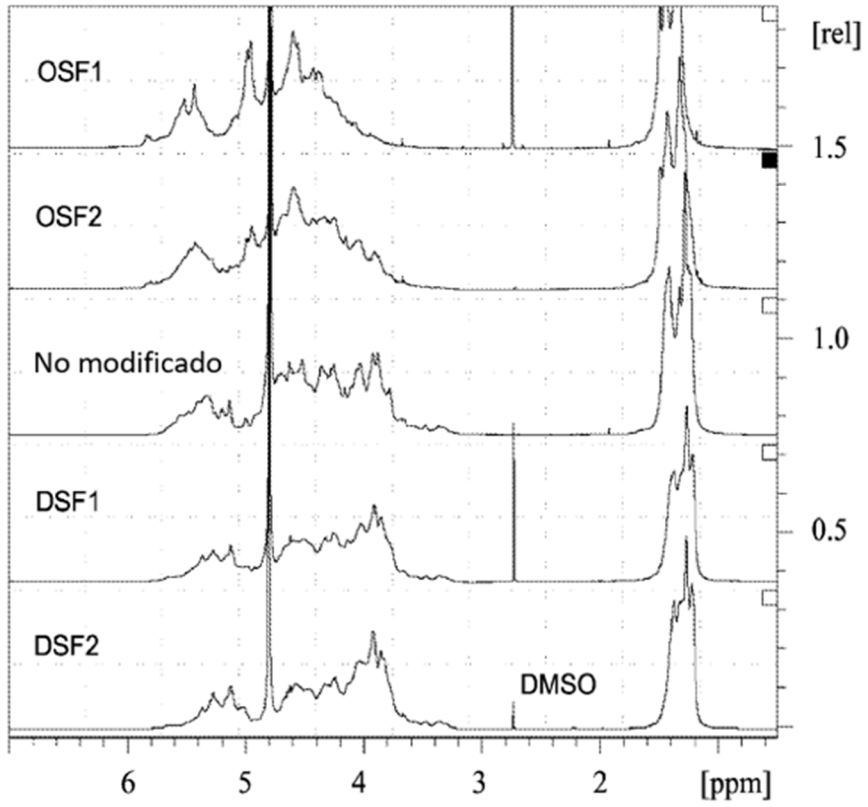


Figura 18