

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 595**

51 Int. Cl.:

A61K 31/795 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2013 PCT/US2013/023919**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116383**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2013 E 13702878 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2809330**

54 Título: **Polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados no anticoagulantes**

30 Prioridad:

30.01.2012 US 201261592554 P

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

25.02.2020

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zählerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

DOCKAL, MICHAEL;

SCHLEIFLINGER, FRITZ;

KNAPPE, SABINE;

TILL, SUSANNE;

HAI, TON y

SANDERS, PAUL

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 744 595 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

Polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados no anticoagulantes

5 **Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/592.554, presentada el 30 de enero de 2012.

10 **Antecedentes de la invención**

La coagulación sanguínea normal es un proceso fisiológico y bioquímico complejo que implica la activación de una cascada de factores de coagulación que conduce a la formación de fibrina y la agregación plaquetaria junto con vasoconstricción local (revisado por Davie, *et al.*, *Biochemistry*, 30:10363, 1991) La cascada de coagulación se compone de una ruta "extrínseca" que se cree que es el medio principal de iniciación de la coagulación normal y una ruta "intrínseca" que contribuye a una respuesta de coagulación expandida. La respuesta normal a una lesión hemorrágica implica la activación de la ruta extrínseca. La activación de la ruta extrínseca se inicia cuando la sangre entra en contacto con el factor tisular (TF), un cofactor para el factor VII que queda expuesto o se expresa en los tejidos después de la lesión. TF forma un complejo con FVII que facilita la producción de FVIIa. FVIIa se asocia luego con TF para convertir FX en la serina proteasa FXa, que es un componente crítico del complejo protrombinasa. La conversión de protrombina en trombina por el complejo FXa/FVa/calcio/fosfolípido estimula la formación de fibrina y la activación de plaquetas, todo lo cual es esencial para la coagulación sanguínea normal. La hemostasia normal se ve mejorada además por los factores IXa y VIIIa de la ruta intrínseca, que también convierten FX en FXa.

La coagulación sanguínea es inadecuada en los trastornos hemorrágicos, que pueden estar provocados por trastornos de coagulación congénitos, trastornos de coagulación adquiridos o estados hemorrágicos inducidos por un traumatismo. La hemorragia es una de las manifestaciones más graves y significativas de enfermedad, y puede producirse a partir de un sitio local o ser generalizada. La hemorragia localizada puede estar asociada con lesiones y puede complicarse aún más por un mecanismo hemostático defectuoso. Las deficiencias congénitas o adquiridas de cualquiera de los factores de coagulación pueden estar asociadas con una tendencia hemorrágica. Los trastornos de coagulación congénitos incluyen hemofilia, un trastorno recesivo ligado al cromosoma X que implica una deficiencia del factor VIII de coagulación (hemofilia A) o factor IX (hemofilia B) y la enfermedad de von Willebrand, un trastorno hemorrágico raro que implica una deficiencia grave del factor de von Willebrand. Los trastornos de coagulación adquiridos pueden surgir en individuos sin antecedentes de hemorragia como resultado de un proceso patológico. Por ejemplo, los trastornos de coagulación adquiridos pueden estar provocados por inhibidores o autoinmunidad contra factores de coagulación sanguínea, tales como factor VIII, factor de von Willebrand, factores IX, V, XI, XII y XIII; o por trastornos hemostáticos tales como los provocados por enfermedad hepática, que pueden estar asociados con una disminución de la síntesis de factores de coagulación. Las deficiencias de factores de coagulación se tratan generalmente mediante el reemplazo del factor, lo que es costoso, incómodo (vía intravenosa) y no siempre eficaz.

El tratamiento de los trastornos de la coagulación sanguínea, incluyendo hemofilia (hem.), la enfermedad de von Willebrand grave (svWD, por sus siglas en inglés) y la deficiencia grave del factor VII, se tratan generalmente con factores de coagulación tales como el factor VIII (usado para tratar hem. y svWD). La desventaja asociada con los tratamientos centrados en la administración de factores de coagulación incluye su alto coste, la necesidad de la administración i.v. de estas proteínas y la generación de anticuerpos que neutralizan los efectos de los factores de coagulación. Hasta aproximadamente el 20% de los pacientes que reciben terapia de reemplazo de factor prolongada pueden generar anticuerpos neutralizantes frente a los factores de reemplazo.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos enfoques terapéuticos para tratar trastornos hemorrágicos. Un único agente farmacéutico que sea seguro, conveniente y eficaz en una amplia gama de trastornos hemorrágicos tendría un impacto favorable sobre la práctica clínica.

55 **Sumario de la invención**

La invención es tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

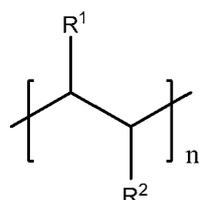
La presente invención proporciona composiciones y métodos para tratar trastornos hemorrágicos usando polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados, no anticoagulantes (NASSP) como procoagulantes. Los NASSP pueden administrarse como agentes únicos, o en combinación entre sí, o con otros agentes hemostáticos. En particular, se proporciona el uso de los NASSP en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, incluyendo trastornos de coagulación congénitos, trastornos de coagulación adquiridos y estados hemorrágicos inducidos por traumatismo.

La presente invención proporciona numerosas ventajas. Por ejemplo, los polímeros como moléculas base para sulfatación o sulfonación están bien definidos estructuralmente, son de bajo peso molecular y están disponibles comercialmente. Además, la sulfatación o la sulfonación química de polímeros, o la síntesis *de novo* de polímeros

sulfatados o sulfonados a partir de monómeros o polímeros no sulfatados, permite el ajuste del grado de sulfatación o sulfonación y el patrón de sulfatación o sulfonación, lo que permite la caracterización de la relación estructura-actividad de los polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados. En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona una forma de dosificación oral que incorpora uno o más polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados de la invención, lo que mejora la atención del paciente a través de una mayor facilidad de administración y cumplimiento del paciente.

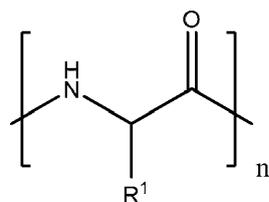
En un aspecto, la invención proporciona un polímero sintético sulfatado o sulfonado con la capacidad de mejorar la coagulación de la sangre de mamíferos *in vivo* y/o *in vitro*. En diversas realizaciones, el polímero sintético sulfatado o sulfonado tiene actividad procoagulante. En diversos aspectos, la actividad procoagulante del polímero sintético sulfatado o sulfonado es de magnitud suficiente para que pueda medirse usando un ensayo convencional, por ejemplo, el ensayo de generación de trombina (TGA).

En diversas realizaciones, la invención proporciona un polímero sintético sulfatado o sulfonado, no sacárido que tiene la fórmula seleccionada de:



(I);

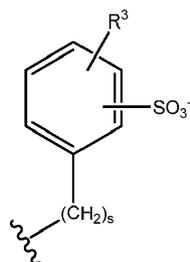
y



(II)

en las que R^1 se selecciona de H, alquilo sustituido o no sustituido y arilo sulfonado. R^2 se selecciona de H, alquilo sustituido o no sustituido y sulfonato, de tal manera que al menos uno de R^1 y R^2 es o incluye un grupo sulfonato o sulfato (por ejemplo, SO_3M^+ o SO_3H ; M^+ es un catión inorgánico u orgánico). En una realización a modo de ejemplo, sólo uno de R^1 y R^2 es o incluye un resto sulfonato o sulfato. El índice n representa un número entero mayor de 0, que significa el número de subunidades repetidas en el polímero. En realizaciones a modo de ejemplo, n se selecciona para proporcionar un polímero con un peso molecular de desde aproximadamente 7 kDa hasta aproximadamente 300 kDa, por ejemplo, desde aproximadamente 9 kDa hasta aproximadamente 200 kDa, por ejemplo, desde aproximadamente 11 kDa hasta aproximadamente 100kDa. Los polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados a modo de ejemplo de la invención proporcionan a un sujeto al que se le administra uno de estos polímeros un efecto procoagulante terapéuticamente relevante. Los compuestos a modo de ejemplo de la invención también ejercen un efecto anticoagulante tras la administración a un sujeto. En diversas realizaciones, los polímeros de la invención no inducen un grado de efecto anticoagulante suficiente como para compensar significativamente, o para compensar completamente el efecto procoagulante del polímero. En una realización a modo de ejemplo, los compuestos de la invención tienen un efecto procoagulante a concentraciones de desde aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 300 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, de aproximadamente 3 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$.

En diversas realizaciones, R^1 es:



(III)

en el que R^3 se selecciona de H y OR^4 . El índice s es 0, 1, 2, 3 o mayor. R^4 se selecciona de H y alquilo sustituido o no sustituido. En diversas realizaciones en las que R^1 es el grupo fenilo sustituido (III), R^2 es H.

Los polímeros que van a usarse según la presente invención se exponen en la figura 3 y en las reivindicaciones adjuntas.

5 En otras realizaciones, el NASSP de la invención disminuye el tiempo de coagulación sanguínea cuando se somete a prueba en el ensayo de coagulación del tiempo de protrombina con dilución de TFPI. En diversas realizaciones, la invención revierte el efecto anticoagulante del TFPI exógeno de longitud completa (flTFPI) en plasma humano. En diversas realizaciones, el compuesto de la invención no interfiere en la acción de TFPI160. En diversas realizaciones, el NASSP de la invención interacciona con el extremo C-terminal de TFPI para proporcionar actividad procoagulante.

10 En una realización a modo de ejemplo, la composición se usa en un método para tratar a un sujeto que necesita una coagulación sanguínea mejorada. El método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polímero sintético sulfatado o sulfonado, no anticoagulante y no sacárido de la invención (NASSP).

15 En determinadas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASSP de la invención al sujeto.

20 En determinadas realizaciones, se administra un NASSP de la invención a un sujeto para tratar un trastorno hemorrágico seleccionado del grupo que consiste en hem. A, hem. B, la enfermedad de von Willebrand, la trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación (por ejemplo, factor XI, factor XII, precalicreína y HMWK), una deficiencia de uno o más factores de coagulación asociados con hemorragia clínicamente significativa (por ejemplo, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y factor de von Willebrands, una deficiencia de vitamina K, un trastorno del fibrinógeno (por ejemplo, afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia), una deficiencia de alfa2-antiplasmina y hemorragia excesiva tal como la provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, trastornos con disminución del número de plaquetas, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo.

25 En determinadas realizaciones, se administra un NASSP a un sujeto para tratar un trastorno de coagulación congénito o un trastorno de coagulación adquirido provocado por una deficiencia de factor sanguíneo. En diversas realizaciones, la deficiencia de factor sanguíneo está provocada por deficiencias de uno o más factores (por ejemplo, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, factor XIII y factor de von Willebrand).

30 En realizaciones a modo de ejemplo, el NASSP de la invención se administra conjuntamente con uno o más NASSP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. En una realización a modo de ejemplo, el NASSP se administra conjuntamente con uno o más NASP. Entre los ejemplos de NASP útiles se incluyen los divulgados en la solicitud de patente estadounidense en tramitación conjunta, de titularidad común n.º 61/592.549, con el expediente de apoderado 008073-5034-PR. En determinadas realizaciones, a un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASSP de la invención en combinación con otro agente terapéutico. Por ejemplo, al sujeto puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASSP de la invención y uno o más factores. Los ejemplos de factores de uso en esta realización incluyen, sin limitación, factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante tal como trombina; un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y quinínogeno de alto peso molecular (HMWK); o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa. Los agentes terapéuticos usados para tratar a un sujeto que tiene un trastorno hemorrágico pueden administrarse en la misma composición o en composiciones diferentes y de manera concurrente, antes o después de la administración de un NASSP de la invención.

35 En diversos aspectos, la invención proporciona un método para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polímero sintético sulfatado o sulfonado, no anticoagulante (NASSP) de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto puede haberse tratado con un anticoagulante incluyendo, pero sin limitarse a, heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), antitrombina III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodos (NAPc2), factor VIIa con el sitio activo bloqueado (factor VIIai), inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, incluyendo fondaparinux, idraparinux, DX-9065a y razaxabano (DPC906), inhibidores de los factores Va y VIIIa, incluyendo proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de trombina, incluyendo hirudina, bivalirudina, argatrobán y ximelagatrán. En determinadas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a un factor de coagulación, incluyendo pero sin limitarse 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 quinínogeno de alto peso molecular (HMWK).

En determinadas realizaciones, un NASSP de la invención puede administrarse conjuntamente con uno o más NASSP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos (por ejemplo, NASP o un factor de coagulación) para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto. Por ejemplo, al sujeto puede administrársele una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASSP de la invención y uno o más NASP y/o factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno 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. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo el factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y quinínogeno de alto peso molecular HMWK; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo el factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa. Los agentes terapéuticos usados en combinación con un NASSP de la invención para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto pueden administrarse en la misma composición o en composiciones diferentes y de manera concurrente, antes o después de la administración del NASSP de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico o invasivo en el que es deseable una mejor coagulación sanguínea. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polímero sintético sulfatado o sulfonado, no anticoagulante (NASSP) de la invención al sujeto. En determinadas realizaciones, el NASSP de la invención puede administrarse conjuntamente con uno o más NASSP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos (por ejemplo, NASP o un factor de coagulación). Por ejemplo, además del NASSP de la invención, al sujeto puede administrársele una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno 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. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo el factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y HMWK; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo el factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa. Los agentes terapéuticos usados para tratar a un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico o invasivo pueden administrarse en la misma composición o en composiciones diferentes y de manera concurrente, antes o después de la administración de la NASSP de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en un sujeto. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASSP de la invención al sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en una muestra biológica. El método incluye combinar la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un polímero sintético sulfatado o sulfonado, no anticoagulante (NASSP) de la invención para inhibir la actividad de TFPI.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un NASSP de la invención. En determinadas realizaciones, el NASSP es un polímero sintético sulfatado o sulfonado en el que el polímero base se selecciona de polivinilo, poliestireno o polianetol. En determinadas realizaciones, la composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición comprende además uno o más NASSP diferentes, y/o uno o más agentes terapéuticos, y/o reactivos. Por ejemplo, la composición puede comprender además uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II y factor de von Willebrands, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa; y/o una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en reactivo de TTPA, tromboplastina, fibrina, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizadas, ácido elágico, sulfátidos y caolín.

Estas y otras realizaciones de la invención objeto se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica a la vista de la divulgación en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra la generación de trombina.

La figura 2 muestra un trombograma calibrado automatizado (CAT, por sus siglas en inglés).

La figura 3 presenta ejemplos de compuestos de la invención y de uso en los métodos de la invención.

Las figuras 4A-E presentan la actividad procoagulante y la ventana procoagulante de polímeros sulfatados, sulfonados y fosforilados. CAT (trombina pico, círculos coloreados; tiempo hasta el pico, círculos de color blanco) de (figura 4A) la sal de sodio de poli(ácido anetolsulfónico), (figura 4B) poli(4-estirenosulfonato de sodio), (figura 4C) la sal de potasio de poli(sulfato de vinilo) y (figura 4D) la sal de sodio de poli(ácido vinilfosfórico) en plasma con

inhibición de FVIII como modelo para la hemofilia inducida por anticuerpos. La generación de trombina se desencadena mediante recalcificación y bajo contenido de factor tisular (1 pM). Los polímeros sulfatados o sulfonados comienzan a aumentar la trombina pico y reducen el tiempo hasta el pico a concentraciones de aproximadamente 0,3 µg/ml, indicativo de su actividad procoagulante. A aproximadamente de 30 a 100 µg/ml de NASSP añadido al plasma con inhibición de FVIII, la generación de trombina es óptima y supera la generación de trombina de una reserva de plasma humano normal (línea de referencia de color negro: trombina pico de una reserva de plasma humano normal). A concentraciones mayores de aproximadamente 100 µg/ml, la trombina pico disminuye y el tiempo hasta el pico aumenta, lo que es indicativo del inicio de sus actividades anticoagulantes. A aproximadamente 300 µg/ml, la trombina pico todavía está por encima del nivel inicial de plasma con inhibición de FVIII (línea de referencia discontinua: trombina pico de un plasma de paciente con inhibición de FVIII) abriendo una gran ventana procoagulante para la eficacia terapéutica. A diferencia de las actividades procoagulantes de los NASSP, la sal de sodio de poli(ácido vinilfosfórico) no mejora la generación de trombina del plasma con inhibición de FVIII. (Figura 4E) Actividad procoagulante y ventana procoagulante de politirosina sulfatada. CAT (trombina pico, círculos coloreados; tiempo hasta el pico de trombina, círculos de color blanco) de politirosina sulfatada en plasma con inhibición de FVIII como modelo para la hemofilia. La generación de trombina se desencadena mediante recalcificación y bajo contenido de factor tisular (1 pM). La politirosina sulfatada comienza a aumentar la trombina pico y reduce el tiempo hasta el pico a concentraciones de aproximadamente 0,3 µg/ml, indicativo de su actividad procoagulante. A partir de aproximadamente 5 µg/ml de politirosina sulfatada añadida a plasma con inhibición de FVIII, la generación de trombina es óptima y mejora significativamente la generación de trombina de una reserva de plasma humano normal (línea de referencia de color negro: trombina pico de una reserva de plasma humano normal). A una concentración de aproximadamente 700 µg/ml, la trombina pico está disminuyendo y el tiempo hasta el pico está aumentando, lo que es indicativo del inicio de sus actividades anticoagulantes. Sólo a aproximadamente 1 mg/ml, la trombina pico alcanza el nivel inicial de plasma con inhibición de FVIII (línea de referencia discontinua: trombina pico de un plasma normal con inhibición de FVIII) abriendo una gran ventana procoagulante para la eficacia terapéutica.

La figura 5 muestra una representación gráfica de un ensayo de TFPI-dPT de poli(4-estirenosulfonato de sodio, Mw = 70 kDa) (PSS). El ensayo se realizó en plasma humano normal con TFPI humano de longitud completa (hufITFPI) a una concentración en plasma de 0,5 µg/ml y CaCl₂ a 8,3 mM. PSS inhibe el fITFPI humano con una CE50 de 0,42 µg/ml.

La figura 6 muestra una representación gráfica de un ensayo de TFPI-dPT de poli(ácido anetolsulfónico, sal de sodio), Mw = 9-11 kDa) (PAS). El ensayo se realizó en plasma humano normal con hufITFPI a una concentración en plasma de 0,5 µg/ml y CaCl₂ a 8,3 mM. PAS inhibe el fITFPI humano con una CE50 de 1,27 µg/ml.

La figura 7 muestra una representación gráfica de un ensayo de TFPI-dPT de poli(sulfato de vinilo, sal de potasio), Mw = 170 kDa) (PVS). El ensayo se realizó en plasma humano normal con hufITFPI a una concentración en plasma de 0,5 µg/ml y CaCl₂ a 8,3 mM. PVS inhibe fITFPI humano con una CE50 de 94,3 µg/ml.

La figura 8 muestra una representación gráfica de un ensayo de TFPI-dPT de poli(ácido vinilfosfórico, sal de sodio), Mw > 200 kDa) (PVP). El ensayo se realizó en plasma humano normal con hufITFPI a una concentración en plasma de 0,5 µg/ml y CaCl₂ a 8,3 mM. PVP no muestra inhibición de fITFPI humano.

La figura 9 muestra una representación gráfica de un ensayo de TFPI-dPT de poli(tirosina) sulfatada (PVP). El ensayo se realizó en plasma humano normal con hufITFPI a una concentración en plasma de 0,5 µg/ml y CaCl₂ a 8,3 mM. PT inhibe fITFPI humano con una CE50 de 51,7 µg/ml.

La figura 10 es una tabulación que compara los valores de CE50 derivados de los ensayos de CAT y los ensayos de TFPI-dPT de NASSP de la invención.

La figura 11 muestra un ensayo de CAT con NASSP de la invención en plasma humano normal. Los NASSP mejoran la generación de trombina a las concentraciones indicadas a diferencia del poli(ácido vinilfosfórico, sal de sodio), (PVP) y el tampón (barras de color blanco; línea de referencia). No se observó mejora de la generación de trombina por los NASSP tras el bloqueo de TFPI por un anticuerpo policlonal anti-TFPI (AF2974, barras coloreadas). Esto sugiere que es necesario TFPI para la acción procoagulante de los NASSP.

La figura 12 muestra un ensayo de CAT con los NASSP de la invención en plasma humano normal. Los NASSP mejoran la generación de trombina a las concentraciones indicadas a diferencia del poli(ácido vinilfosfórico, sal de sodio), (PVP) y el tampón (barras de color gris). La mejora de la generación de trombina por los NASSP se anula por el bloqueo de TFPI usando un anticuerpo anti-TFPI dirigido contra el extremo C-terminal de TFPI (barras coloreadas). El reemplazo por un fragmento de TFPI (aa 1-160) no recupera el efecto procoagulante de los NASSP (barras de color blanco) lo que sugiere que los NASSP de la invención actúan sobre el extremo C-terminal de TFPI. Se observa cierto efecto procoagulante para la poli(tirosina) sulfatada en presencia de TFPI60.

Las figuras 13A-B consisten en una tabla matricial que muestra combinaciones a modo de ejemplo de determinados

tipos de NASSP (basados en su polímero base) con agentes adicionales.

Las figuras 14A-B consisten en una tabla matricial que muestra intervalos de dosificación a modo de ejemplo para el NASSP respectivo en cada una de las combinaciones identificadas en las figuras 13A-B.

Las figuras 15 consisten en una tabla que muestra intervalos de dosificación a modo de ejemplo para determinados agentes adicionales usados en combinación con los NASSP (tales como, por ejemplo, las combinaciones mostradas en figuras 13A-B y las figuras 14A-B).

Las figuras 16A-B muestran las propiedades anticoagulantes de los NASSP a modo de ejemplo de la invención. Los NASSP a modo de ejemplo tienen propiedades anticoagulantes a concentraciones mayores que a las que muestran actividad procoagulante.

Descripción detallada de la invención

Introducción

Los trastornos de la coagulación sanguínea, incluyendo hemofilia, por ejemplo, hem. A y hem. B, la enfermedad grave de von Willebrand (svWD) y la deficiencia grave de factor VII (FVII) se han tratado normalmente mediante reemplazo del factor, por ejemplo, factor VIII para hem. A y svWD, factor IX para hem. B y factor VII(a) para la deficiencia de FVII y otros (revisado en Bishop *et al.* (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3:684-694; Carcao *et al.* (2004) *Blood Rev.*, 18:101-113; Roberts *et al.* (2004) *Anesthesiology* 100:722-730; y Lee (2004) *Int. Anesthesiol Clin.*, 42:59-76). Aunque tales terapias a menudo son eficaces, las características que limitan la utilidad incluyen un alto coste, incomodidad (es decir, administración intravenosa) y generación de anticuerpos neutralizantes (Bishop, *et al.*, citado anteriormente; Carcao *et al.*, citado anteriormente; Roberts *et al.*, citado anteriormente; Lee, citado anteriormente; y Bohn *et al.* (2004) *Hemophilia* 10 Supl., 1:2-8). Aunque el FVIIa se usa cada vez más en diversos trastornos hemorrágicos (Roberts, *et al.*, citado anteriormente), son de interés las terapias procoagulantes de un único compuesto alternativas que carecen de las limitaciones y desventajas mencionadas anteriormente, y con una amplia aplicación.

Un enfoque general para mejorar la hemostasia en individuos con trastornos hemorrágicos es mejorar el inicio de la coagulación regulando por incremento la ruta extrínseca de la coagulación sanguínea. Mientras que las rutas intrínseca y extrínseca de la coagulación contribuyen a la generación de trombina y a la formación de coágulos de fibrina (Davie *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30:10363-10370), la ruta mediada por el factor tisular (TF) o extrínseca es crítica para el inicio y contribuye a la propagación de la coagulación *in vivo* (Mann (2003) *Chest*, 124 (3 Supl.): 1S-3S; Rapaport *et al.* (1995) *Thromb. Haemost.*, 74:7-17). Un mecanismo potencial para regulación por incremento de la actividad de la ruta extrínseca es la atenuación del inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI). TFPI es un inhibidor de proteinasa de tipo Kunitz de FVIIa/TF que proporciona regulación por disminución tónica de la activación de la ruta extrínseca (véase Broze (1992) *Semin. Hematol.*, 29:159-169; Broze (2003) *J. Thromb. Haemost.*, 1:1671-1675; y Johnson *et al.* (1998) *Coron. Artery Dis.*, 9(2-3):83-87 para su revisión). De hecho, la deficiencia heterocigota de TFPI en ratones puede provocar un aumento de la formación de trombos (Westrick *et al.* (2001) *Circulation*, 103:3044-3046), y la mutación del gen TFPI es un factor de riesgo de trombosis en humanos (Kleesiek *et al.* (1999) *Thromb. Haemost.*, 82:1-5). Nordfang describió la regulación de la coagulación en la hemofilia a través de la selección como diana de TFPI, *et al.* y Wun *et al.*, que mostraron que los anticuerpos anti-TFPI podrían acortar el tiempo de coagulación del plasma hemofílico (Nordfang *et al.* (1991) *Thromb. Haemost.*, 66:464-467; Welsch *et al.* (1991) *Thromb. Res.*, 64:213-222) y que la IgG anti-TFPI mejoró el tiempo de hemorragia de conejos con deficiencia de factor VIII (Erhardtsen *et al.* (1995) *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 6:388-394).

Tal como se describe en el presente documento, determinados polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados de la invención (NASSP) inhiben la actividad anticoagulante a concentraciones menores que las concentraciones a las que el NASSP presenta una anticoagulación significativa. Tales moléculas son útiles en entornos en los que la formación de coágulos se ve comprometida.

Antes de describir la presente invención con detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a formulaciones o parámetros de proceso particulares. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el propósito de describir realizaciones particulares de la invención solamente, y no pretende ser limitativa.

Aunque pueden usarse varios métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento.

Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan tal como se indica a continuación.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un(o)”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contenido indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “un NASSP” incluye una mezcla de dos o más de tales agentes, y similares.

Un “NASSP” tal como se usa en el presente documento se refiere a un polímero sintético sulfatado o sulfonado que presenta actividad anticoagulante en un ensayo de coagulación del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) que no es más de una tercera parte, y preferiblemente menos de una décima parte, el aumento anticoagulante de la actividad del tiempo de coagulación de heparina no fraccionada (por ejemplo, medido mediante un aumento en $\mu\text{g/ml}$). Los NASSP de la invención pueden sintetizarse *de novo* y pueden oscilar en peso molecular desde aproximadamente 10 daltons hasta aproximadamente 1.000.000 de daltons, tal como por ejemplo, desde aproximadamente 100 daltons hasta aproximadamente 900.000 daltons, tal como desde aproximadamente 500 daltons hasta aproximadamente 500.000 daltons, tal como desde aproximadamente 1000 daltons hasta aproximadamente 250.000 daltons, incluyendo de aproximadamente 5000 daltons a aproximadamente 150.000 daltons. Los NASSP pueden oscilar en peso molecular promedio desde aproximadamente 10 daltons hasta aproximadamente 500.000 daltons, tal como desde aproximadamente 100 daltons hasta aproximadamente 300.000 daltons, tal como desde aproximadamente 1000 daltons hasta aproximadamente 250.000 daltons, incluyendo de aproximadamente 1000 daltons a aproximadamente 150.000 daltons. Los NASSP de la invención pueden usarse en los métodos de la invención, entre otros para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, particularmente aquellos asociados con deficiencias de factores de coagulación o para revertir los efectos de anticoagulantes. La capacidad de los NASSP de la invención para fomentar la coagulación y reducir la hemorragia se determina fácilmente usando varios ensayos de coagulación y hemostáticos globales *in vitro* (por ejemplo, ensayos de TFPI-dPT y CAT) y modelos de hemorragia *in vivo* (por ejemplo, transección de la cola, corte transversal, tiempo de coagulación sanguínea total o determinación del tiempo de hemorragia de la cutícula en ratones o perros hemofílicos). Véase, por ejemplo, PDR Staff. Physicians' Desk Reference. 2004, Anderson *et al.* (1976) *Thromb. Res.*, 9:575-580; Nordfang *et al.* (1991) *Thromb Haemost.*, 66:464-467; Welsch *et al.* (1991) *Thrombosis Research*, 64:213-222; Broze *et al.* (2001) *Thromb Haemost.*, 85:747-748; Scallan *et al.* (2003) *Blood*, 102:2031-2037; Pijnappels, *et al.* (1986) *Thromb. Haemost.*, 55:70-73; y Giles *et al.* (1982) *Blood*, 60:727-730.

Un “procoagulante” se usa en el presente documento en su sentido convencional para referirse a cualquier factor o reactivo capaz de iniciar o acelerar la formación de coágulos. Los procoagulantes a modo de ejemplo incluyen un NASSP de la invención, un factor de coagulación o un reactivo capaz de iniciar o acelerar la formación de coágulos. Los procoagulantes a modo de ejemplo de uso en una composición de la invención incluyen cualquier activador de las rutas de coagulación intrínseca o extrínseca, tales como un NASSP, un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIIa y factor VIIIa, precalicreína, HMWK, factor tisular, factor VIIa y factor Va. Otros reactivos que fomentan la coagulación incluyen calicreína, iniciador de TTPA (es decir, un reactivo que contiene un fosfolípido y un activador de contacto), el veneno de víbora de Russel (VVR) y la tromboplastina (para dPT). Los activadores de contacto que pueden usarse en los métodos de la invención como reactivos procoagulantes incluyen partículas de sílice micronizadas, ácido elágico, sulfátidos, caolín o similares conocidos por los expertos en la técnica. Los procoagulantes pueden proceder de un extracto natural en bruto, una muestra de sangre o plasma, aislada y sustancialmente purificada, sintética o recombinante. Los procoagulantes pueden incluir factores de coagulación que se producen de manera natural o fragmentos, variantes o derivados modificados covalentemente de los mismos que conservan la actividad biológica (es decir, fomentan la coagulación). Los expertos en la técnica pueden determinar las concentraciones y dosificaciones óptimas del procoagulante para tratar una enfermedad seleccionada.

El término “polisacárido”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que comprende una pluralidad (es decir, dos o más) de residuos de sacárido unidos covalentemente. Las uniones pueden ser naturales o no naturales. Las uniones naturales incluyen, por ejemplo, enlaces glicosídicos, mientras que las uniones no naturales pueden incluir, por ejemplo, restos de unión a éster, amida u oxima. Los polímeros pueden tener cualquiera de una amplia gama de valores de peso molecular promedio (MW), pero son generalmente de al menos aproximadamente 100 daltons. Por ejemplo, los polímeros pueden tener pesos moleculares de al menos aproximadamente 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10.000, 20.000, 30.000, 50.000, 100.000, 500.000 daltons o incluso mayor. Los polímeros pueden tener estructuras de cadena lineal o ramificadas. Los polímeros pueden incluir fragmentos de polímeros generados mediante degradación (por ejemplo, hidrólisis) de polímeros más grandes. La degradación puede lograrse mediante cualquier protocolo conveniente incluyendo el tratamiento de polímeros con ácido, base, calor, oxidantes o enzimas para producir polímeros fragmentados. Los polímeros pueden alterarse químicamente y pueden modificarse, incluyendo, pero sin limitarse a, sulfatación, polisulfuración, esterificación y metilación.

En una realización a modo de ejemplo, el NASSP de la invención no es un polisacárido. Los NASSP a modo de ejemplo incluyen una subunidad de sacárido. En diversas realizaciones, el NASSP de la invención se basa en un armazón de poli(vinilo) que tiene uno o más restos sulfato o sulfonato unidos covalentemente de manera directa al armazón o a un grupo colgante del armazón, por ejemplo, un resto arilo o heteroarilo. En diversas realizaciones, el armazón es un armazón de poli(aminoácido) en el que los monómeros se unen covalentemente a través de enlaces peptídicos. El resto sulfato o sulfonato se une covalentemente de manera directa al armazón o a un resto colgante

del almacén, por ejemplo, un resto arilo o heteroarilo.

El “peso molecular”, tal como se comenta en el presente documento, puede expresarse o bien como un peso molecular promedio en número o bien como un peso molecular promedio en peso. A menos que se indique de otro modo, todas las referencias al peso molecular en el presente documento se refieren al peso molecular promedio en peso. Ambas determinaciones de peso molecular, promedio en número y promedio en peso, pueden medirse usando, por ejemplo, cromatografía de permeación en gel u otras técnicas de cromatografía de líquidos.

“Farmacéuticamente aceptable” significa lo que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y no es indeseable ni biológicamente ni de otro modo e incluye lo que es aceptable tanto para uso veterinario como para uso farmacéutico humano.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se usa en el presente documento significa la cantidad de un compuesto, material o una composición que comprende un compuesto de la presente invención que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado, en una relación riesgo/beneficio razonable, tal como los que son aplicables generalmente al tratamiento del trastorno hemorrágico usando productos farmacéuticos convencionales en la técnica. La “dosis o cantidad terapéuticamente eficaz” de un NASSP, factor sanguíneo u otro agente terapéutico se refiere a una cantidad de esta sustancia que, cuando se administra tal como se describe en el presente documento, produce una respuesta terapéutica positiva, tal como hemorragia reducida o tiempos de coagulación más cortos.

El término “sales farmacéuticamente aceptables” es generalmente relevante para sales tales como $-\text{SO}_3-\text{M}^+$ y $-\text{OSO}_3-\text{M}^+$ e incluye sales de los compuestos activos que se preparan con bases o ácidos relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares que se encuentren en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, pueden obtenerse sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, o bien pura o bien en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, o bien puro o bien en un disolvente inerte adecuado. Entre los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se incluyen los derivados de ácidos inorgánicos como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato, y similares, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galactunónico, y similares (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Science*, 66:1-19 (1977)). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición o bien de base o bien de ácido.

Cuando un residuo se define como “ SO_3^- ”, entonces la fórmula debe incluir opcionalmente un contraión catiónico orgánico o inorgánico. Preferiblemente, la forma de sal resultante del compuesto es farmacéuticamente aceptable. Esta estructura también engloba las especies protonadas, “ SO_3H ”.

Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferiblemente poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma original del compuesto con los propósitos de la presente invención.

El término “trastorno hemorrágico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier trastorno asociado con una hemorragia excesiva, tal como un trastorno de coagulación congénito, un trastorno de coagulación adquirido o un estado hemorrágico inducido por traumatismo. Tales trastornos hemorrágicos incluyen, pero no se limitan a, hem. A, hem. B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación, tales como factor XI, factor XII, precalicreína y HMWK, una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragias clínicamente significativas, tales como 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 del fibrinógeno, incluyendo afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa2-antiplasmina y hemorragia excesiva tal como la provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo.

Por “sujeto” se entiende cualquier miembro del subfilo *Chordata* incluyendo, sin limitación, los humanos y otros primates, incluyendo los primates no humanos tales como los chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y

gatos; animales de laboratorio, incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluidas aves domésticas, salvajes y de caza, tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos, y similares. El término no indica una edad particular. Por tanto, tanto los individuos adultos como los recién nacidos son de interés.

5 El término "paciente" se usa en su sentido convencional para referirse a un organismo vivo que padece o es propenso a un estado que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de un NASSP de la invención, e incluye especies humanas y no humanas.

10 "TFPI" y "flTFPI", tal como se usan en el presente documento, se refieren al inhibidor de la ruta del factor tisular y al inhibidor de la ruta del factor tisular de longitud completa, respectivamente.

"TFPI160" se refiere a un polipéptido que incluye los aminoácidos 1-160, que incluyen los dominios KD1 y KD2, de TFPI. El KD3 y el extremo C-terminal de TFPI de longitud completa están ausentes.

15 **Las realizaciones**

Diversos aspectos de la invención incluyen métodos para mejorar la coagulación sanguínea en un sujeto. En la práctica de métodos según determinadas realizaciones, se administra una cantidad de un polímero sintético sulfatado o sulfonado no anticoagulante (NASSP) a un sujeto de una manera suficiente para mejorar la coagulación sanguínea en el sujeto. También se proporcionan composiciones y kits para poner en práctica los métodos de la invención.

25 Antes de que la invención se describa con mayor detalle, debe entenderse que la invención no se limita a realizaciones particulares descritas en el presente documento, ya que tales realizaciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y la terminología no pretende ser limitativa. El alcance de la invención estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo otra cosa, entre los límites superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido está englobado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están englobados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención. Determinados intervalos se presentan en el presente documento con valores numéricos que están precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se usa en el presente documento para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como para un número que está cerca de o es aproximadamente el número que precede el término. Al determinar si un número está cerca de o es aproximadamente un número citado específicamente, el número no citado que está cerca o se aproxima puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número citado 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 descrita en el presente documento no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, lo que puede necesitar que se confirme independientemente.

50 Cabe señalar que las reclamaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base de antecedentes para el uso de una terminología exclusiva tal como "únicamente", "sólo" y similares en relación con la cita de elementos de reivindicación o el uso de una limitación "negativa". Tal como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene características y componentes discretos que pueden separarse fácilmente de o combinarse con las características de cualquiera de las otras realizaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la invención. Cualquier método citado puede llevarse a cabo en el orden de eventos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible. Aunque cualquier material y método similar o equivalente a los descritos en el presente documento también pueden usarse en la práctica o prueba de la invención, ahora se describen materiales y métodos ilustrativos representativos.

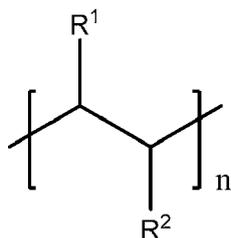
60 A. Los NASSP

En un aspecto, la invención proporciona un polímero sintético sulfatado o sulfonado con la capacidad de mejorar la coagulación sanguínea de mamífero *in vivo* o *in vitro*. En diversas realizaciones, el polímero sintético sulfatado o sulfonado tiene actividad procoagulante. En diversos aspectos, la actividad procoagulante del polímero de la invención es de magnitud suficiente que puede medirse usando un ensayo de coagulación convencional, por ejemplo el ensayo de generación de trombina (TGA, por sus siglas en inglés).

Los polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados a modo de ejemplo de la invención proporcionan a un sujeto al que se le administra uno de estos polímeros un efecto procoagulante terapéuticamente eficaz. Los compuestos a modo de ejemplo de la invención también ejercen un efecto anticoagulante tras la administración a un sujeto; en diversas realizaciones, los polímeros de la invención no inducen un grado de efecto anticoagulante suficiente como para compensar completamente el efecto procoagulante terapéuticamente eficaz del polímero. Los NASSP a modo de ejemplo de la invención son procoagulantes a una concentración de desde aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 700 $\mu\text{g/ml}$ de plasma (por ejemplo, plasma humano), por ejemplo, desde aproximadamente 0,3 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 600 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 3 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 400 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, desde aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 300 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 200 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma. Los NASSP a modo de ejemplo de la invención son sustancialmente no anticoagulantes a las concentraciones mencionadas anteriormente, ya que la generación de trombina está por encima del nivel plasmático de hemofilia tal como se mide en un ensayo convencional tal como trombografía calibrada automatizada (CAT, por sus siglas en inglés), de la que se exponen ejemplos en el presente documento. Véanse, por ejemplo, el ejemplo 1 y las figuras 4A-E. Tanto el efecto procoagulante como la trombina pico pueden medirse mediante CAT.

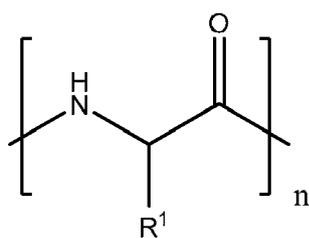
Los NASSP a modo de ejemplo de la invención son polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados con actividad procoagulante y actividad anticoagulante. Las propiedades anticoagulantes de los NASSP potenciales se determinan usando el ensayo de coagulación del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa). Los NASSP a modo de ejemplo de la invención presentan no más de la mitad, preferiblemente no más de una tercera parte, y preferiblemente menos de una décima parte, de la actividad anticoagulante (medida mediante el aumento del tiempo de coagulación) de heparina no fraccionada.

En diversas realizaciones, la invención proporciona un polímero sintético sulfatado o sulfonado, no sacárido que tiene la fórmula seleccionada de:



(I);

y



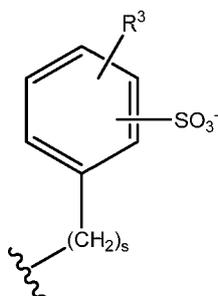
(II)

en las que R^1 se selecciona de H, alquilo sustituido o no sustituido y arilo sulfonado. R^2 se selecciona de H, alquilo sustituido o no sustituido y sulfonato, de tal manera que al menos uno de R^1 y R^2 es o incluye un grupo sulfonato o sulfato (por ejemplo, SO_3M^+ o SO_3H ; M^+ es un catión inorgánico u orgánico). En una realización a modo de ejemplo, sólo uno de R^1 y R^2 incluye un resto sulfonato o sulfato. El índice n representa un número entero mayor de 0, que significa el número de subunidades repetidas en el polímero. En realizaciones a modo de ejemplo, n se selecciona para proporcionar un polímero con un peso molecular de desde aproximadamente 7 kDa hasta aproximadamente 300 kDa, por ejemplo, desde aproximadamente 9 kDa hasta aproximadamente 200 kDa, por ejemplo, desde aproximadamente 11 kDa hasta aproximadamente 100 kDa. En una realización a modo de ejemplo, el valor de n se selecciona de tal manera que el polímero tenga un peso molecular que no sea de más de aproximadamente 300 kDa, no más de aproximadamente 250 kDa, no más de aproximadamente 200 kDa, no más de 150 kDa, no más de aproximadamente 100 kDa, no más de aproximadamente 50 kDa, no más de aproximadamente 25 kDa o no más de aproximadamente 10 kDa. En una realización a modo de ejemplo, el valor de n se selecciona de tal manera que el polímero tenga un peso molecular de no más de aproximadamente 9 kDa, no más de aproximadamente 8 kDa, no más de aproximadamente 7 kDa, no más de aproximadamente 6 kDa, no más de aproximadamente 5 kDa, no más de aproximadamente 4 kDa, no más de aproximadamente 3 kDa o no más de aproximadamente 2 kDa.

Los polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados a modo de ejemplo de la invención se caracterizan por proporcionar a un sujeto al que se le administra uno de estos polímeros un efecto procoagulante terapéuticamente relevante. Los compuestos a modo de ejemplo de la invención también ejercen un efecto anticoagulante tras la administración a un sujeto. En diversas realizaciones, los polímeros de la invención no inducen un grado de efecto anticoagulante suficiente como para compensar completamente el efecto procoagulante del polímero. Los NASSP a modo de ejemplo de la invención son procoagulantes a una concentración de desde aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 700 $\mu\text{g/ml}$ de plasma (por ejemplo, plasma humano), por ejemplo, desde aproximadamente 0,3 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 600 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 3 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 400 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, desde aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 300 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 200 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma.

En diversas realizaciones, los compuestos de la invención tienen un efecto procoagulante a una concentración de no más de aproximadamente 400 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, no más de aproximadamente 350 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, no más de aproximadamente 300 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, no más de aproximadamente 250 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, no más de aproximadamente 200 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, no más de aproximadamente 150 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, no más de aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, no más de aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$.

En diversas realizaciones, R^1 es:



(III)

en la que R^3 se selecciona de H y OR^4 . El índice n es 0, 1, 2, 3 o mayor. R^4 se selecciona de H y alquilo sustituido o no sustituido. En diversas realizaciones en las que R^1 es el grupo fenilo sustituido (III), R^2 es H.

Los polímeros que van a usarse según la presente invención se exponen en la figura 3 y en las reivindicaciones adjuntas.

En otras realizaciones, el NASSP de la invención disminuye el tiempo de coagulación sanguínea cuando se somete a prueba en el ensayo de coagulación de tiempo de protrombina con dilución de TFPI (TFPI-dPT). En diversas realizaciones, un NASSP de la invención revierte el efecto anticoagulante de flTFPI exógeno en plasma humano. En diversas realizaciones, el compuesto de la invención interfiere en la acción de TFPI. En diversas realizaciones, el NASSP de la invención interacciona con el extremo C-terminal de TFPI para proporcionar actividad procoagulante.

En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un polímero sintético sulfatado o sulfonado con actividad procoagulante, que se basa en polivinilo, poliestireno, politirosina o polianetol.

En diversas realizaciones, la invención proporciona NASSP que incluyen al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15% o al menos aproximadamente el 20% de azufre. En una realización a modo de ejemplo, esta cantidad de azufre se determina mediante análisis elemental del NASSP.

En una realización a modo de ejemplo, el NASSP se caracteriza por tener efectos procoagulantes en un ensayo convencional para esta propiedad.

En una realización a modo de ejemplo, el efecto procoagulante es suficiente para que el NASSP se use en un método para tratar a un sujeto que necesita una coagulación sanguínea mejorada. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polímero sintético sulfatado o sulfonado, no anticoagulante y no sacárido (NASSP) al sujeto.

En otras realizaciones, el NASSP se selecciona de uno o más fragmentos de bajo peso molecular de los compuestos enumerados previamente. En realizaciones preferidas, el fragmento de NASSP disminuye el tiempo de coagulación sanguínea cuando se somete a prueba en el ensayo de TFPI-dPT. En una realización, el NASSP es un fragmento de un polímero de sulfato o sulfonato que disminuye el tiempo de coagulación sanguínea cuando se

somete a prueba en el ensayo de TFPI-dPT. En una realización a modo de ejemplo, estos fragmentos tienen las propiedades descritas anteriormente con respecto al polímero que tiene un efecto procoagulante terapéuticamente eficaz incluso si este efecto se compensa por sus propiedades anticoagulantes.

- 5 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un NASSP formulado conjuntamente con uno o más NASSP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos.

La capacidad de los NASSP para fomentar la coagulación y reducir la hemorragia se determina fácilmente usando varios ensayos de coagulación *in vitro* (por ejemplo, TFPI-dPT, ensayos de generación de trombina y tromboelastometría rotacional (ROTEM) y modelos de hemorragia *in vivo* (por ejemplo transección de la cola o determinación del tiempo de hemorragia de la cutícula en ratones o perros hemofílicos). Véanse, por ejemplo, PDR Staff. Physicians' Desk Reference, 2004, Nordfang, *et al.* (1991) *Thromb Haemost.*, 66:464-467; Anderson *et al.* (1976) *Thromb. Res.*, 9:575-580; Welsch *et al.* (1991) *Thrombosis Research*, 64:213-222; Broze *et al.* (2001) *Thromb Haemost.*, 85:747-748; Scallan *et al.* (2003) *Blood*, 102:2031-2037; Pijnappels, *et al.* (1986) *Thromb. Haemost.*, 55:70-73; y Giles, *et al.* (1982) *Blood*, 60:727-730. Los ensayos de coagulación pueden realizarse en presencia de NASSP y uno o más factores sanguíneos, procoagulantes u otros reactivos. Por ejemplo, pueden añadirse uno o más factores de coagulación, incluyendo pero sin limitarse a, factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y factor VIIIa; y/o uno o más reactivos, incluyendo pero sin limitarse a, reactivo de TTPA, tromboplastina, fibrina, TFPI, veneno de víbora de Russell, partículas de sílice micronizadas, ácido elálgico, sulfátidos y caolín.

Los ejemplos y las figuras adjuntas al presente documento confirman que los agentes a los que se hace referencia en el presente documento como NASSP son verdaderamente "no anticoagulantes" es decir, no aumentan significativamente los tiempos de coagulación dentro de un intervalo de concentración seleccionado. Tales compuestos pueden usarse en los métodos y las composiciones de la presente invención siempre que cualquier actividad anticoagulante que puedan presentar sólo aparezca a concentraciones significativamente mayores que la concentración a la que presentan actividad procoagulante. La razón entre la concentración a la que se producen propiedades anticoagulantes no deseadas y la concentración a la que se producen las actividades procoagulantes deseadas se denomina índice procoagulante (o, por ejemplo, índice terapéutico) para el NASSP en cuestión. El índice procoagulante para los NASSP de la presente invención puede ser de aproximadamente 5, 10, 30, 100, 300, 1000 o más.

B. Composiciones farmacéuticas

En diversas realizaciones, el NASSP de la invención se incorpora en una formulación farmacéutica. En diversas realizaciones, dependiendo de los efectos deseados y la potencia de los NASSP, pueden formularse conjuntamente uno o más NASSP. Por ejemplo, dos o más NASSP pueden formularse conjuntamente, tal como tres o más NASSP e incluyendo cuatro o más NASSP. Cuando se emplea más de un NASSP, el porcentaje en masa de cada NASSP en la composición puede variar, oscilando desde el 1% o más de la masa total de la composición, tal como el 2% o más, tal como el 5% o más, tal como el 10% o más, tal como el 25% o más e incluyendo como el 50% o más de la masa total de la composición.

En diversas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de la invención contienen opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, hidratos de carbono, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, surfactantes, tampones, ácidos, bases, y combinaciones de los mismos. Los excipientes líquidos incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina, aceites vegetales, fosfolípidos y surfactantes. Un hidrato de carbono tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar pueden estar presentes como excipiente. Los excipientes de hidratos de carbono específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polímeros, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil-sorbitol, mioinositol, y similares. El excipiente también puede incluir una sal o un tampón inorgánico tal como ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico de sodio, y combinaciones de los mismos.

Una composición de la invención también puede incluir un agente antimicrobiano para impedir o disuadir el crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitativos de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timersol, y combinaciones de los mismos.

También puede estar presente un antioxidante en la composición. Los antioxidantes se usan para impedir la oxidación, impidiendo así el deterioro del NASSP u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, formaldehido-

sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio, y combinaciones de los mismos.

Puede estar presente un surfactante como excipiente. Los surfactantes a modo de ejemplo incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80", y compuestos Pluronic tales como F68 y F88 (BASF, Mount Olive, N.J.); ésteres de sorbitano; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como el colesterol; agentes quelantes, tales como EDTA; y zinc y otros cationes adecuados de este tipo.

Pueden estar presentes ácidos o bases como excipiente en la composición. Los ejemplos no limitativos de ácidos que pueden usarse incluyen aquellos ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consiste en 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, fumarato de potasio, y combinaciones de los mismos.

La cantidad de NASSP en la composición variará dependiendo de varios factores, pero será de manera óptima una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición esté en una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, una píldora o cápsula) o un envase (por ejemplo, un vial o una bolsa). Una dosis terapéuticamente eficaz puede determinarse experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades crecientes de la composición para determinar qué cantidad produce un criterio de valoración deseado clínicamente.

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. Normalmente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de experimentación de rutina, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan entre baja y alta), examinando la estabilidad y otros parámetros, y luego determinando el intervalo en el que se alcanza un rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos. Generalmente, sin embargo, el/los excipiente(s) está(n) presente(s) en la composición en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 98% en peso, más preferiblemente desde aproximadamente el 15% hasta aproximadamente el 95% en peso del excipiente, siendo las más preferidas las concentraciones menores del 30% en peso. Estos excipientes farmacéuticos anteriores junto con otros excipientes se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 19ª ed., Williams & Williams, (1995), "Physician's Desk Reference, 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998)) y Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

Las composiciones engloban todos los tipos de formulaciones y en particular aquellas que son adecuadas para administración oral o inyección. Las composiciones preferidas adicionales incluyen aquellas para administración oral, ocular o localizada.

Las preparaciones farmacéuticas en el presente documento también pueden alojarse en una bolsa de infusión, una jeringa, un dispositivo de implantación, o similar, dependiendo del modo de administración y uso previstos. Preferiblemente, las composiciones de NASSP descritas en el presente documento están en forma de dosificación unitaria, lo que significa una cantidad de un conjugado o una composición de la invención apropiada para una dosis única, en una forma previamente medida o preenvasada.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo ("principio activo") con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y luego, si es necesario, moldeando el producto para dar la formulación deseada. Las formulaciones orales las conocen bien los expertos en la técnica, y los métodos generales para prepararlas se encuentran en cualquier libro de texto escolar convencional de farmacia, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A.R. Gennaro, ed. (1995).

En diversas realizaciones, la invención proporciona una formulación de dosificación unitaria que incluye uno o más NASSP de la invención. En una realización a modo de ejemplo, la formulación de dosificación unitaria incluye una dosificación terapéuticamente eficaz de un NASSP, preferiblemente suficiente para suscitar una alteración clínicamente detectable y, preferiblemente, clínicamente significativa en el estado de coagulación del sujeto al que se administra la formulación de dosificación única. En realizaciones a modo de ejemplo, la cantidad de un NASSP de la invención en la formulación oscila desde una cantidad suficiente para proporcionar una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg de un NASSP. En diversas realizaciones, la cantidad de un NASSP de la invención es suficiente para proporcionar una dosificación de desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta 20 mg/kg, por ejemplo, desde aproximadamente 0,02 mg/kg hasta 2 mg/kg. La cantidad de

compuesto en la formulación de dosificación unitaria dependerá de la potencia del NASSP específico y la magnitud o el efecto procoagulante deseado y la vía de administración.

Ejemplos de formulaciones de dosificación unitaria son aquellas que contienen una dosis eficaz, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una dosis profiláctica o terapéutica varía normalmente con la naturaleza y la gravedad del estado que va a tratarse y la vía de administración. La dosificación, y quizás la frecuencia de dosificación, también variará según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual. En general, para los compuestos de la invención, la dosis total en una forma de dosificación unitaria de la invención oscila desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 7000 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 2 mg hasta aproximadamente 500 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 200 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 100 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 80 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 60 mg. En algunas realizaciones, la cantidad de un NASSP de la invención en una forma de dosificación unitaria oscila desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 500 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 200 mg.

Las formulaciones de NASSP en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más agentes adicionales, tales como agentes hemostáticos, factores sanguíneos u otros medicamentos usados para tratar a un sujeto para un estado o una enfermedad. En diversas realizaciones, la invención proporciona preparaciones de combinación que incluyen uno o más factores sanguíneos tales como factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand, concentrado de complejo de protrombina (CPP), concentrado de complejo de protrombina activado (CPPa), por ejemplo, FEIBA. Las composiciones de NASSP también pueden incluir otros procoagulantes, tales como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo, pero sin limitarse a, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y HMWK; o/y un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo, pero sin limitarse a, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa. Las composiciones de NASSP pueden incluir factores de coagulación que se producen de manera natural, sintéticos o recombinantes, o fragmentos, variantes o derivados modificados covalentemente de los mismos que conservan la actividad biológica (es decir, fomentan la coagulación). Alternativamente, dichos agentes pueden estar contenidos en una composición independiente del NASSP y administrarse conjuntamente de manera concurrente, antes o después de la composición de NASSP de la invención.

Las combinaciones a modo de ejemplo de determinados tipos de NASSP (basados en su polímero base) con agentes adicionales se muestran en las figuras 13A-B. Cada combinación se identifica con una letra mayúscula (que se refiere a un tipo de NASSP) seguida de un número (que se refiere al agente adicional). Por ejemplo, "C5" se refiere a la combinación de un NASSP que tiene un polímero base de politirosina con factor V. Las figuras 14A-B proporcionan intervalos de dosificación a modo de ejemplo para el NASSP respectivo en cada una de las combinaciones (tipo de NASSP (basado en el polímero base) con agente adicional) identificado en las figuras 13A-B.

Los componentes individuales de tales combinaciones pueden administrarse o bien de manera simultánea o bien de manera secuencial en una forma de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria puede ser una forma de dosificación unitaria única o múltiple. En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona una combinación en una forma de dosificación unitaria única. Un ejemplo de una forma de dosificación unitaria única es una cápsula en la que tanto el compuesto de la invención como el agente terapéutico adicional están contenidos dentro de la misma cápsula. En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona una combinación en una forma de dosificación de dos unidades. Un ejemplo de una forma de dosificación de dos unidades es una primera cápsula que contiene el compuesto de la invención y una segunda cápsula que contiene el agente terapéutico adicional. Así, el término 'unitaria única' o 'dos unidades' o 'múltiples unidades' se refiere al objeto que ingiere el paciente, no a los componentes interiores del objeto. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente las dosis apropiadas de agentes terapéuticos conocidos.

En diversas realizaciones, las composiciones de NASSP en el presente documento pueden incluir, cuando están destinadas para administración oral, opcionalmente uno o más potenciadores de la permeación. Los potenciadores de la permeación apropiados y su uso con procoagulantes, tales como los proporcionados por la presente invención se describen en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/509.514, presentada el 19 de julio de 2011, titulada "Absorption Enhancers as Additives to Improve the Oral Formulation of Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharides" ("Potenciadores de la absorción como aditivos para mejorar la formulación oral de polisacáridos sulfatados no anticoagulantes"). En algunas realizaciones, el potenciador de la permeación es un potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal. Dependiendo de la fisiología del sujeto, la expresión "epitelial gastrointestinal", tal como se usa en el presente documento, se refiere al tejido epitelial del tubo digestivo, tal como el estómago y el tracto intestinal (por ejemplo, duodeno, yeyuno, íleon), y puede incluir además otras estructuras que participan en las funciones gastrointestinales del cuerpo, incluyendo la parte inferior del esófago, el recto y el ano. En diversas realizaciones, las composiciones de la invención incluyen una cantidad procoagulante de un NASSP en combinación con un potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal. Las cantidades de potenciador de la permeación de uso en esta invención son generalmente idénticas a las expuestas en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/509.514 a la que se hizo referencia anteriormente. De manera similar, en realizaciones a modo de ejemplo, las cantidades apropiadas de un NASSP son idénticas a las cantidades

establecidas para NASP en la solicitud a la que se hizo referencia anteriormente. En diversas realizaciones, las composiciones de la invención incluyen una combinación de una cantidad procoagulante de un NASSP con un potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal y un factor de coagulación sanguínea. En el presente documento se exponen cantidades a modo de ejemplo de NASSP y un segundo agente, por ejemplo, un factor de coagulación sanguínea. Los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal incluyen compuestos que, cuando se administran por vía oral, aumentan la cantidad de NASSP que se absorbe por el aparato digestivo. Además, los potenciadores de la permeación gastrointestinal también pueden acelerar el inicio (es decir, reduciendo la cantidad de tiempo para que comience la absorción) de la absorción de NASSP a través del epitelio gastrointestinal, así como acelerar la velocidad global de transporte de NASSP a través del epitelio gastrointestinal del sujeto (es decir, reduciendo la cantidad de tiempo para que se complete la absorción de NASSP por el aparato digestivo). En realizaciones de la invención, los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal pueden variar, dependiendo del trastorno de coagulación sanguínea particular, la fisiología del sujeto y la potenciación deseada de la absorción por el aparato digestivo. En algunas realizaciones, los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal son moduladores de unión estrecha. El término "unión estrecha" se emplea en su sentido convencional para referirse a las áreas celulares estrechamente asociadas en las que se unen entre sí las membranas de las células adyacentes. En realizaciones de la invención, los moduladores de unión estrecha pueden incluir, pero no se limitan a enzimas, ácidos biliares, polisacáridos, ácidos grasos y sales de los mismos y cualquier combinación de los mismos.

En una realización a modo de ejemplo de la invención, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende a) un compuesto de la invención; b) un agente terapéutico adicional y c) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica es una forma de dosificación unitaria. En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica es una forma de dosificación unitaria única. En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica es una forma de dosificación de dos unidades. En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica es una forma de dosificación de dos unidades que comprende una primera forma de dosificación unitaria y una segunda forma de dosificación unitaria, en la que la primera forma de dosificación unitaria incluye a) un compuesto de la invención y b) un primer excipiente farmacéuticamente aceptable; y la segunda forma de dosificación unitaria incluye c) un agente terapéutico adicional y d) un segundo excipiente farmacéuticamente aceptable.

Debe entenderse que, además de los componentes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellos adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gel blando), sellos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o una pasta.

Puede producirse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente usando uno o más componentes auxiliares. Los comprimidos sometidos a compresión pueden prepararse mediante compresión en una máquina adecuada del principio activo en una forma que fluye libremente, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclarse con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, lubricante, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden producirse mediante el moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse para proporcionar una liberación sostenida, retardada o controlada del principio activo en los mismos. Los expertos en la técnica conocen bien los sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida orales y parenterales, y métodos generales para lograr la liberación sostenida de fármacos administrados por vía oral o parenteral se encuentran, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, páginas 1660-1675 (1995).

En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona una formulación de dosificación unitaria de un NASSP de la invención en una forma apropiada para administración por inyección (por ejemplo, infusión). La formulación de dosificación unitaria puede diluirse con un diluyente farmacéuticamente aceptable apropiado poco antes de su uso, o puede envasarse como una dosificación unitaria diluida para perfusión. Las formas adecuadas para dilución antes de la inyección incluyen, por ejemplo, polvos o liofilizados que pueden reconstituirse con un disolvente antes del uso, así como disoluciones o suspensiones listas para inyección, composiciones insolubles secas para su combinación con un vehículo antes del uso, y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de la administración. Los ejemplos de diluyentes adecuados para la reconstitución de composiciones sólidas antes de la inyección incluyen agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5% en agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada, y combinaciones de los mismos. Con respecto a las composiciones farmacéuticas líquidas, se prevén disoluciones y suspensiones. En general, las cantidades comentadas anteriormente como apropiadas para las formas de dosificación unitaria orales son aplicables también a la dosificación unitaria inyectable.

En una realización a modo de ejemplo adicional, la invención proporciona la formulación de dosificación unitaria inyectable y un dispositivo para la administración de la formulación de dosificación unitaria mediante inyección (por ejemplo, infusión). En diversas realizaciones, el dispositivo es un dispositivo para infusión, por ejemplo, una bolsa de infusión. En un ejemplo de esta realización, la invención proporciona una bolsa de infusión, o dispositivo similar, en el que la formulación de dosificación unitaria se precarga (diluida o en una forma apropiada para la dilución).

Los polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados con actividad NASSP (es decir, actividad procoagulante) incorporados de manera útil en las formulaciones de la invención incluyen polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados en los que el polímero base se selecciona de polivinilo, polianetol, politirosina y poliestireno.

C. NASSP como promotores de la coagulación

La presente invención se basa en el descubrimiento de que polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados no anticoagulantes (NASSP) pueden usarse como procoagulantes en el tratamiento de pacientes con trastornos hemorrágicos. Los inventores han descubierto un nuevo enfoque para regular la hemostasia que utiliza polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados, (es decir, similares a la heparina) para fomentar la coagulación. Los polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados seleccionados descritos en el presente documento carecen en gran medida de actividad anticoagulante, o presentan actividad promotora de coágulos a concentraciones significativamente menores que la concentración a la que presentan actividad anticoagulante y, por tanto, se denominan "polímeros sintéticos sulfatados o sulfonados no anticoagulantes".

Tal como se muestra en el ejemplo 1, los NASSP fomentan la coagulación del plasma de sujetos que tienen hemofilia A (hem. A) o hemofilia B (hem. B) según los ensayos de generación de trombina y de coagulación de TFPI-dPT. En los experimentos divulgados en el presente documento, determinados NASSP candidatos se muestran en ensayos de coagulación para demostrar una actividad anticoagulante al menos diez veces menor en comparación con la heparina. Estos resultados indican que la administración sistémica de NASSP seleccionados representa un enfoque único para regular la hemostasia en los trastornos hemorrágicos. Por tanto, en diversas realizaciones, la invención se refiere al uso de NASSP para controlar la hemostasia en sujetos con trastornos hemorrágicos, incluyendo trastornos de coagulación congénitos, trastornos de coagulación adquiridos y estados hemorrágicos inducidos por traumatismo.

En realizaciones a modo de ejemplo, los NASSP de la invención tienen una CE50, medida en un ensayo de CAT de desde aproximadamente 0,001 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, por ejemplo, desde aproximadamente 0,01 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo, desde aproximadamente 0,05 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$. En diversas realizaciones, el NASSP de la invención no es sustancialmente anticoagulante en su CE50. Un NASSP a modo de ejemplo de la invención no es sustancialmente anticoagulante a una concentración de hasta aproximadamente 1,1x, 1,3x, 1,6x, 1,9x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4,0x su CE50.

D. Aplicaciones

En un aspecto, los NASSP pueden usarse en los métodos de la invención para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, particularmente aquellos asociados con deficiencias de factores de coagulación o para revertir los efectos de anticoagulantes en un sujeto. Los NASSP pueden administrarse a un sujeto para tratar trastornos hemorrágicos, incluyendo trastornos de coagulación congénitos, trastornos de coagulación adquiridos y estados hemorrágicos inducidos por traumatismo. Los ejemplos de trastornos hemorrágicos que pueden tratarse con NASSP incluyen, pero no se limitan a, hem. A, hem. B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación, tales como factor XI, factor XII, precalicreína y HMWK, una deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragias clínicamente significativas, tales como 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 del fibrinógeno, incluyendo afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa2-antiplasmina y hemorragia excesiva tal como la provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo. En determinadas realizaciones, los NASSP se usan para tratar trastornos de coagulación congénitos incluyendo hem. A, hem. B y la enfermedad de von Willebrand. En otras realizaciones, los NASSP se usan para tratar trastornos de coagulación adquiridos, incluyendo deficiencias de factor VIII, factor de von Willebrand, factor IX, factor V, factor XI, factor XII y factor XIII, particularmente trastornos provocados por inhibidores o autoinmunidad contra factores de coagulación sanguínea, o trastornos hemostáticos provocados por una enfermedad o un estado que da como resultado una síntesis reducida de factores de coagulación.

E. Administración

En una realización a modo de ejemplo, se administra a un sujeto al menos un ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz con un NASSP. Por "ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz" se entiende un ciclo de tratamiento que, cuando se administra, produce una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un individuo para

un trastorno hemorrágico. De particular interés es un ciclo de tratamiento con un NASSP que mejora la hemostasia. Por ejemplo, uno o más ciclos de tratamiento terapéuticamente eficaces pueden aumentar la velocidad de coagulación, según se determina mediante ensayos hemostáticos y de coagulación globales (por ejemplo, CAT, TTPa, descritos en detalle a continuación) en el 1% o más, tal como el 5% o más, tal como el 10% o más, tal como el 15% o más, tal como el 20% o más, tal como el 30% o más, tal como el 40% o más, tal como el 50% o más, tal como el 75% o más, tal como el 90% o más, tal como el 95% o más, incluido el aumento de la generación de trombina en el 99% o más. En otros casos, uno o más ciclos de tratamiento terapéuticamente eficaces pueden aumentar la formación de coágulos en 1,5 veces o más, tal como 2 veces o más, tal como 5 veces o más, tal como 10 veces o más, tal como 50 veces o más, incluido el aumento de la formación en 100 veces o más. En algunas realizaciones, los sujetos tratados mediante los métodos de la invención presentan una respuesta terapéutica positiva. Tal como se usa en el presente documento, "respuesta terapéutica positiva" significa que el individuo que se somete a tratamiento según la invención presenta una mejora en uno o más síntomas de un trastorno hemorrágico, incluyendo mejoras tales como tiempos de coagulación sanguínea acortados y hemorragia reducida y/o necesidad reducida de terapia de reemplazo de factor.

La invención también proporciona un método para administrar un conjugado que comprende un NASSP tal como se proporciona en el presente documento a un paciente que padece un estado que responde al tratamiento con un NASSP contenido en el conjugado o la composición. El método comprende administrar, a través de cualquiera de los modos descritos en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado o sistema de administración de fármacos, preferiblemente proporcionado como parte de una composición farmacéutica. El método de administración puede usarse para tratar cualquier estado que responda al tratamiento con un NASSP. Más específicamente, las composiciones en el presente documento son eficaces para tratar trastornos hemorrágicos, incluyendo hem. A, hem. B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de coagulación, tales como el factor XI, factor XII, precalicreína y HMWK, un deficiencia de uno o más factores asociados con hemorragias clínicamente significativas, tales como el factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y el factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno del fibrinógeno, incluyendo afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa2-antiplasmina y hemorragia excesiva tal como la provocada por enfermedad hepática, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo

En determinadas realizaciones, se administran una o más dosis terapéuticamente eficaces de composiciones que comprenden uno o más NASSP y/u otros agentes terapéuticos, tales como agentes hemostáticos, factores sanguíneos u otros medicamentos. Las composiciones de la presente invención se administran normalmente, aunque no necesariamente, por vía oral, mediante inyección (por vía subcutánea, por vía intravenosa o por vía intramuscular), por infusión o localmente. La preparación farmacéutica puede estar en forma de una disolución o suspensión líquida inmediatamente antes de la administración, pero también puede adoptar otra forma, tal como un jarabe, una crema, pomada, un comprimido, una cápsula, un polvo, gel, una matriz, un supositorio, o similar. También se contemplan modos de administración adicionales, tales como pulmonar, rectal, transdérmico, transmucoso, intratecal, pericárdico, intraarterial, intracerebral, intraocular, intraperitoneal, etc. Las composiciones farmacéuticas que comprenden NASSP y otros agentes pueden administrarse usando las mismas vías de administración o diferentes según cualquier método médicamente aceptable conocido en la técnica.

Un NASSP puede administrarse antes, de manera concurrente o posterior a otros agentes. Si se proporciona al mismo tiempo que otros agentes, el NASSP puede proporcionarse en la misma composición o en una diferente. Por tanto, los NASSP y otros agentes pueden presentarse al individuo por medio de una terapia concurrente. Por "terapia concurrente" se pretende la administración a un sujeto de tal manera que el efecto terapéutico de la combinación de las sustancias se provoque en el sujeto que se somete a terapia. Por ejemplo, la terapia concurrente puede lograrse administrando una dosis de una composición farmacéutica que comprende un NASSP y una dosis de una composición farmacéutica que comprende al menos otro agente, tal como un agente hemostático o factor de coagulación, incluyendo, por ejemplo, uno o más factores sanguíneos tales como factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. Las composiciones de NASSP también pueden incluir otros procoagulantes, tales como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo, pero sin limitarse a, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y HMWK; o/y un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo, pero sin limitarse a, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa, que en combinación comprenden una dosis terapéuticamente eficaz, según un régimen de dosificación particular. De manera similar, uno o más NASSP y agentes terapéuticos pueden administrarse en al menos una dosis terapéutica. Cuando los NASSP y otros agentes terapéuticos se administran como composiciones farmacéuticas independientes, la administración de las composiciones farmacéuticas independientes puede realizarse simultáneamente o en diferentes momentos (es decir, secuencialmente, en cualquier orden, en el mismo día o en días diferentes), siempre que el efecto terapéutico de la combinación de estas sustancias sea provoque en el sujeto que se somete a terapia.

En una realización particular, una composición de la invención se usa para la administración localizada de un NASSP, por ejemplo, para el tratamiento de hemorragia como resultado de una lesión, herida o cirugía. Las preparaciones según la invención también son adecuadas para el tratamiento local. Por ejemplo, un NASSP puede

administrarse mediante inyección en el sitio de hemorragia o en forma de un sólido, líquido o una pomada, preferiblemente a través de una cinta adhesiva o un apósito. También pueden usarse supositorios, cápsulas, en particular cápsulas resistentes al jugo gástrico, gotas o aerosoles. La preparación particular y el método de administración apropiado se eligen para seleccionar como diana el sitio de hemorragia.

5 En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden NASSP y/u otros agentes se administran de manera profiláctica, por ejemplo, antes de una cirugía planificada. Aunque de utilidad general, tales usos profilácticos son de particular valor para sujetos con trastornos de coagulación sanguínea preexistentes conocidos.

10 En otra realización de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden NASSP y/u otros agentes están en una formulación de liberación sostenida, o una formulación que se administra usando un dispositivo de liberación sostenida. Tales dispositivos se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, parches transdérmicos y bombas implantables en miniatura que pueden proporcionar la administración de fármacos a lo largo del tiempo de manera continua y estable en una variedad de dosis para lograr un efecto de liberación sostenida con una composición farmacéutica de liberación no sostenida.

15 Una dosis profiláctica o terapéutica varía normalmente con la naturaleza y la gravedad del estado que va a tratarse y la vía de administración. La dosificación, y quizás la frecuencia de dosificación, también variará según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual. En general, la dosis diaria total (en dosis únicas o divididas) oscila desde aproximadamente 1 mg al día hasta aproximadamente 7000 mg al día, por ejemplo, desde aproximadamente 1 mg al día hasta aproximadamente 100 mg al día, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg al día hasta aproximadamente 100 mg al día, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 100 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 80 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 60 mg. En algunas realizaciones, la dosis diaria total puede oscilar desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 500 mg al día, por ejemplo, desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 500 mg al día. Se recomienda además que los niños (por ejemplo, lactantes), los pacientes mayores de 65 años y aquellos con insuficiencia renal o hepática, reciban inicialmente dosis bajas y que la dosificación se ajuste según la farmacocinética y/o las respuestas fisiológicas individuales. Puede ser necesario usar dosificaciones fuera de estos intervalos en algunos casos, tal como resultará evidente para los expertos en la técnica. Además, se observa que el médico clínico o el médico encargado saben cómo y cuándo interrumpir, ajustar o terminar la terapia junto con la respuesta de un paciente individual.

20 Los expertos habituales en la técnica apreciarán qué estados puede tratar eficazmente un NASSP específico. La dosis real que va a administrarse variará según la edad, el peso y el estado general del sujeto, así como la gravedad del estado que esté tratándose, el criterio del profesional de la salud y el conjugado que esté administrándose. Los expertos en la técnica pueden determinar las cantidades terapéuticamente eficaces, y se ajustan a los requisitos particulares de cada caso particular.

25 La invención también proporciona un método para revertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASSP al sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto puede haberse tratado con un anticoagulante incluyendo, pero sin limitarse a, heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, TFPI, AT III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodos (NAPc2), factor VIIa con sitio activo bloqueado (factor VIIai), inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, incluyendo fondaparinux, idraparinux, DX-9065a y razaxabano (DPC906), inhibidores de los factores Va y VIIIa, incluyendo proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de trombina, incluyendo hirudina, bivalirudina, argatroban y ximelagatran. En determinadas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a un factor de coagulación, incluyendo pero sin limitarse 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 HMWK.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un método para mejorar la coagulación en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico o invasivo, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polímero sintético sulfatado o sulfonado no anticoagulante (NASSP) al sujeto. En determinadas realizaciones, el NASSP puede administrarse sólo o administrarse conjuntamente con uno o más NASSP diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos al sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico o invasivo. Por ejemplo, al sujeto puede administrársele una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, HMWK, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, incluyendo factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y factor VIIIa, precalicreína y HMWK; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, incluyendo factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa.

35 Además de los usos expuestos anteriormente, los compuestos de la invención encuentran uso en una variedad de otras modalidades de tratamiento. Por ejemplo, en una realización, los compuestos de la invención son útiles para tratar la cistitis intersticial (véase, por ejemplo, Urology, (diciembre de 2000) 164(6): 2119-2125; Urology, (junio de 1999) 53(6):1133-1139; International Congress Series, (diciembre de 2001) 1223:227-237; Urology, (enero de 2008)

179(1):177-185; European Urology Supplements, (septiembre de 2003) 2(4):14-16; Urology, (septiembre de 2011) 78(3):S210-S211; European Urology Supplements, (octubre de 2011) 10(6):451-459; Urology, (abril de 2011) 185(4):e384).

5 En diversas realizaciones, los compuestos de la invención también encuentran uso como agentes antiinflamatorios, y en el tratamiento y la prevención de trastornos neurodegenerativos (véanse, por ejemplo, Food and Chemical Toxicology, (agosto de 2011) 49(8):1745-1752; Food and Chemical Toxicology, (septiembre de 2011) 49(9):2090-2095; Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, (sept. de 2003) 1651(1-2)).

10 En una realización a modo de ejemplo, los compuestos de la invención también encuentran uso por su actividad anticancerígena (véanse, por ejemplo, Carbohydrate Polymers, (4 de enero de 2012) 87(1, 4):186-194; Carbohydrate Polymers, (23 de mayo de 2010) 81(1, 23):41-48; Carbohydrate Polymers, (4 de enero de 2012) 87(1, 4):186-194; International Journal of Biological Macromolecules, (1 de octubre de 2011) 49(3, 1):331-336; Advances in Food and Nutrition Research, (2011) 64:391-402).

15 En diversas realizaciones, los compuestos de la invención también encuentran uso como agentes para la prevención de la formación de adherencias (véanse, por ejemplo, Journal of Surgical Research, (diciembre de 2011) 171(2):495-503; Fertility and Sterility, (septiembre de 2009) 92(3):S58; Journal of Minimally Invasive Gynecology, (noviembre-diciembre de 2009) 16(6):S120).

20 En una realización a modo de ejemplo, los compuestos de la invención también tienen actividad antiviral (véase, por ejemplo, Phytomedicine, (noviembre de 1999) 6(5):335-340; Antiviral Research, (febrero de 1991) 15(2):139-148; Phytochemistry, (febrero de 2010) 71(2-3):235-242; y Advances in Food and Nutrition Research, (2011) 64:391-402).

25 En diversas realizaciones, los compuestos de la invención también son inhibidores del sistema del complemento (véase, por ejemplo, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, (julio de 2000) 126(3):209-215).

30 En cada una de estas diferentes modalidades de tratamiento, el tratamiento de un sujeto que necesita tal tratamiento se efectúa administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de la invención. En diversas realizaciones, el compuesto se administra a un sujeto para tratar un estado y este sujeto no necesita por lo demás tratamiento con un compuesto de la invención para un estado diferente.

35 En la práctica de los métodos de la invención, los protocolos para mejorar la coagulación sanguínea o tratar un estado en un sujeto pueden variar, tal como por ejemplo, según la edad, el peso, la gravedad del trastorno de coagulación sanguínea, la salud general del sujeto, así como la composición y concentración particulares de los NASSP que estén administrándose. En realizaciones de la invención, la concentración en plasma de los NASSP alcanzada en un sujeto tras administración oral y la absorción por el aparato digestivo pueden variar, en algunos casos, desde aproximadamente 0,01 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g/ml}$. Los NASSP a modo de ejemplo de interés son procoagulantes en su concentración óptima. Por "concentración óptima" se entiende la concentración en la que los NASSP presentan la mayor cantidad de actividad procoagulante. Puesto que los NASSP a modo de ejemplo también demostraron actividad anticoagulante a concentraciones mucho mayores que la concentración óptima, los NASSP preferidos de la invención muestran un comportamiento no anticoagulante en el intervalo de su concentración óptima. Como tal, dependiendo de la potencia del NASSP así como del efecto deseado, la concentración óptima de un NASSP a modo de ejemplo proporcionado por los métodos de la invención puede oscilar, desde aproximadamente 0,01 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g/ml}$, tal como de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 250 $\mu\text{g/ml}$, tal como de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$, tal como de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 75 $\mu\text{g/ml}$, tal como de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$, tal como de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{g/ml}$, tal como de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$, e incluyendo de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones óptimas y el nivel de actividad según se determina mediante el ensayo CAT de NASP de interés se describen con mayor detalle en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 11/140.504, presentada el 27 de mayo de 2005, ahora la patente estadounidense n.º 7.767.654, y la solicitud de patente estadounidense con número de serie 13/006.396, presentada el 13 de enero de 2011. Asimismo, la presente solicitud divulga ejemplos de ensayos de CAT de uso en la determinación de la concentración óptima de un NASSP de la invención.

60 En las figuras 14A-B se muestran intervalos de dosificación a modo de ejemplo para el NASSP respectivo en cada una de las combinaciones (tipo de NASSP (basado en el polímero base) con agente adicional) identificadas en las figuras 13A-B. La letra minúscula adjunta al identificador de la combinación de las figuras 14A-B se refiere a la dosificación del NASP respectivo en esa combinación. Por ejemplo, "C5a" se refiere a una combinación de un NASP que tiene un polímero base de politirosina con factor V, en el que la dosis de NASSP es de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1 mg/kg. Se proporcionan dosificaciones a modo de ejemplo para el agente adicional en la figura 15.

65

En las diversas realizaciones de la invención, la dosificación (por ejemplo, dosificación oral) de composiciones que contienen NASSP de la invención pueden variar, en realizaciones a modo de ejemplo, oscilando desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 500 mg/kg al día, tal como desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg al día, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg al día, incluyendo de aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg al día. En otras realizaciones, la dosificación (por ejemplo, dosificación oral) puede oscilar desde aproximadamente 0,01 hasta 100 mg/kg cuatro veces al día (QID), tal como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg QID, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg QID, tal como de 0,01 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg QID, tal como de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2 mg/kg QID. En otras realizaciones, la dosificación (por ejemplo, dosificación oral) puede oscilar desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg tres veces al día (TID), tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg TID, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg TID, e incluyendo como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,2 mg/kg TID. En aún otras realizaciones, la dosificación (por ejemplo, dosificación oral) puede oscilar desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg dos veces al día (BID), tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg BID, tal como de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg BID, incluyendo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,2 mg/kg BID. La cantidad de compuesto administrado dependerá de la potencia y concentración del NASSP específico, la magnitud o el efecto procoagulante deseados y la capacidad de absorción y/o biodisponibilidad inherentes del NASSP. Cada uno de estos factores se determina fácilmente por un experto en la técnica usando los métodos expuestos en el presente documento o métodos reconocidos en la técnica.

En diversas realizaciones de los métodos de la presente memoria, el NASSP se administra por vía oral en combinación con uno o más potenciadores de la permeación. Los potenciadores de la permeación apropiados y su uso con procoagulantes, tales como los proporcionados por la presente invención se describen en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/509.514. En algunas realizaciones, el potenciador de la permeación es un potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal. En diversas realizaciones, la invención proporciona métodos para mejorar la coagulación sanguínea mediante la administración oral de una composición que incluye una cantidad procoagulante de un NASSP en combinación con un potenciador de la permeación epitelial gastrointestinal a un sujeto. En diversas realizaciones, la invención proporciona métodos para mejorar la coagulación sanguínea mediante la administración oral de una composición que incluye una cantidad procoagulante de un NASSP en combinación con un potenciador de la permeación epitelial gastrointestinal y un factor de coagulación sanguínea a un sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* de inhibición de la actividad de TFPI con una cantidad suficiente de un NASSP para inhibir la actividad de TFPI. En determinadas realizaciones, la actividad de TFPI se inhibe en un sujeto mediante un método que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un NASSP al sujeto. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el método combinar la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un NASSP para inhibir la actividad de TFPI.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la actividad de TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el método combinar la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de un polímero sintético sulfatado o sulfonado no anticoagulante (NASSP) para inhibir la actividad de TFPI.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de medición de la aceleración de la coagulación por un NASSP en una muestra biológica, comprendiendo el método:

a) combinar la muestra biológica con una composición que comprende el NASSP,

b) medir el tiempo de coagulación de la muestra biológica,

c) comparar el tiempo de coagulación de la muestra biológica con el tiempo de coagulación de una muestra biológica correspondiente no expuesta al NASSP, en el que una disminución del tiempo de coagulación de la muestra biológica expuesta al NASSP, si se observa, es indicativa de un NASSP que acelera la coagulación.

A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Como una extensión de esta clase de compuestos, se divulgan en el presente documento polímeros sulfatados o

sulfonados, no basados en hidratos de carbono (figura 3). La presente invención proporciona un método y una composición adecuados para tratar trastornos hemorrágicos.

5 El ensayo de generación de trombina (TGA) evaluó la actividad procoagulante de estos polímeros sulfatados o sulfonados, no basados en hidratos de carbono. La influencia de cada polímero sulfatado en la generación de trombina se midió por duplicado a través de CAT en un lector Fluoroskan Ascent® (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia; filtros de excitación a 390 nm y emisión a 460 nm) después de la escisión lenta del sustrato fluorogénico Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Hemker HC. Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33:4 15) A cada pocillo de una microplaca de 10 96 pocillos (Immulon 2HB, fondo en U transparente; Thermo Electron) se le añadieron 80 μ l de una reserva de plasma humano normal tratado con anticuerpo de cabra anti-FVIII precalentado (37°C). Para desencadenar la generación de trombina por el factor tisular, se añadieron 10 μ l de reactivo PPP que contiene una determinada cantidad de factor tisular humano recombinante (rTF) y vesículas de fosfolípidos compuestas por fosfatidilserina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (48 μ M) (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos). Para estudiar la actividad procoagulante de los polímeros sulfatados, se usó una concentración de rTF final de 1 pM para 15 proporcionar sensibilidad al FVIII y al inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) del sistema de prueba. En algunos experimentos, se bloqueó la actividad de TFPI en presencia o ausencia de NASSP o bien por un anticuerpo policlonal de cabra anti-TFPI humano (R&D Systems, Af2974, Minneapolis, EE.UU.) o bien por un anticuerpo monoclonal anti-TFPI dirigido contra el extremo C-terminal cargado positivamente de TFPI (Sanquin White Label Products, MW1848, clon CLB/TFPI, extremo C-terminal, Amsterdam, Países Bajos) a una concentración en plasma de 25 nM o 50 nM, respectivamente. Además, el plasma tratado con anticuerpo monoclonal anti-extremo C-terminal de TFPI se complementó con TFPI recombinante truncado de manera C-terminal (aa1-160). Justo antes de colocar la placa en el lector precalentado (37°C), se añadieron 10 μ l de muestra de prueba o de referencia o compuesto 20 calibrador. Se inició la generación de trombina mediante la dispensación de 20 μ l de reactivo FluCa (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos) que contiene sustrato fluorogénico y CaCl₂ tamponado con Hepes (100 mM) en cada pocillo y se registró la intensidad de fluorescencia a 37°C.

Se calcularon los parámetros de las curvas de generación de trombina resultantes usando el software Thrombinoscope™ (Thrombinoscope BV, Maastricht, Países Bajos) y el calibrador de trombina para corregir los efectos de filtro interno y de consumo de sustrato (Hemker HC, Pathophysiol Haemost Thromb 2003; 33(4):15). Con 30 el calibrador de trombina como referencia, el software calculó la concentración molar de trombina en los pocillos de prueba. Las cantidades de trombina en el pico y los tiempos de pico de cada curva de generación de trombina (trombina pico, nM) se representaron gráficamente frente a las concentraciones de polímero sulfatado, lo que dio como resultado el perfil procoagulante de estos compuestos (figura 2) Los resultados del ensayo de generación de trombina se ilustran en las figuras 4A, 4B, 4C y 4E. Los NASSP son procoagulantes en un amplio intervalo de 35 concentración que abarca al menos dos órdenes de magnitud a partir de aproximadamente 1 μ g/ml, mientras que un polímero fosforilado es esencialmente inactivo y proporciona evidencias de la importancia de los grupos sulfato o sulfonato cargados negativamente (figura 4D). A concentraciones de actividad procoagulante óptima (de 30 a 100 μ g/ml), los NASSP superaron la generación de trombina de una reserva de plasma humano normal. A concentraciones mayores de 100 μ g/ml, los polímeros sulfatados prolongaron el tiempo de tromboplastina parcial 40 activado, lo que es indicativo de su actividad anticoagulante.

Ensayo de tiempo de protrombina con dilución de TFPI. Se usó un ensayo de tiempo de protrombina con dilución con el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI-dPT) añadido para evaluar el efecto de inhibición de TFPI de los diferentes NASSP. El plasma humano normal de reserva (George King Biomedical, Overland Park, KS) se preincubó 45 con 0,5 μ g/ml de TFPI de longitud completa (aa 1-276, producido constitutivamente por SKHep1) y el NASSP respectivo (0 - 1000 μ g/ml) durante 15 min a T.A. Se añadió el reactivo TF TriniClot PT Excel S (Trinity Biotech, Wicklow, Irlanda), diluido en solución salina tamponada con Hepes 1:200 con BSA al 0,5% a las muestras de plasma en un analizador de hemostasia ACL Pro Elite (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA). Se inició la coagulación con CaCl₂ 25 mM. La razón volumétrica de plasma:TF:CaCl₂ fue de 1:1:1 Para el análisis de datos, TFPI-dPT se 50 representa gráficamente frente a la concentración logarítmica. Los valores de las concentraciones eficaces a la mitad del máximo (CE50) se determinan usando un ajuste de curva sigmoidea.

Polímeros fosforilados análogos (es decir, poli(fosfonato de vinilo), poli(fosfato de vinilo)) no demostraron ningún efecto procoagulante (figura 4D). Debido a que los grupos fosfato y sulfato son químicamente muy similares, este resultado fue sorprendente. Además, hay bibliografía sobre la actividad procoagulante de los polifosfatos: Müller *et al.*, Cell, 139, 1143-1156; 2009.

EJEMPLO 2

60 Ensayo de tiempo parcial de tromboplastina activado (TTPa)

Se realizó el ensayo de TTPa para estudiar las actividades anticoagulantes de NASSP. En resumen, se mezclaron 50 μ l de la reserva de plasma humano normal descongelada (George King Biomedical, Overland Park, KS) con 5 μ l de los NASSP (concentración en plasma final de 0-500 μ g/ml). Se diluyeron los NASSP en tampón de imidazol (imidazol 3,4 g/l; NaCl 5,85 g/l, pH 7,4) que contenía albúmina al 1% (Baxter, Austria). Después de la adición de 65

50 µl de reactivo de TTPa (STA TTPA, Roche), se incubaron las muestras durante 4 minutos a 37°C. Se inició la coagulación con 50 µl de disolución de CaCl₂ 25 mM (Baxter, Austria) y se registró durante hasta 5 minutos. Todas las etapas de pipeteo y las mediciones del tiempo de coagulación se llevaron a cabo con un instrumento ACL Pro Elite (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA). Las muestras se analizaron por duplicado.

Para el análisis de datos, el tiempo de coagulación se representa gráficamente frente a la concentración de NASSP. Las concentraciones en las que el tiempo de coagulación está aumentado un 50% con respecto al control de plasma normal se determinan usando un ajuste de curva lineal. Véase la figura 16.

EJEMPLO 3

Estudios de células Caco-2/in vivo

Objetivo:

Una estrategia para mejorar la biodisponibilidad oral de los NASSP es la aplicación de potenciadores de la permeación de modulación de la unión estrecha tales como quitosano, bromelaína, desoxicolina (DOC) o caprato de sodio. El objetivo de este estudio es determinar la reabsorción *in vitro* de NASSP seleccionados en el modelo de células Caco-2 en ausencia y presencia de potenciadores de la permeación.

Métodos:

Las células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) cultivadas sobre filtros semipermeables se diferencian espontáneamente para formar una monocapa confluyente. Esta capa celular se asemeja, tanto estructural como funcionalmente, al epitelio del intestino delgado. Las células Caco-2 se cultivan en una placa Transwell-24 de PET en medio de crecimiento celular RPMI complementado con suero de ternera fetal al 10% y L-glutamina al 1%. Después de 21 días en un incubador a 37°C y una atmósfera del 95% de aire, el 5% de CO₂, se obtiene una monocapa confluyente. Se añade un NASSP seleccionado disuelto en 200 µl de medio de crecimiento con o sin potenciadores de la permeación sobre las células en el compartimento apical a una concentración de 1 mg/ml y se incuba a 37°C. Se recogen muestras de medio (100 µl) a las 2, 4, 6 y 8 h del lado basolateral (volumen de 850 µl) y antes y a las 8 h del lado apical. En cada recogida de muestras, se reemplaza la alícuota retirada por nuevo medio de crecimiento. Para garantizar que la capa celular permanezca intacta durante el experimento, se monitoriza y registra la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés). En cada experimento, se someten a prueba los pocillos por triplicado y se realiza el experimento de una a tres veces.

Se determina la cantidad de NASSP que se transfiere desde el compartimento apical al basolateral a lo largo de un periodo de tiempo de 8 h mediante un ensayo de generación de trombina basado en actividad semicuantitativo (CAT) para todos los puntos de tiempo y una cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas específicas de sustancia sólo para el punto de tiempo de 8 h.

Resultados:

Se estudia la reabsorción de un NASSP sintético en combinación con 4 ó 5 potenciadores en el modelo de células Caco-2. La cantidad de NASSP en el lado basolateral de las células aumenta con el tiempo. La concentración máxima teóricamente posible (µg/ml) es ligeramente diferente para cada punto de tiempo debido al factor de dilución provocado por la toma de muestra. El máximo posible se expresa como µg/ml NASSP. La reabsorción en el punto de tiempo de 8 h también se expresa en % de reabsorción. La reabsorción en presencia de potenciadores aumenta.

EJEMPLO 4

Objetivo:

Para estudiar la eficacia de un NASSP en un modelo de cobaya con inhibición de TEG FVIII de sangre completa *ex vivo* en la mejora de parámetros de coagulación.

Métodos:

A cobayas Dunkin Hartley macho se les inyecta por vía intravenosa un plasma inhibidor de anti-FVIII humano de cabra a una dosis de 42 UB/kg (1,9 ml/kg) 45 minutos antes de la toma de muestras. Después de 40 minutos, se administra NASSP por vía intravenosa a los animales a 0,05, 0,15, 0,45 ó 1,35 mg/kg (N = 5 por grupo). 300 U/kg de FEIBA (Baxter, BioScience, Austria) sirve como control positivo y la solución salina como control de vehículo. Poco después de la inyección, se realiza una punción en la vena cava y se extrae sangre en presencia de citrato (razón 1:9) para análisis de TEG en sangre completa. Se realizan mediciones usando un analizador de hemostasia de tromboelastografía (TEG) 5000 (Haemonetics Corp, EE.UU.) a 37°C. Cada muestra de sangre se prepara precalentando 20 µl de una disolución de CaCl₂ 0,2 M en una cubeta de TEG a 37°C añadiendo 340 µl de sangre,

mezclando y luego comenzando inmediatamente el registro de TEG. La medición prosiguió durante al menos 120 min. Se registran los parámetros de TEG del tiempo de coagulación (tiempo R), la rapidez de fortalecimiento del coágulo (ángulo) y la máxima firmeza del coágulo (MA). El criterio de valoración primario, tiempo R, se representa gráficamente y la mediana de valores de los diferentes grupos de dosificación se comparan entre sí.

5

Resultados:

Basándose en los resultados *in vitro* de los ensayos de CAT con un NASSP, se utiliza un patrón de dosificación para estudiar el efecto procoagulante en cobayas con inhibición de FVIII (n = 5) después de la administración intravenosa de 0,05; 0,15, 0,45 ó 1,35 mg/kg de NASSP. Los animales muestran una mediana de tiempo de R (tiempo de coagulación) ligeramente reducida cuando se administran 0,15 y 0,45 mg/kg de NASSP.

10

EJEMPLO 5

15 Objetivo:

Estudiar las propiedades farmacocinéticas de un NASSP en ratas CD después de administración oral. El estudio también aborda la cuestión de si un potenciador de la permeación mejora la biodisponibilidad oral *in vivo* de un NASSP.

20

Métodos:

Después de una noche en estado de ayuno, se alimentan ratas CD macho por sonda gástrica con dos preparaciones líquidas de NASSP a una dosis de 50 mg/kg y 5 ml/kg. Las sustancias se preparan en una solución salina fisiológica sin potenciador o con el 0,8% en peso de DOC o con el 3% en peso de quitosano + bromelaína 0,5 mg/ml. Cada grupo sometido a dosificación con NASSP consistió en seis ratas. Para cada formulación, tres ratas adicionales sirven como controles de vehículo. Se extraen muestras de sangre en presencia de citrato (razón 1:9) antes de la dosificación y 15, 30 min, 1, 5 y 7 h después de la dosificación. Se prepara plasma desplaquetado mediante dos etapas de centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos.

25

30

Los NASSP en las muestras de plasma se detectan mediante un ensayo de fluorescencia. Se realizan experimentos en una placa de microtitulación de 96 pocillos de media área de color negro (Costar).

35

Resultados:

Las ratas a las que se les administró 50 mg/kg de NASSP en solución salina muestran niveles en plasma detectables de NASSP.

40 EJEMPLO 6

Objetivo:

Estudiar las propiedades farmacocinéticas de un NASSP en ratas CD después de administración intravenosa.

45 Métodos:

A ratas CD machos se les administra por vía intravenosa un NASSP a una dosis de 5 mg/kg. Las sustancias se preparan en una solución salina fisiológica y se inyectan a 5 ml/kg. Cada grupo consistió en tres animales. Se extraen muestras de sangre en presencia de citrato (razón 1:9) antes de la dosificación y 5, 30 min, 1, 3, 6 y 10 h después de la dosificación. Se prepara plasma desplaquetado mediante dos etapas de centrifugación a 3000 rpm. Se analizan las muestras de plasma para detectar NASSP mediante cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas.

50

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polímero sintético sulfonado/sulfatado no anticoagulante y no sacárido, (NASSP) en el que dicho polímero se selecciona del grupo que consiste en poli(sulfonato de anetol), poli(sulfato de vinilo), poli(4-estirenosulfonato de sodio) y politirosina sulfatada; y un excipiente farmacéuticamente aceptable,
 5 en la que dicha composición se formula para una formulación de dosificación unitaria, y
 10 en la que dicha formulación de dosificación unitaria comprende además al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un procoagulante, un activador de la ruta de coagulación intrínseca, un activador de la ruta de coagulación extrínseca, un polisacárido sulfatado/sulfonado no anticoagulante (NASP) y un segundo polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido, que tiene una estructura diferente del polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido.
 15
2. Formulación de dosificación unitaria para su uso en un método para tratar a un sujeto que necesita una coagulación sanguínea mejorada que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido al sujeto, comprendiendo la formulación de dosificación unitaria el polímero según la reivindicación 1 en una cantidad terapéuticamente eficaz.
 20
3. Formulación de dosificación unitaria para su uso según la reivindicación 2, en la que
 25 (i) la formulación de dosificación unitaria comprende desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 1000 mg del polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido,
 (ii) el polímero mejora la coagulación sanguínea tras la administración de la formulación de dosificación unitaria a un sujeto, y/o
 30 (iii) la formulación de dosificación unitaria es una formulación de dosificación unitaria oral.
4. Composición que comprende un polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido para su uso en un método para tratar a un sujeto que necesita una coagulación sanguínea mejorada, en el que dicho polímero se selecciona del grupo que consiste en poli(sulfonato de anetol), poli(sulfato de vinilo), poli(4-estirenosulfonato de sodio) y politirosina sulfatada, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición que comprende el polímero sulfonado/sulfatado no anticoagulante y no sacárido a dicho sujeto.
 35
5. Composición según la reivindicación 4 para el uso según la reivindicación 4, en la que
 40 (i) el polímero se administra al sujeto a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg,
 (ii) el polímero se administra como una formulación de dosificación unitaria,
 45 (iii) el polímero se administra por vía oral.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-5 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en la que el sujeto tiene un trastorno hemorrágico seleccionado del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico crónico o agudo, un trastorno de coagulación congénito provocado por una deficiencia de factor sanguíneo y un trastorno de coagulación adquirido.
 50
7. Composición según la reivindicación 6 para el uso según la reivindicación 6, en la que la deficiencia de factor sanguíneo es una deficiencia de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, factor XIII y factor de von Willebrand.
 55
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-5 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en la que dicho polímero se administra a dicho sujeto antes de cirugía u otro procedimiento invasivo.
 60
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-8 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, comprendiendo además el método administrar un agente seleccionado del grupo que consiste en un procoagulante, un activador de la ruta de coagulación intrínseca, un activador de ruta de coagulación extrínseca, un polisacárido sulfatado/sulfonado no anticoagulante (NASP) y un segundo polímero no anticoagulante, sulfonado/sulfatado no sacárido, que tiene una estructura diferente del polímero no anticoagulante, sulfonado/sulfatado no sacárido.
 65

10. Composición según la reivindicación 9 para el uso de la reivindicación 9, en la que
- 5 (i) el agente se selecciona del grupo que consiste en factor tisular, factor II, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor X, factor X, factor Xa, factor IXa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, precalicreína, HMWK y factor de von Willebrand,
- 10 (ii) el anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), antitrombina III, anticoagulante lúpico, péptido anticoagulante de nematodos (NAPc2), factor VIIa con el sitio activo bloqueado (factor VIIai), inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, incluyendo fondaparinux, idraparinux, DX-9065a y razaxabano (DPC906), inhibidores de los factores Va y VIIIa, incluyendo proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de trombina, incluyendo hirudina, bivalirudina, argatrobán y ximelagatrán, y un anticuerpo que se une a un factor de coagulación, o
- 15 (iii) el anticoagulante es un anticuerpo que se une a un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor XI, factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína y HMWK.
- 20 11. Composición que comprende un polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido para su uso en un método de inhibición de la actividad del inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) en un sujeto, en el que dicho polímero se selecciona del grupo que consiste en poli(sulfonato de anetol), poli(sulfato de vinilo), poli(4-estirenosulfonato de sodio) y politirosina sulfatada, comprendiendo el método administrar al sujeto la composición que comprende el polímero sulfonado/sulfatado no anticoagulante y no sacárido e inhibir TFPI.
- 25 12. Método de inhibición de la actividad de TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el método combinar la muestra biológica con un polímero sulfonado/sulfatado no anticoagulante y no sacárido, en el que dicho polímero se selecciona del grupo que consiste en poli(sulfonato de anetol), poli(sulfato de vinilo), poli(4-estirenosulfonato de sodio) y politirosina sulfatada, e inhibir la actividad de TFPI.
- 30 13. Método de medición de la aceleración de la coagulación sanguínea por un polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido en una muestra biológica, en el que dicho polímero se selecciona del grupo que consiste en poli(sulfonato de anetol), poli(sulfato de vinilo), poli(4-estirenosulfonato de sodio) y politirosina sulfatada, comprendiendo el método: a) combinar la muestra biológica con una composición que comprende el polímero, b) medir el tiempo de coagulación de la muestra biológica, c) comparar el tiempo de coagulación de la muestra biológica con el tiempo de coagulación de una muestra biológica correspondiente no expuesta al polímero, en el que una disminución del tiempo de coagulación de la muestra biológica expuesta al polímero es indicativa de un polímero que acelera la coagulación.
- 35 14. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polímero sintético sulfatado o sulfonado, no anticoagulante y no sacárido en el que el polímero base se selecciona del grupo que consiste en polivinilo, polianetol, politirosina y poliestireno; y un excipiente farmacéuticamente aceptable,
- 40 en la que dicha composición se formula para una formulación de dosificación unitaria, y
- 45 en la que dicha formulación de dosificación unitaria comprende además al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un procoagulante, un activador de la ruta de coagulación intrínseca, un activador de la ruta de coagulación extrínseca, un polisacárido sulfatado/sulfonado no anticoagulante (NASP) y un segundo polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido, que tiene una estructura diferente del polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido.
- 50 15. Composición que comprende un polímero sulfonado/sulfatado no anticoagulante y no sacárido, en la que el polímero base se selecciona del grupo que consiste en polivinilo, polianetol, politirosina y poliestireno para su uso en un método para tratar a un sujeto que necesita una coagulación sanguínea mejorada, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición que comprende el polímero sulfonado/sulfatado, no anticoagulante y no sacárido a dicho sujeto.
- 55

FIG. 1

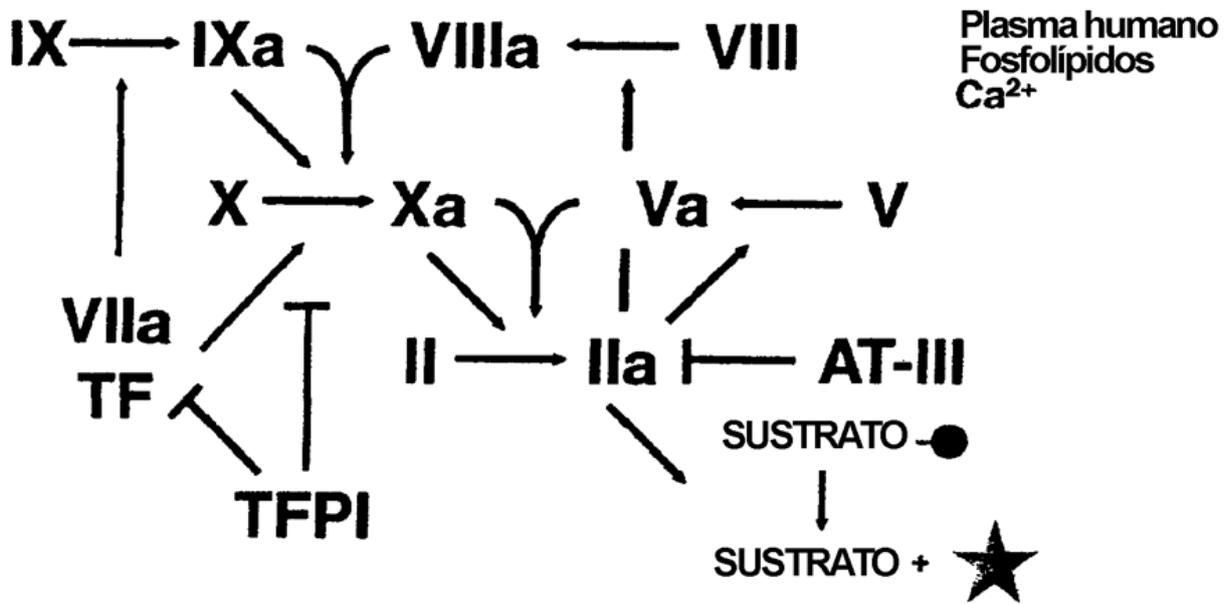


FIG. 2

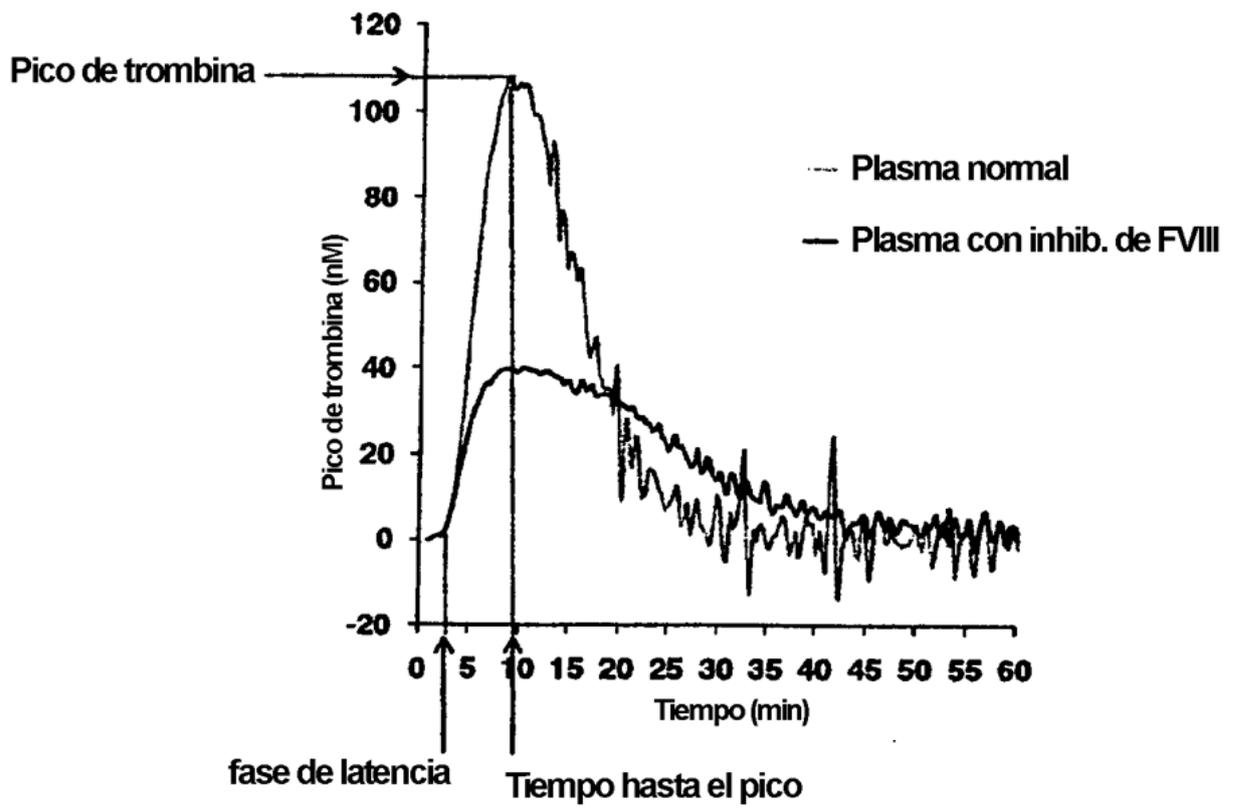
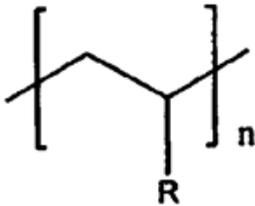
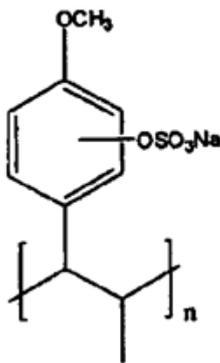


FIG. 3

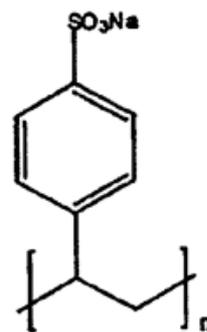
Polímeros no basados en hidratos de carbono, sulfatados



- R = SO₃Na, poli(sulfonato de vinilo)
- R = OSO₃K poli(sulfato de vinilo)
- R = PO₃HNa, poli(fosfonato de vinilo)
- R = OPO₃Na, poli(fosfato de vinilo)



Polianetol



Poli(4-estirenosulfonato de sodio)

FIG. 4A

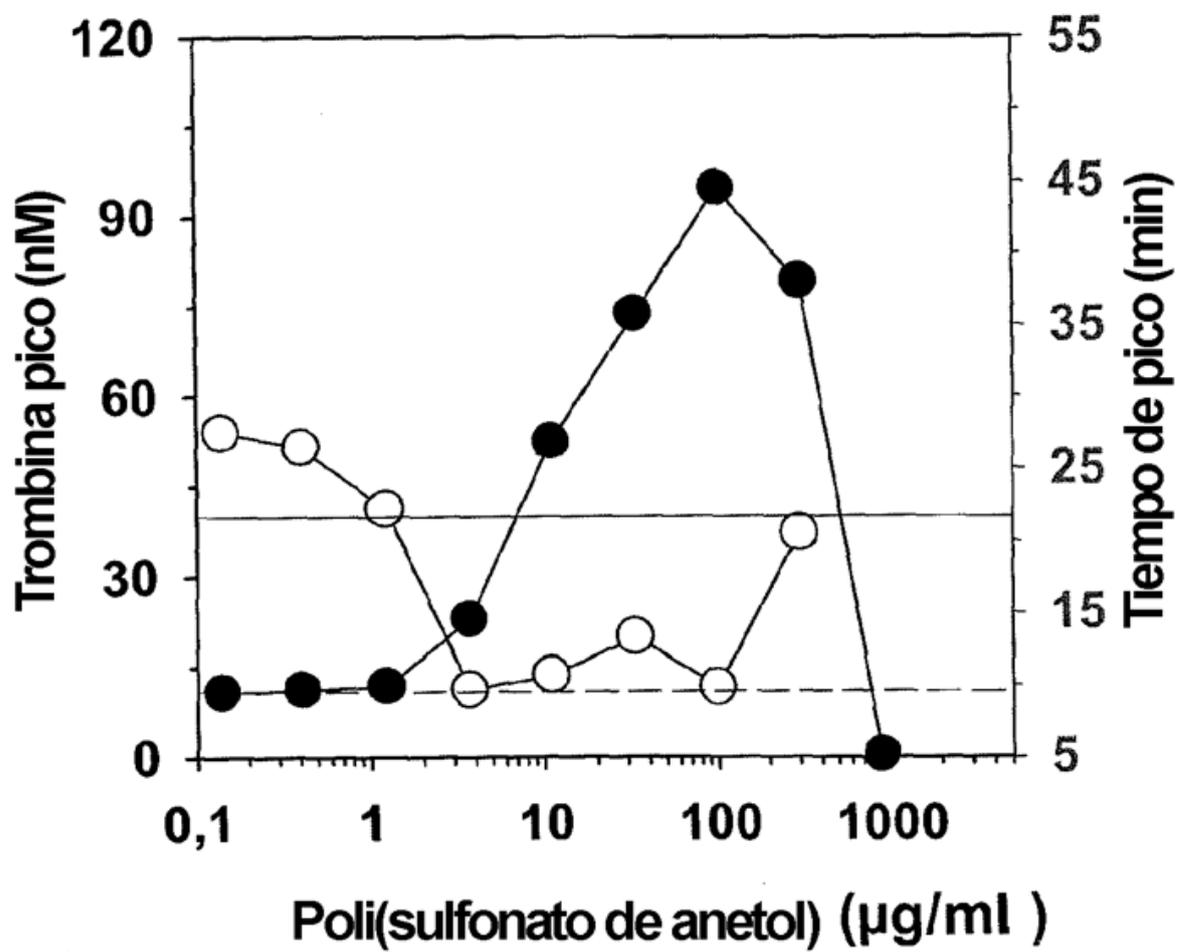


FIG. 4B

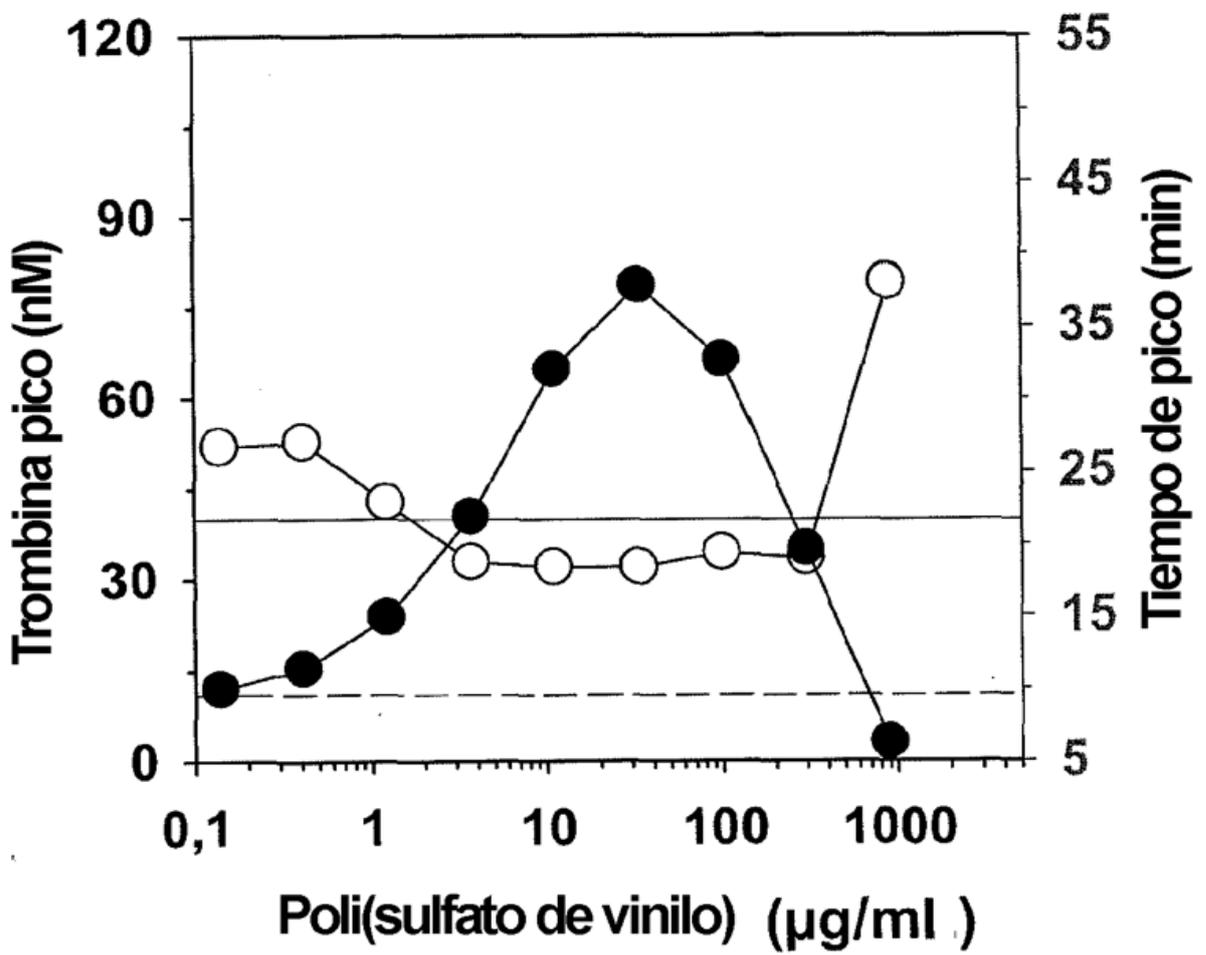


FIG. 4C

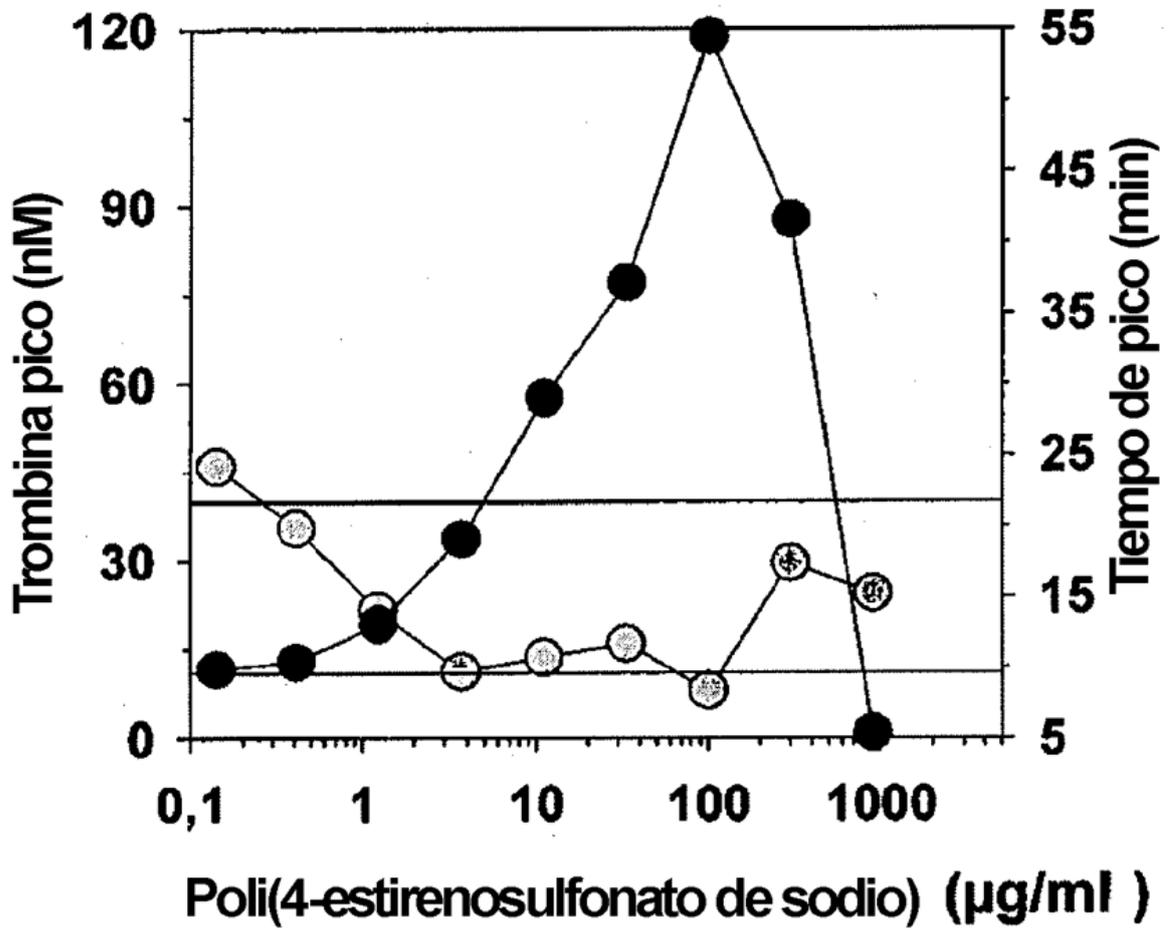


FIG. 4D

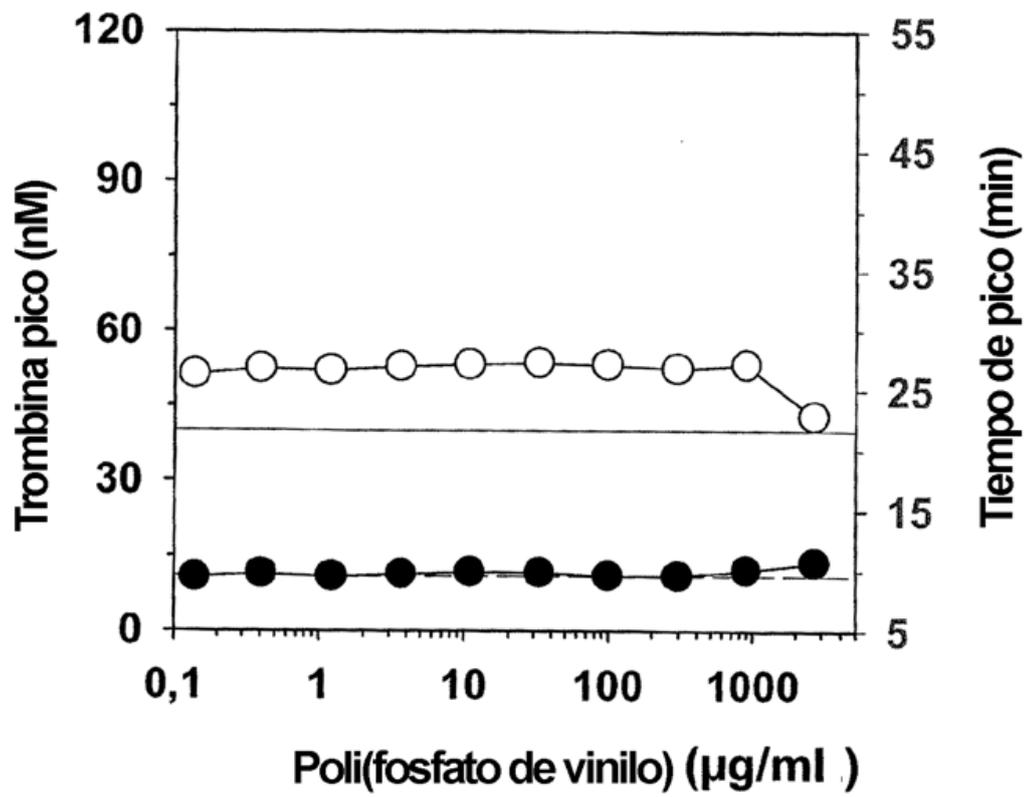


FIG. 4E

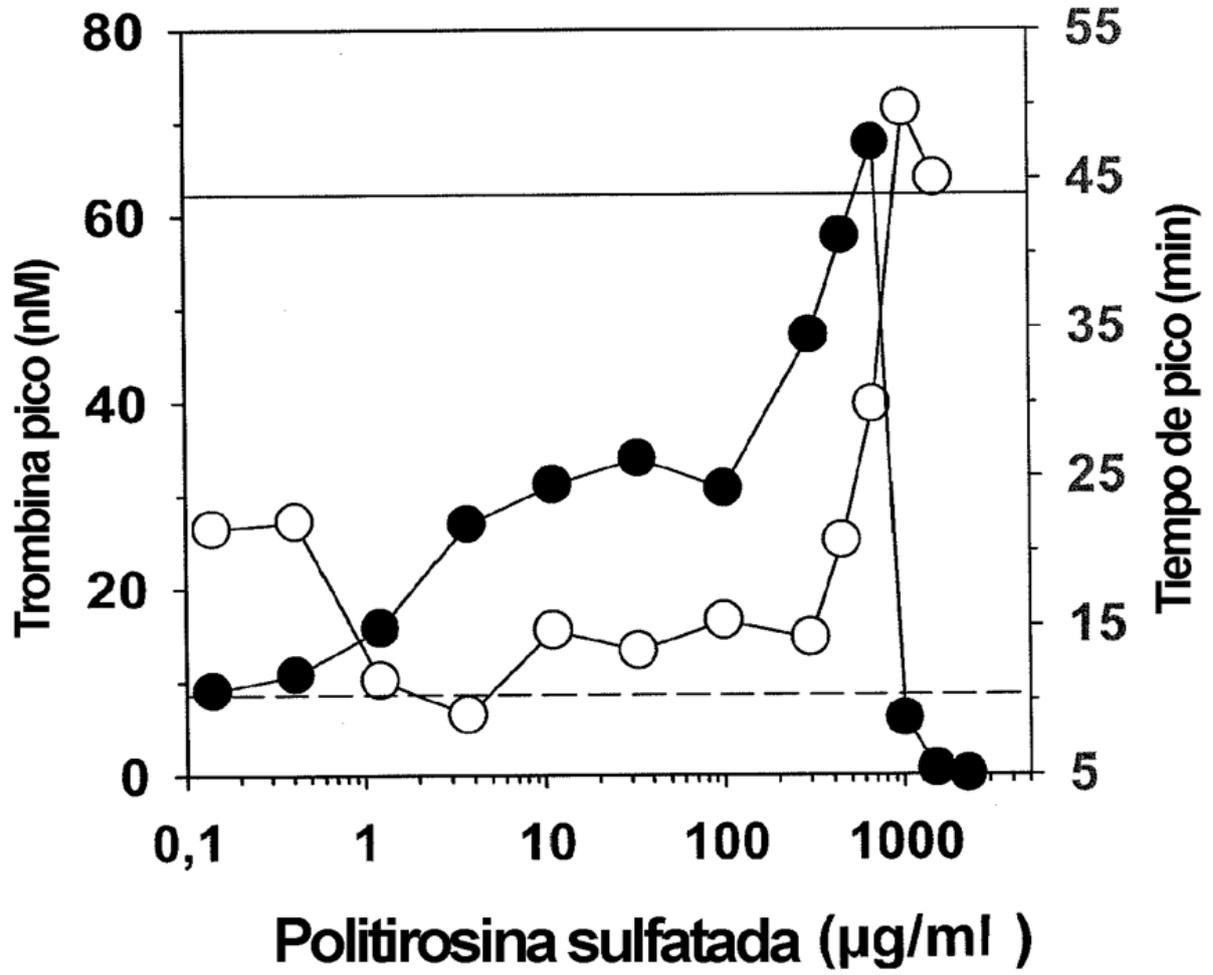


FIG. 5

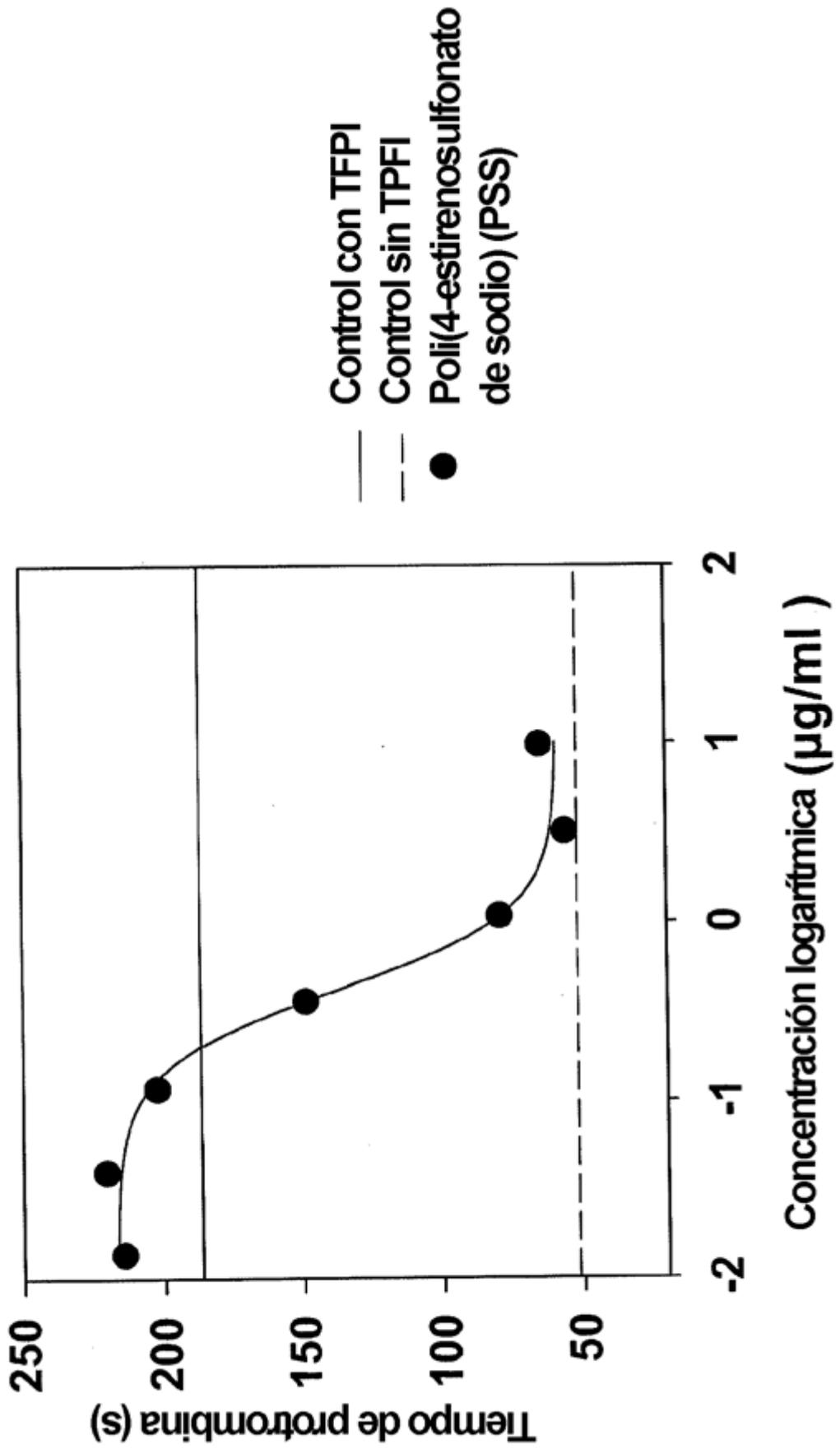


FIG. 6

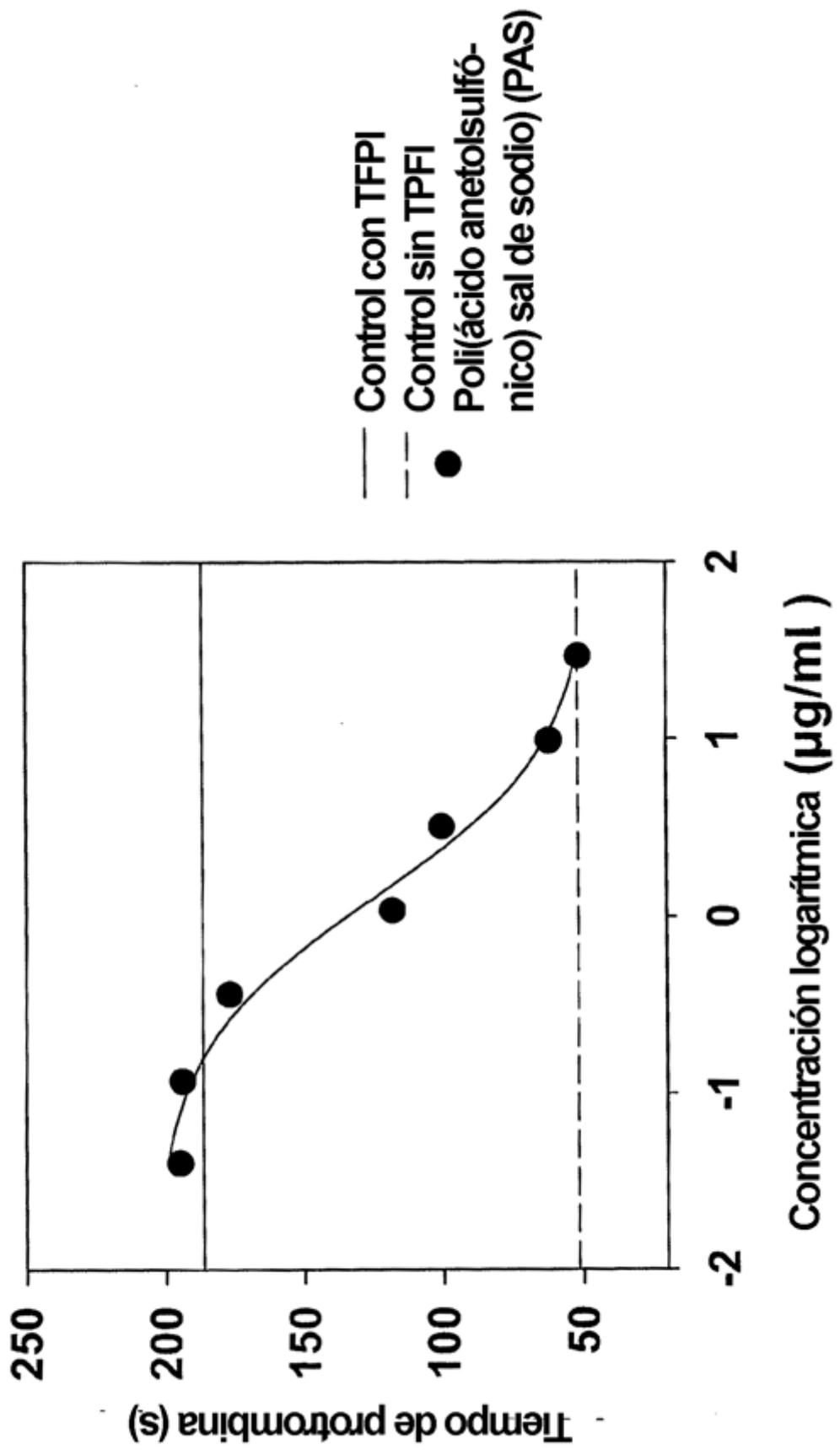


FIG. 7

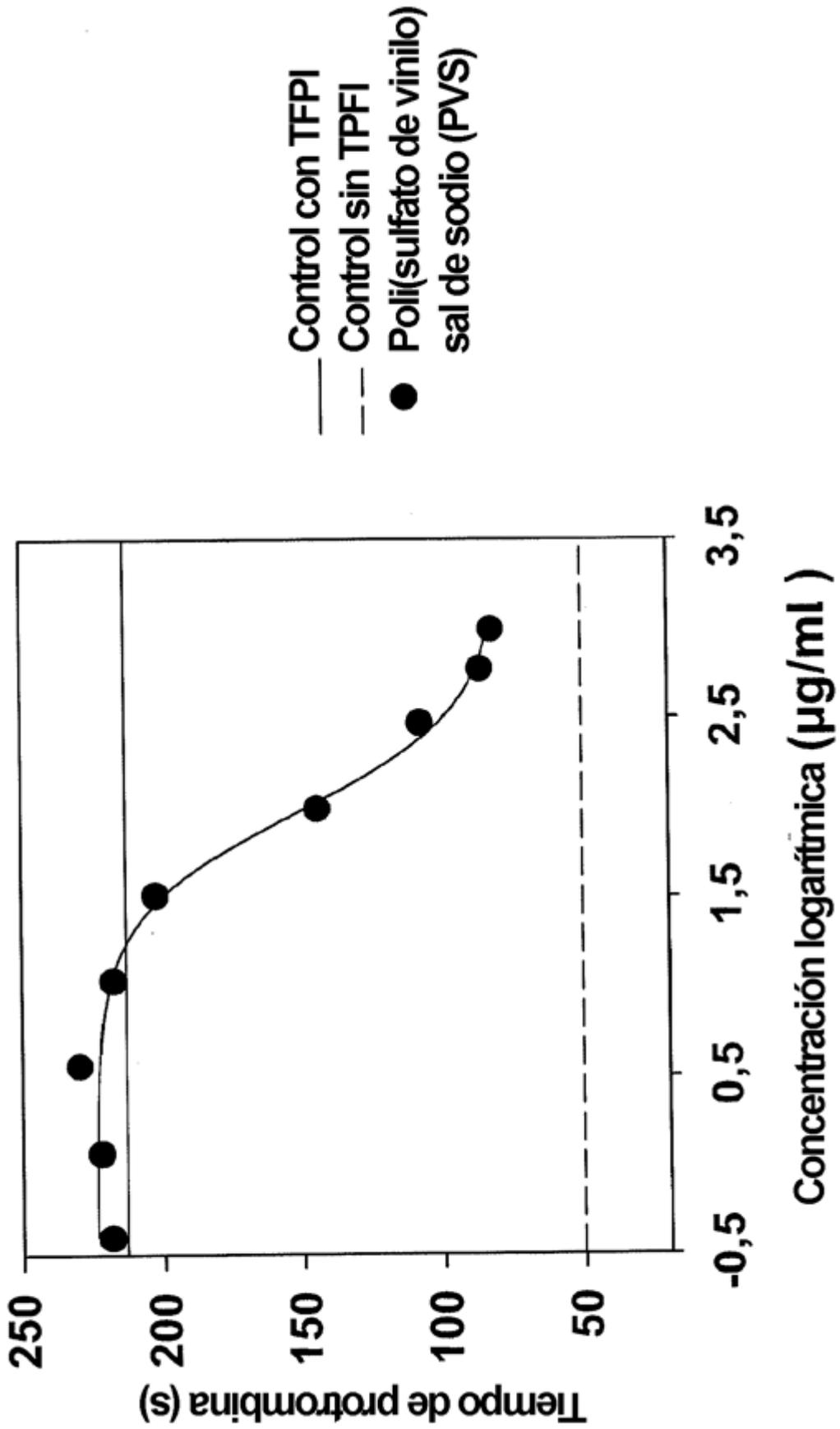


FIG. 8

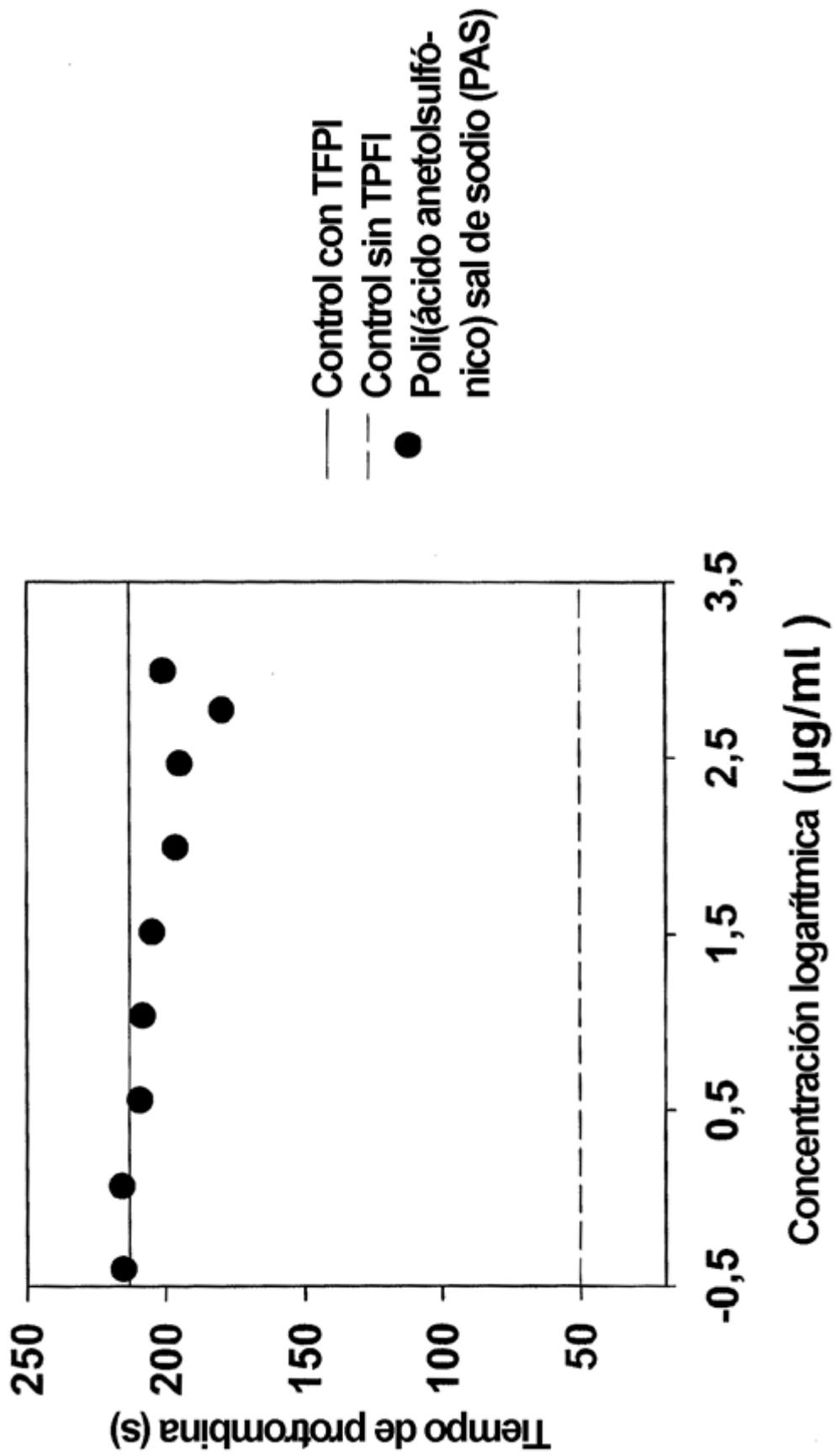


FIG. 9

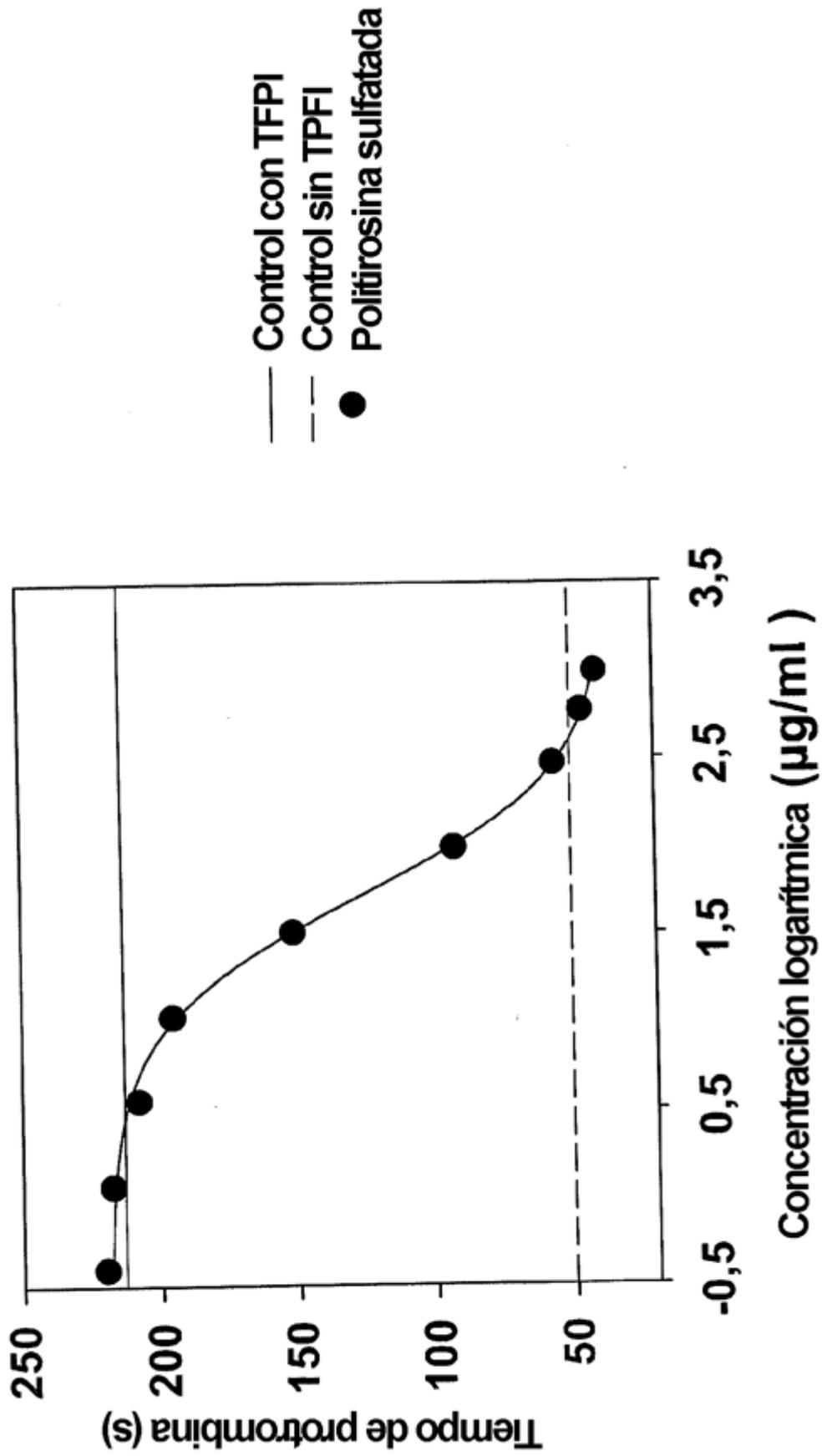


FIG. 10

NASP	CE50	CE50	CE50
	TFPI-dPT µg/ml	CAT* µg/ml	CAT** µg/ml
Sal de sodio de poli(ácido anetolsulfónico)	1.27	14.0	5.5
Poli(4-estirenosulfonato de sodio)	0.42	10.9	1.2
Sal de potasio de poli(sulfato de vinilo)	94.3	5.4	> 150
Sal de sodio de poli(ácido vinilfosfórico)	sin actividad	sin actividad	sin actividad
Politirosina sulfatada	51.7	2.13	103.7

* Lote de plasma con inhibición de FVIII: NP1497 o NP1926 (PT)

** Lote de plasma normal: NP2125

FIG. 11

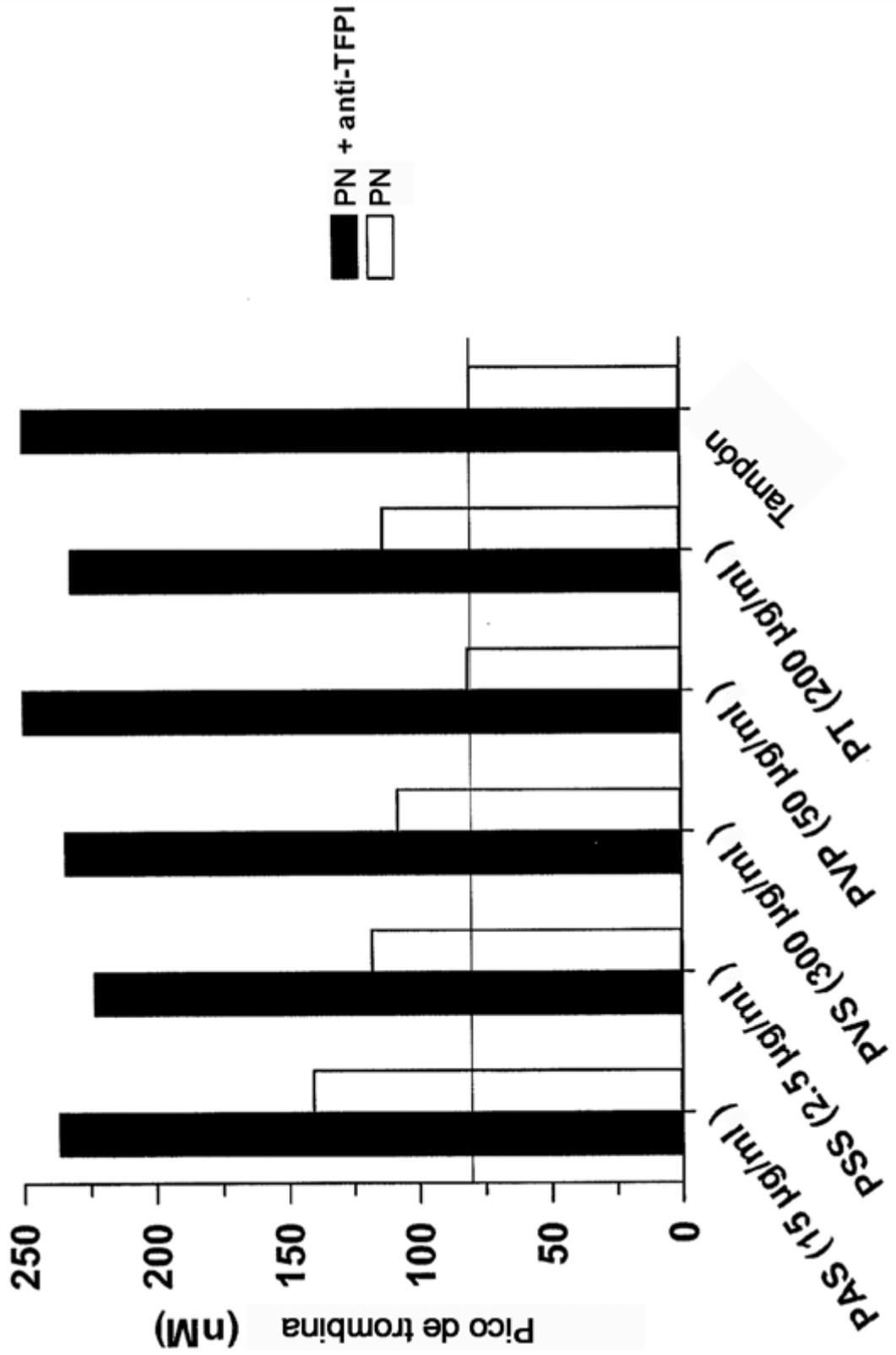


FIG. 12

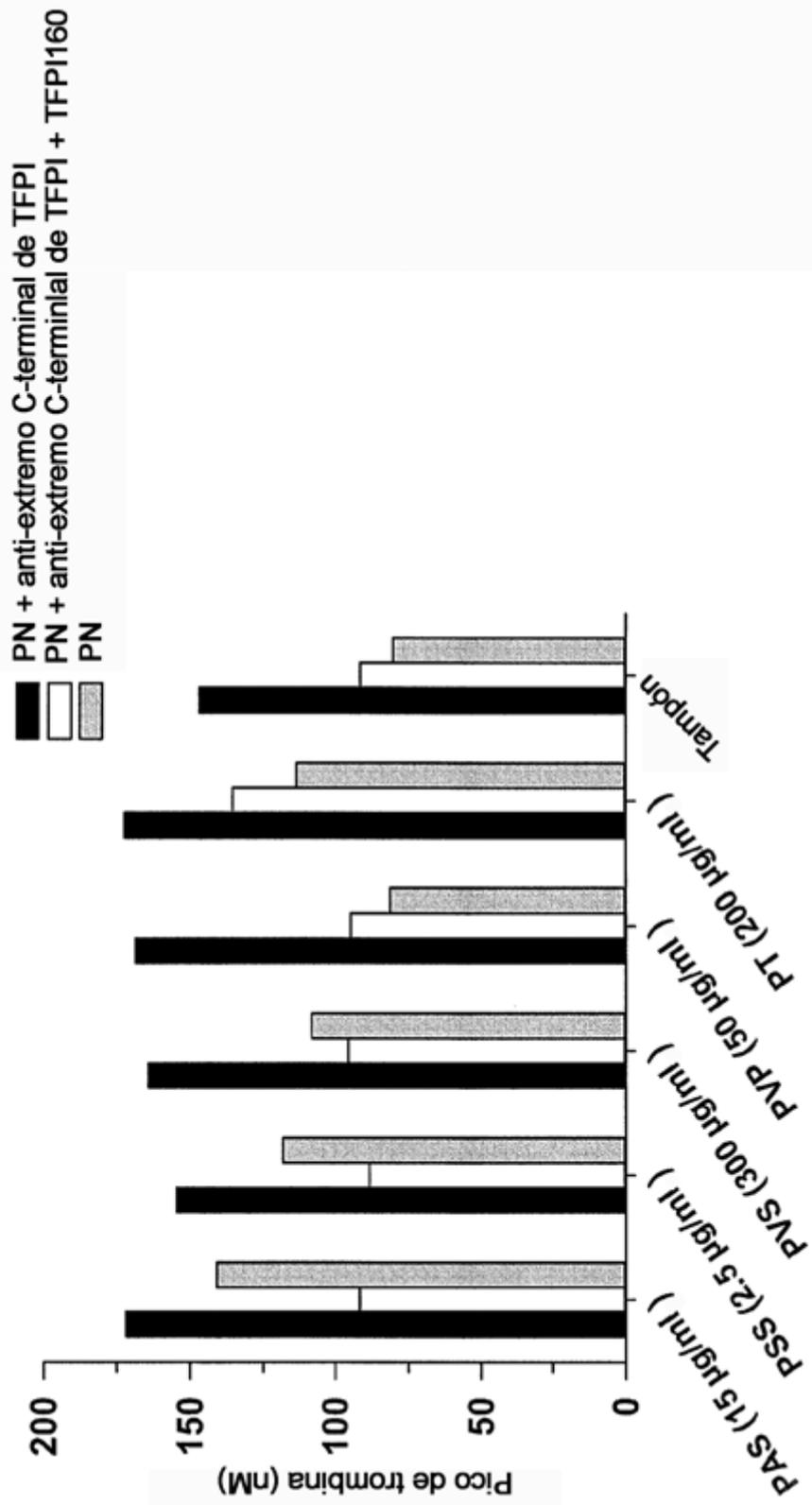


FIG. 13B

		agente adicional																																			
Polimero base de NASSP		Factor de von Willibrand				Factor tisular				Reactivo APTT				fibrina				Veneno de víbora de Russell				Partículas de sílice micronizadas				Acido etáico				sulfatos				caolín			
		A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A35	A36	A37	A38	A39	A40	A41	A42	A43	A44	A45	A46	A47
polivinilo	B12	B13	C13	D13	B14	C14	D14	B15	C15	D15	B16	C16	D16	B17	C17	D17	B18	C18	D18	B19	C19	D19	B20	C20	D20	B21	C21	D21	B22	C22	D22	B23	C23	D23			
poliestireno	C12	C13	D13	C14	D14	C15	D15	C16	D16	C17	D17	C18	D18	C19	D19	C20	D20	C21	D21	C22	D22	C23	D23	C24	D24	C25	D25	C26	D26	C27	D27	C28	D28				
poliisrosina	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30	D31	D32	D33	D34	D35	D36	D37	D38	D39	D40	D41	D42	D43	D44				
polianetol																																					

FIG. 14A

combinación NASSP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASSP		
	intervalo de dosificación a (por ejemplo para i.v.) [mg/kg]	intervalo de dosificación b (por ejemplo para s.c.) [mg/kg]	intervalo de dosificación c (por ejemplo para oral) [mg/kg]
A1	0.02-2	0.2-20	3-300
A2	0.02-2	0.2-20	3-300
A3	0.02-2	0.2-20	3-300
A4	0.02-2	0.2-20	3-300
A5	0.02-2	0.2-20	3-300
A6	0.02-2	0.2-20	3-300
A7	0.02-2	0.2-20	3-300
A8	0.02-2	0.2-20	3-300
A9	0.02-2	0.2-20	3-300
A10	0.02-2	0.2-20	3-300
A11	0.02-2	0.2-20	3-300
A12	0.02-2	0.2-20	3-300
A13	0.02-2	0.2-20	3-300
A14	0.02-2	0.2-20	3-300
A15	0.02-2	0.2-20	3-300
A16	0.02-2	0.2-20	3-300
A17	0.02-2	0.2-20	3-300
A18	0.02-2	0.2-20	3-300
A19	0.02-2	0.2-20	3-300
A20	0.02-2	0.2-20	3-300
A21	0.02-2	0.2-20	3-300
B1	0.05-5	0.5-50	5-500
B2	0.05-5	0.5-50	5-500
B3	0.05-5	0.5-50	5-500
B4	0.05-5	0.5-50	5-500
B5	0.05-5	0.5-50	5-500
B6	0.05-5	0.5-50	5-500
B7	0.05-5	0.5-50	5-500
B8	0.05-5	0.5-50	5-500
B9	0.05-5	0.5-50	5-500
B10	0.05-5	0.5-50	5-500
B11	0.05-5	0.5-50	5-500
B12	0.05-5	0.5-50	5-500
B13	0.05-5	0.5-50	5-500
B14	0.05-5	0.5-50	5-500
B15	0.05-5	0.5-50	5-500
B16	0.05-5	0.5-50	5-500
B17	0.05-5	0.5-50	5-500
B18	0.05-5	0.5-50	5-500
B19	0.05-5	0.5-50	5-500
B20	0.05-5	0.5-50	5-500
B21	0.05-5	0.5-50	5-500
C1	0.01-1	0.1-1	1-100
C2	0.01-1	0.1-1	1-100
C3	0.01-1	0.1-1	1-100
C4	0.01-1	0.1-1	1-100
C5	0.01-1	0.1-1	1-100

FIG. 14B

combinación NASSP/agente adicional	Intervalo de dosificación de NASSP		
	intervalo de dosificación a (por ejemplo para i.v.) [mg/kg]	intervalo de dosificación b (por ejemplo para s.c.) [mg/kg]	intervalo de dosificación c (por ejemplo para oral) [mg/kg]
C6	0.01-1	0.1-1	1-100
C7	0.01-1	0.1-1	1-100
C8	0.01-1	0.1-1	1-100
C9	0.01-1	0.1-1	1-100
C10	0.01-1	0.1-1	1-100
C11	0.01-1	0.1-1	1-100
C12	0.01-1	0.1-1	1-100
C13	0.01-1	0.1-1	1-100
C14	0.01-1	0.1-1	1-100
C15	0.01-1	0.1-1	1-100
C16	0.01-1	0.1-1	1-100
C17	0.01-1	0.1-1	1-100
C18	0.01-1	0.1-1	1-100
C19	0.01-1	0.1-1	1-100
C20	0.01-1	0.1-1	1-100
C21	0.01-1	0.1-1	1-100
D1	0.06-6	0.6-60	6-500
D2	0.06-6	0.6-60	6-500
D3	0.06-6	0.6-60	6-500
D4	0.06-6	0.6-60	6-500
D5	0.06-6	0.6-60	6-500
D6	0.06-6	0.6-60	6-500
D7	0.06-6	0.6-60	6-500
D8	0.06-6	0.6-60	6-500
D9	0.06-6	0.6-60	6-500
D10	0.06-6	0.6-60	6-500
D11	0.06-6	0.6-60	6-500
D12	0.06-6	0.6-60	6-500
D13	0.06-6	0.6-60	6-500
D14	0.06-6	0.6-60	6-500
D15	0.06-6	0.6-60	6-500
D16	0.06-6	0.6-60	6-500
D17	0.06-6	0.6-60	6-500
D18	0.06-6	0.6-60	6-500
D19	0.06-6	0.6-60	6-500
D20	0.06-6	0.6-60	6-500
D21	0.06-6	0.6-60	6-500

FIG. 15

agente adicional	intervalo de dosificación
Factor XI	5-90 U/kg
Factor XII	5-90 U/kg
precalicreína	5-90 U/kg
quininógeno de alto peso molecular (HMWK)	5-90 U/kg
Factor V	5-90 U/kg
Factor VII	5-90 U/kg
Factor VIII	5-90 U/kg
Factor IX	5-90 U/kg
Factor X	5-90 U/kg
Factor XIII	5-90 U/kg
Factor II	5-90 U/kg
Factor de von Willebrand	5-90 U/kg
Factor tisular	5-90 U/kg
Factor VIIa	10-100 µg/kg
Factor Va	5-90 U/kg
Factor Xa	5-90 U/kg
Factor IXa	5-90 U/kg
Factor XIa	5-90 U/kg
Factor XIIa	5-90 U/kg
Factor VIIIa	5-90 U/kg
reactivo APTT	0.01-10 mg/kg
tromboplastina	5-90 U/kg
fibrina	5-90 U/kg
TFPI	5-90 U/kg
veneno de vívora de Rusell	0.01-10 µg/kg
partículas de sílice micronizada	0.01-10 mg/kg
ácido elágico	0.01-10 mg/kg
sulfátidos	0.01-10 mg/kg
caolín	0.01-10 mg/kg

FIG. 16A

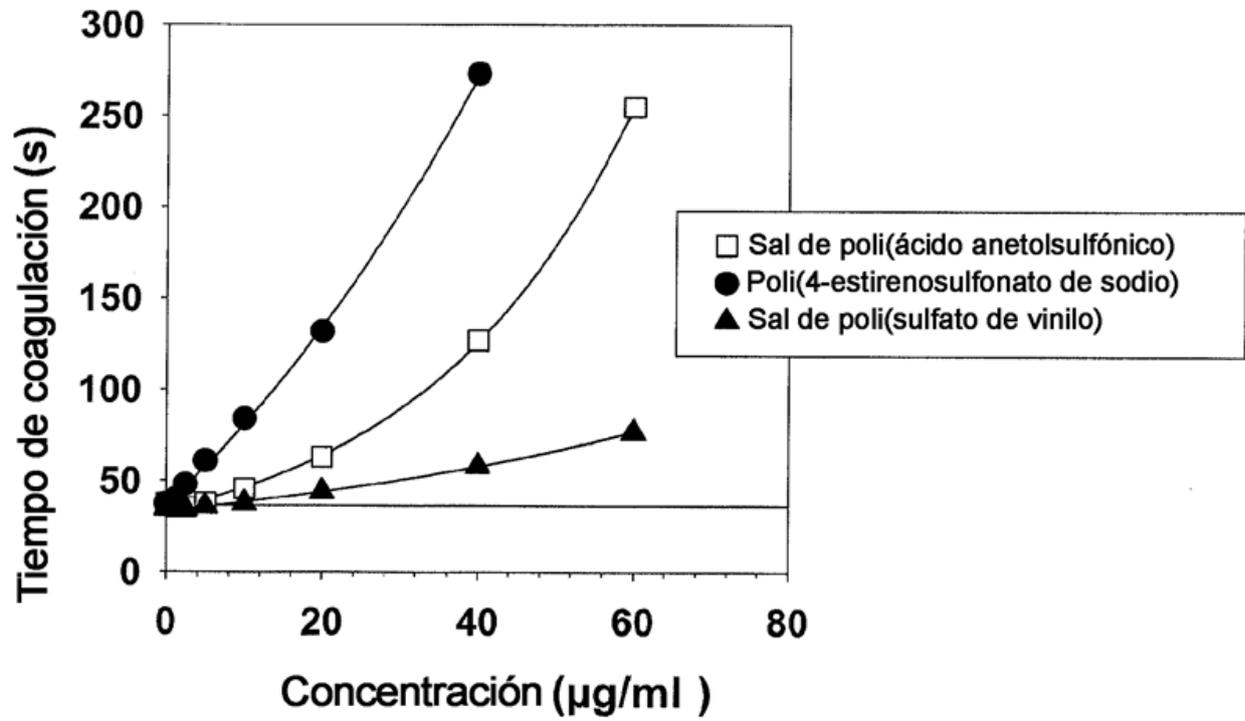


FIG. 16B

