(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 779 228**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/715 (2006.01)
A61M 1/00 (2006.01)
A61M 1/02 (2006.01)
A61M 1/14 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014** **PCT/GB2014/053808**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15092437**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014** **E 14815848 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 3082830**

(54) Título: **Uso de oligómeros de alginato como anticoagulantes sanguíneos**

(30) Prioridad:

20.12.2013 GB 201322777

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.08.2020

(73) Titular/es:

ALGIPHARMA AS (100.0%)
Industriveien 33
1337 Sandvika, NO

(72) Inventor/es:

DESSEN, ARNE y
RYE, PHILIP

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 779 228 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de oligómeros de alginato como anticoagulantes sanguíneos

La presente invención se refiere al uso de ciertos oligómeros de alginato como anticoagulantes sanguíneos, es decir, agentes capaces de prevenir o inhibir la formación de coágulos sanguíneos en sangre entera o plasma. Por consiguiente, la invención proporciona un método para prevenir o inhibir la coagulación sanguínea y, por lo tanto, regular la coagulación sanguínea. La necesidad de regular o controlar la coagulación sanguínea surge en contextos clínicos y no clínicos. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden aplicarse en el tratamiento terapéutico y quirúrgico de enfermedades y afecciones asociadas con la coagulación sanguínea no deseada (trombosis), pero también en la manipulación de sangre completa, plasma o composiciones que lo contienen y también de materiales, productos o dispositivos, o partes de los mismos, que cuando están en uso entran en contacto con la sangre o un producto derivado de la sangre que tiene la capacidad de coagularse. También se proporcionan productos y dispositivos adaptados para usar en tales aplicaciones que contienen y/o están recubiertos con tales oligómeros de alginato.

La coagulación sanguínea (o coagulación de la sangre, términos que se usan indistintamente en la presente memoria) es un mecanismo fisiológico desarrollado por los vertebrados para contrarrestar y remediar las lesiones del sistema circulatorio. En pocas palabras, el proceso de coagulación sanguínea tiene como resultado la producción de una masa agregada de células y matriz proteica que tapona físicamente la brecha en la integridad del sistema circulatorio causada por la lesión.

Más específicamente el proceso de coagulación *in vivo* es una compleja cascada bifurcada de reacciones proteolíticas que tiene como resultado la conversión de la sangre fluida en un gel sólido en última instancia a través de la conversión de fibrinógeno soluble en fibrina insoluble. La conversión de fibrinógeno en fibrina da como resultado una matriz de filamentos proteicos que atrapan las células sanguíneas y otros componentes sanguíneos. Independientemente de la composición exacta de la entidad resultante, se conoce como coágulo de sangre o clínicamente como trombo.

El proceso de coagulación *in vivo* se bifurca porque hay dos puntos de inicio diferentes reconocidos que convergen en el punto del Factor X, la proteína que convierte la protrombina en trombina, que a su vez cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina. Una de las vías de coagulación bifurcadas se conoce como la "vía intrínseca" o la "vía de activación por contacto" debido a las observaciones iniciales de que la vía se activaba al contacto de la sangre con superficies artificiales. Por definición, los mediadores esenciales de este proceso están presentes en la sangre, son por lo tanto "intrínsecos". La otra vía de coagulación bifurcada se denomina "vía extrínseca" o "vía del factor tisular" debido al requisito de iniciación por un "factor tisular" mediador de la superficie celular extraño. La exposición al factor tisular ocurre inmediatamente después de la lesión tisular y, por lo tanto, la vía extrínseca se considera la vía dominante *in vivo.*

Aunque la coagulación sanguínea es un mecanismo de defensa esencial de los organismos vertebrados contra las lesiones, la coagulación no deseada o inapropiada en un contexto clínico da lugar a enfermedades trombóticas en las que un coágulo de sangre causa una obstrucción en un vaso sanguíneo o en el corazón. Tales acontecimientos a menudo conducen a hipoxia e incluso infarto en los tejidos aguas abajo. Puede producirse daño tisular u orgánico y, dependiendo de la ubicación de la isquemia, la trombosis o el daño tisular resultante pueden manifestarse como afecciones como hipertensión, oxigenación sanguínea baja, ictus, infarto cardíaco, embolia pulmonar y angina.

La existencia de la vía de activación por contacto, que es independiente de los mediadores basados en tejido, significa que se observa la coagulación de la sangre completa *in vitro.* Además, los productos que contienen los factores de coagulación de sangre completa, por ejemplo, plasma, pueden experimentar coagulación, incluso si tales productos carecen de células y/o plaquetas. En estas realizaciones, se formarán redes de fibrina insolubles, aunque en ausencia de células sanguíneas, el aspecto general de los coágulos será diferente de los formados en la sangre completa. En consecuencia, la vía de coagulación sanguínea también es importante en el contexto de la manipulación de la sangre y de los productos sanguíneos *in vitro.*

Las intervenciones farmacéuticas que tratan o previenen enfermedades trombóticas están disponibles, pero son limitadas en número y tienen problemas de toxicidad, interacciones farmacológicas y dosificación y restricciones en las vías de administración. Se desean anticoagulantes alternativos que tengan un mejor perfil de seguridad, que sean más fáciles de dosificar y con menos restricciones en las vías de administración. Además, se sabe proporcionar materiales, productos o dispositivos, o partes de los mismos, que cuando están en uso entran en contacto con sangre o un producto derivado de la sangre con superficies, por ejemplo, recubrimientos superficiales, que comprenden compuestos hemocompatibles diseñados para minimizar la coagulación sanguínea en esas superficies. Como alternativa, se desean preferentemente compuestos hemocompatibles mejorados para usar como o en dichos recubrimientos superficiales. También se dispone de aditivos para contrarrestar la coagulación *in vitro*, aunque siempre se requieren alternativas, especialmente alternativas que son seguras de usar con productos sanguíneos destinados a ser administrados a sujetos animales humanos o no humanos.

Los alginatos son polisacáridos naturales que se ha visto que tienen varios usos, tanto clínicos (por ejemplo, en

apósitos para heridas, como vehículos de fármacos y en preparaciones contra la acidez estomacal) como no clínicos (por ejemplo, en la preparación de alimentos). Son polímeros lineales de ácido β-D-manurónico (M) unidos por enlaces (1-4) y/o su epímero C-5 ácido α-L-gulurónico (G). La estructura primaria de los alginatos puede variar mucho. Los residuos M y G se pueden organizar como bloques homopoliméricos de residuos M o G contiguos, como bloques de residuos M y G alternos y residuos M o G individuales que intercalan estas estructuras de bloques. Una molécula de alginato puede comprender algunas o todas estas estructuras y dichas estructuras podrían no estar distribuidas uniformemente en todo el polímero. En el extremo, existe un homopolímero de ácido gulurónico (poliguluronato) o un homopolímero de ácido manurónico (polimanuronato).

Los alginatos se han aislado de algas pardas marinas (por ejemplo, ciertas especies de *Durvillea, Lessonia* y *Laminaria)* y bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii.* Otras pseudomonadas (por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida,* y *Pseudomonas mendocina)* conservan la capacidad genética de producir alginatos, pero en la naturaleza no producen niveles detectables de alginato. Por mutación, estas pseudomonadas no productoras pueden ser inducidas a producir cantidades estables de alginato.

El alginato se sintetiza como polimanuronato y los residuos G se forman por la acción de epimerasas (específicamente epimerasas C-5) sobre los residuos M en el polímero. En el caso de los alginatos extraídos de algas, los residuos G se organizan predominantemente como bloques G porque las enzimas involucradas en la biosíntesis de alginato en algas introducen preferentemente en un G vecino otro G, convirtiendo así tramos de residuos M en bloques G. La elucidación de estos sistemas biosintéticos ha permitido la producción de alginatos con estructuras primarias específicas (WO 94/09124, Gimmestad, M et al, Journal of Bacteriology, 2003, Vol 185(12) 3515-3523 y WO 2004/011628).

Los alginatos se aíslan generalmente de fuentes naturales como grandes polímeros de alto peso molecular (por ejemplo, un peso molecular promedio en el intervalo de 300.000 a 500.000 Daltons). Se sabe, sin embargo, que tales polímeros de alginato grandes pueden degradarse o descomponerse, por ejemplo, por hidrólisis química o enzimática para producir estructuras de alginato de menor peso molecular. Los alginatos que se usan industrialmente generalmente tienen un peso molecular promedio en el intervalo de 100.000 a 300.000 Daltons (tales alginatos todavía se consideran polímeros grandes) aunque los alginatos de un peso molecular promedio de aproximadamente 35.000 Daltons se han usado en productos farmacéuticos. Estos grandes polisacáridos de alginato se han considerado como posibles recubrimientos compatibles con la sangre para superficies artificiales (WO2009/103977; Yoshioka T. et al, Biomaterials, 2003, vol 24 (17), 2889-2894; Yoshioka T. et al; Materials Research Society Symposium Proceedings, Materials Research Society, 2003, 333-338). Por otro lado, se ha descrito que los polisacáridos de alginato grandes son protrombóticos (EP0059221).

Más recientemente, se han propuesto oligómeros de alginato de menor tamaño (peso molecular) para uso clínico, especialmente para reducir la viscosidad del moco, incluido en particular el moco hiperviscoso, como ocurre en los pacientes de fibrosis quística y otras enfermedades respiratorias (véanse los documentos WO 2007/039754 y WO 2008/125828) o como agentes antimicrobianos, contra biopelículas (WO 2009/068841) y bacterias con multirresistencia a fármacos (WO 2010/13957).

Ahora se ha encontrado inesperadamente que los oligómeros de alginato, específicamente los oligómeros de alginato no sulfatados de 2 a 30 monómeros, pueden inhibir e incluso prevenir la coagulación sanguínea y así regular y controlar la coagulación sanguínea, y como resultado se propone que tales oligómeros de alginato sean utilizados como anticoagulantes sanguíneos en métodos para prevenir o inhibir la coagulación sanguínea en sangre completa o composiciones, por ejemplo, productos sanguíneos, que contienen factores de coagulación sanguínea en cualquier contexto fuera o dentro del cuerpo humano o animal. Dichos contextos pueden incluir la inhibición o prevención de la coagulación sanguínea en cualquier material, productos o dispositivos que cuando se usa, ya sea fuera o dentro del cuerpo humano o animal, entran en contacto con sangre o un producto derivado de la sangre que tiene la capacidad de coagularse. En tales aspectos, el oligómero de alginato puede proporcionarse en o sobre la superficie de dichos materiales, productos o dispositivos (es decir, en una forma inmovilizada). Los oligómeros de alginato son fácilmente susceptibles de proporcionarse en tales formas. Dichos contextos también incluyen el aprovechamiento de los efectos anticoagulantes de los oligómeros de alginato de uso en la invención en el cuerpo humano o animal como agentes terapéuticos anticoagulantes, que pueden proporcionarse en una forma no inmovilizada. Los oligómeros de alginato no son tóxicos, son fáciles de administrar y dosificar y no se conoce que muestren interacciones farmacológicas y, por lo tanto, estos compuestos abordan algunas o todas las deficiencias señaladas anteriormente.

Por tanto, en un primer aspecto la invención proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para la prevención o inhibición de la coagulación sanguínea, comprendiendo dicho método poner en contacto una composición que comprende plasma sanguíneo, preferentemente sangre completa o un material cuya dicha composición está, o puede estar, en contacto, con un oligómero de alginato de 2 a 30 residuos de monómero, en la que dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato.

El término "contacto" abarca cualquier medio de suministrar el oligómero de alginato a la composición que comprende plasma sanguíneo (o exponer la composición al oligómero de alginato), ya sea directa o indirectamente. El alginato se puede proporcionar de forma libre y/o inmovilizada, por ejemplo, transportado o contenido en una superficie que

cuando está en uso puede entrar en contacto con la composición que comprende plasma sanguíneo. El oligómero de alginato puede aplicarse o incorporarse al material a partir del cual se forma la superficie o el material puede impregnarse con el oligómero, por ejemplo, los oligómeros de alginato pueden recubrirse sobre una superficie del material, o proporcionarse como parte de un recubrimiento superficial. Esto puede ocurrir antes, durante o después de la formación de la superficie y puede realizarse a través de interacciones covalentes o no covalentes, por ejemplo, interacciones iónicas o electrostáticas, expresadas más generalmente, por adsorción, que puede ser de cualquier manera. En particular, los oligómeros de alginato de composición monomérica adecuada pueden proporcionarse en una superficie como un gel inducido por cationes, o como parte del mismo.

Los oligómeros de alginato de uso en la invención, cuando se proporcionan en o sobre la superficie de un material, hacen que el material sea más hemocompatible y, por lo tanto, en determinadas realizaciones, puede considerarse que es una capa o revestimiento hemocompatible.

En otras realizaciones adicionales, el oligómero de alginato se proporciona o se incluye en un recubrimiento hemocompatible que comprende uno o más compuestos hemocompatibles adicionales, por ejemplo heparina, heparán sulfato, hialuronano, polietilenglicol o dextrano, o de hecho cualquier agente bioactivo que tenga una actividad o propiedad anticoagulante o cualquier agente o material que ayude a reducir la coagulación, por ejemplo, reducción de la activación plaquetaria y/o unión de los componentes sanguíneos (por ejemplo, proteínas) necesarios para la coagulación.

En otras realizaciones, el oligómero de alginato no se usa en forma inmovilizada. Generalmente, en tales realizaciones, el oligómero de alginato se administra en su forma nativa o como parte de una composición, por ejemplo, una formulación farmacéuticamente aceptable.

La invención puede usarse para inhibir o prevenir la coagulación sanguínea en cualquier contexto fuera del cuerpo humano o animal, en particular sobre o en cualquier material, productos o dispositivos que cuando se usan *in vitro* o *ex vivo* entran en contacto con sangre o un producto derivado de la sangre. En aspectos adicionales, los efectos anticoagulantes de oligómeros de alginato de 2 a 30 residuos de monómero, en los que dichos residuos de monómero no portan un grupo sulfato, se aprovechan en el contexto del cuerpo humano o animal, por ejemplo, como agentes terapéuticos o como parte de superficies diseñadas de dispositivos médicos implantables o internos. Se apreciará, por lo tanto, que se incluyen métodos tanto médicos como no médicos, por ejemplo, se incluyen métodos *in vitro* y *ex vivo*, así como usos *in vivo*. Tal como se explica a continuación más detalladamente, se incluyen expresamente dentro del alcance de la invención métodos que no se llevan a cabo en o sobre el cuerpo animal humano o no humano, o en relación con, o en o sobre un dispositivo o material total o parcialmente contenido en el cuerpo de vertebrados humanos o no humanos.

Así, la invención proporciona adicionalmente un oligómero de alginato para usar en la terapia de anticoagulación (o antitrombosis), en el que dicho oligómero de alginato contiene de 2 a 30 residuos de monómero, y dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato. Más específicamente, la invención proporciona un oligómero de alginato para usar en un método para tratar o prevenir la trombosis, o una enfermedad o afección asociada con la coagulación sanguínea (o trombosis), en el que dicho oligómero de alginato contiene de 2 a 30 residuos de monómero, y dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un oligómero de alginato para la fabricación de un medicamento para usar en terapia de anticoagulación sanguínea (o antitrombosis), en el que dicho oligómero de alginato contiene de 2 a 30 residuos de monómero, y dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato. Más específicamente, la invención proporciona un oligómero de alginato para la fabricación de un medicamento para usar en un método para tratar o prevenir la trombosis, o una enfermedad o afección asociada con la coagulación sanguínea (o trombosis), en el que dicho oligómero de alginato contiene de 2 a 30 residuos de monómero, y dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato.

Por lo tanto, también se describe un método de terapia de anticoagulación (o antitrombosis), comprendiendo dicho método administrar un oligómero de alginato a un vertebrado humano o no humano que necesita dicha terapia, en el que dicho oligómero de alginato contiene de 2 a 75 residuos de monómero, y dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato.

Por lo tanto, también se describe un método para tratar o prevenir la trombosis, o una enfermedad o afección asociada con la coagulación sanguínea (o trombosis), comprendiendo dicho método administrar un oligómero de alginato a un vertebrado humano o no humano que lo necesite, en el que dicho oligómero de alginato contiene de 2 a 75 residuos de monómero, y dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato.

En estas realizaciones terapéuticas, el oligómero de alginato se administra en una cantidad eficaz para inhibir o prevenir la coagulación sanguínea, por ejemplo, para tratar o prevenir la enfermedad o afección objetivo asociada con la coagulación sanguínea.

Los métodos terapéuticos en los que se puede usar el oligómero de alginato de la invención pueden estar precedidos

por una etapa en la que el sujeto se identifica o diagnostica como un sujeto con riesgo de trombosis, o un sujeto en el que se está formando o ha formado un trombo o se sospecha que se está formando o se ha formado, por ejemplo, un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de una enfermedad o afección asociada con la coagulación sanguínea.

En otras realizaciones, los métodos terapéuticos en los que se puede usar el oligómero de alginato de la invención pueden ir seguidos de una etapa en la que se controla al sujeto para detectar un efecto sobre la trombosis y/o un cambio en la condición o estado clínico. Por ejemplo, el sujeto se controla para detectar la formación de un coágulo de sangre, o el número de coágulos, y/o un coágulo de sangre existente se controla para detectar cambios en el tamaño, forma y/o integridad, por ejemplo, utilizando las técnicas detalladas a continuación. En otras realizaciones, la etapa adicional puede ser una etapa en la que se controla al sujeto para detectar el inicio de una enfermedad o afección asociada con la coagulación sanguínea o cambios en una enfermedad o afección preexistente asociada con la coagulación sanguínea. En otras realizaciones, la etapa adicional puede ser una etapa en la que se analiza la sangre del sujeto para evaluar su capacidad de coagular, por ejemplo, utilizando las pruebas de coagulación detalladas a continuación.

Como se ha señalado anteriormente, los alginatos generalmente existen como polímeros de un peso molecular promedio de al menos 35.000 Daltons, es decir, aproximadamente 175 a aproximadamente 190 residuos de monómero, aunque generalmente mucho mayor y un oligómero de alginato puede definirse como un material obtenido por fraccionamiento (es decir, reducción de tamaño) de un polímero de alginato, comúnmente un alginato natural. Más particularmente, un oligómero de alginato para usar según la invención contendrá de 2 a 30 residuos. Así, un oligómero de alginato para usar de acuerdo con la invención tendrá generalmente un peso molecular promedio de 350 a 6.000 Daltons.

Como alternativa, el oligómero de alginato puede tener un grado de polimerización (DP), o un grado de polimerización promedio en número (DPn) de 2 a 30, 2 a 28, 2 a 25, 2 a 22, 2 a 20, 2 a 18, 2 a 17, 2 a 15 o 2 a 12.

Otros intervalos representativos (independientemente del número de residuos, DP o DPn) incluyen uno cualquiera de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 a uno cualquiera de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13 o 12.

Otros intervalos representativos (independientemente del número de residuos, DP o DPn) incluyen uno cualquiera de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 a uno cualquiera de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21,20, 19, 18, 17 o 16.

Otros intervalos representativos (independientemente del número de residuos, DP o DPn) incluyen uno cualquiera de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 a uno cualquiera de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 o 19.

Un oligómero de alginato, como se ha señalado anteriormente, contendrá (o comprenderá) residuos o unidades de guluronato o ácido gulurónico (G) y/o manuronato o ácido manurónico (M). Un oligómero de alginato de acuerdo con la invención estará compuesto preferentemente exclusivamente, o básicamente exclusivamente (es decir, consistirá esencialmente en) restos de uronato/ácido urónico, más particularmente exclusivamente o sustancialmente exclusivamente de residuos G y/o M. Como alternativa a lo expresado, en el oligómero de alginato de uso en la presente invención, al menos el 80 %, más particularmente al menos el 85, 90, 95 o 99 % de los residuos de monómero pueden ser residuos de uronato/ácido urónico, o, más particularmente residuos G y/o M. En otras palabras, preferentemente el oligómero de alginato no comprenderá otros residuos o unidades (por ejemplo, otros residuos de sacárido, o más particularmente otros residuos de ácido urónico/uronato).

El oligómero de alginato es preferentemente un oligómero lineal.

Más en particular, en una realización preferida, al menos el 30 % de los residuos de monómero del oligómero de alginato son residuos G (es decir, guluronato o ácido gulurónico). En otras palabras, el oligómero de alginato contendrá al menos 30% de residuos de guluronato (o ácido gulurónico). Las realizaciones específicas por lo tanto incluyen oligómeros de alginato con (por ejemplo, que contienen) del 30 al 70 % de residuos G (guluronato) o del 70 al 100 % de residuos G (guluronato). Así, un oligómero de alginato representativo para usar de acuerdo con la presente invención puede contener al menos el 70 % de residuos G (es decir, al menos el 70 % de los residuos de monómero del oligómero de alginato serán residuos G).

Preferentemente al menos el 50 % o 60 %, más particularmente al menos el 70 % o el 75 %, incluso más particularmente al menos el 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de los residuos de monómeros son guluronato. En una realización, el oligómero de alginato puede ser un oligoguluronato (es decir, un homooligómero de G, o 100 % G)
En una realización preferida adicional, los alginatos de la invención descritos anteriormente tienen una estructura primaria en la que la mayoría de los residuos G están en los llamados bloques G. Preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 70 o 75 % y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90, 92 o 95 % de los residuos G están en bloques G. Un bloque G es una secuencia contigua de al menos dos residuos G, preferentemente al menos 3 residuos G contiguos, más preferentemente al menos 4 o 5 residuos G contiguos, lo más preferentemente al menos 7 residuos G contiguos.

En particular al menos el 90 % de los residuos G están unidos mediante enlaces 1-4 a otro residuo G. Más particularmente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 % y, lo más preferentemente, al menos el 99 % de los residuos G del alginato están unidos mediante enlaces 1-4 a otro residuo G.

El oligómero de alginato de uso en la invención tiene preferentemente de 3 a 28 residuos, en particular de 4 a 25 residuos, por ejemplo, de 5 a 20 residuos, especialmente de 6 a 22 residuos, en particular de 8 a 20 residuos, especialmente de 10 a 15 residuos, por ejemplo, tienen un peso molecular en el intervalo de 350 a 6000 Daltons, preferentemente de 550 a 5500 Daltons, preferentemente de 750 a 5000 Daltons, y especialmente de 750 a 4500 Daltons o de 2000 a 3000 Daltons o de 900 a 3500 Daltons. Otros oligómeros de alginato representativos incluyen, como se ha mencionado anteriormente, oligómeros con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 a 28, 25, 22 o 20 residuos.

Puede ser un solo compuesto o una mezcla de compuestos, por ejemplo, de un intervalo de grados de polimerización. Como se ha señalado anteriormente, los residuos monoméricos en el oligómero de alginato pueden ser iguales o diferentes y no todos necesitan llevar grupos cargados eléctricamente, aunque se prefiere que la mayoría (por ejemplo, al menos el 60 %, preferentemente al menos el 80 % más preferentemente al menos el 90 %) los lleven. Se prefiere que una mayoría sustancial, por ejemplo, al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 % de los grupos cargados tengan la misma polaridad. En el oligómero de alginato, la relación entre grupos hidroxilo y grupos cargados es preferentemente al menos 2:1, más especialmente al menos 3:1.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización promedio en número (DP_n), de 3-28, 4-25, 6-22, 8-20 o 10-15, o 5-18 o 7-15 u 8-12, especialmente 10.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización promedio en número (DP_n), de 5-30, 5-28, 5-25, 5-22, 5-20, 5-18, 5-16, 5-15 o 5-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización promedio en número (DP_n), de 8-30, 8-28, 8-25, 8-22, 8-20, 8-18, 8-16, 8-15 u 8-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización promedio en número (DP_n), de 9-30, 9-28, 9-25, 9-22, 9-20, 9-18, 9-16, 9-15 u 9-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización promedio en número (DP_n), de 10-30, 10-28, 10-25, 10-22, 10-20, 10-18, 10-16, 10-15 u 10-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización promedio en número (DP_n), de 12-30, 12-28, 12-25, 12-22, 12-20, 12-18, 12-16, 12-15 u 12-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización promedio en número (DP_n), de 15-30, 15-28, 15-25, 15-22, 15-20, 15-18 o 15-16.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización promedio en número (DP_n), de 18-30, 18-28, 18-25, 18-22 o 18-20.

Preferentemente el oligómero de alginato de la invención está sustancialmente exento, preferentemente esencialmente exento, de oligómeros de alginato que tienen un grado de polimerización fuera de los intervalos divulgados en la presente memoria. Esto puede expresarse en términos de la distribución de peso molecular del oligómero de alginato de la invención, por ejemplo, el porcentaje de cada mol del oligómero de alginato que se usa de acuerdo con la invención que tiene un DP fuera del intervalo relevante. La distribución del peso molecular es preferentemente tal que no más del 10 %, preferentemente no más del 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 % en moles tiene un DP de tres, dos o uno superior al límite superior relevante para el DP_n. Del mismo modo, se prefiere que no más del 10 %, preferentemente no más del 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 % en moles tenga un DP inferior al número tres, dos o uno más pequeño que el correspondiente límite inferior del DP_n.

Los oligómeros de alginato adecuados se describen en el documento WO2007/039754, WO2007/039760, WO 2008/125828, y WO2009/068841.

Los oligómeros de alginato adecuados representativos tienen un DP_n en el intervalo de 5 a 30, una fracción de guluronato/galacturonato (F_g) de al menos 0,80, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,20, y al menos el 95 % en moles de DP de no más de 25.

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 7 a 15 (preferentemente de 8 a 12), una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,85 (preferentemente al menos 0,90), una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,15 (preferentemente no más de 0,10), y que tenga al menos 95 % en moles con un grado de polimerización menor de 17 (preferentemente menor de 14).

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 5 a 18 (especialmente de 7 a 15), una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,80 (preferentemente al menos 0,85, especialmente al menos 0,92), una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,20 (preferentemente no más de 0,15, especialmente no más de 0,08), y tienen al menos el 95 % en moles con un grado de polimerización menor de 20 (preferentemente menos de 17).

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 5 a 18, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,92, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,08 y tienen al menos el 95 % en moles con un grado de polimerización inferior a 20.

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 5 a 18 (preferentemente de 7 a 15, más preferentemente de 8 a 12, especialmente aproximadamente 10), una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,80 (preferentemente al menos 0,85, más preferentemente al menos 0,90, especialmente al menos 0,92, lo más especialmente al menos 0,95) una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,20 (preferentemente no más de 0,15, más preferentemente no más de 0,10, especialmente no más de 0,08, lo más especialmente no más de 0,05), y tienen al menos el 95 % en moles con un grado de polimerización menor de 20 (preferentemente menos de 17, más preferentemente menos de 14).

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 7 a 15 (preferentemente de 8 a 12), una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,92 (preferentemente al menos 0,95), una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,08 (preferentemente no más de 0,05), y tienen al menos el 95 % en moles con un grado de polimerización menor de 17 (preferentemente menor de 14).

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 5 a 18, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,80, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,20 y tienen al menos el 95 % en moles con un grado de polimerización inferior a 20.

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 7 a 15, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,85, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,15 y tienen al menos el 95 % en moles con un grado de polimerización inferior a 17.

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 7 a 15, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,92, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,08 y tienen al menos el 95 % en moles con un grado de polimerización inferior a 17.

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización promedio en número en el intervalo de 5 a 20, una fracción de guluronato (F_G) de al menos 0,85 y una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,15.

Por lo tanto, se verá que una clase particular de oligómeros de alginato favorecidos según la presente invención son los oligómeros de alginato definidos como los llamados oligómeros de "alto G" o "bloque G", es decir, que tienen un alto contenido de residuos G o bloques G (por ejemplo, en los que al menos el 70 % de los residuos de monómero son G, preferentemente dispuestos en bloques G). Sin embargo, también se pueden usar otros tipos de oligómero de alginato, incluyendo en particular oligómeros de "alto M" o "bloque M" u oligómeros de bloque MG, como se describe más adelante. Por tanto, son los oligómeros de alginato con altas proporciones de un solo tipo de monómero, y dichos monómeros de este tipo están presentes predominantemente en secuencias contiguas de ese tipo de monómero, que representan oligómeros que son particularmente preferidos, por ej. oligómeros en los que al menos el 70 % de los residuos de monómeros en el oligómero son residuos G unidos por enlaces 1-4 a otro residuo G, o más preferentemente al menos el 75 %, y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de los residuos de monómeros del oligómero son residuos G unidos por enlaces 1-4 a otro residuo G. Este enlace 1-4 de dos residuos G puede expresarse de forma alternativa como una unidad gulurónica unida a una unidad gulurónica adyacente.

En una realización adicional, al menos, o más particularmente más de, el 50 % de los residuos de monómero del oligómero de alginato pueden ser residuos M (es decir, manuronato o ácido manurónico). En otras palabras, el oligómero de alginato contendrá al menos o de forma alternativa más del 50 % de residuos de manuronato o ácido manurónico). Las realizaciones específicas por lo tanto incluyen oligómeros de alginato con (por ejemplo, que contienen) del 50 al 70 % de residuos M (manuronato) o por ejemplo del 70 al 100 % de residuos M (manuronato). Otras realizaciones específicas también incluyen oligómeros que contienen del 71 al 85 % de residuos M o del 85 al 100 % de residuos M. Así, un oligómero de alginato representativo para usar de acuerdo con esta realización de la presente invención contendrá más del 70 % de residuos M (es decir, más del 70 % de los residuos de monómero del oligómero de alginato serán residuos M).

En otras realizaciones, al menos el 50 % o 60 %, más particularmente al menos el 70 % o el 75 %, incluso más particularmente al menos el 80, 85, 90, 95 o 99 % de los residuos de monómeros son manuronato. En una realización, el oligómero de alginato puede ser un oligomanuronato (es decir, un homooligómero de M, o 100 % de M).

En una realización adicional, los alginatos de la invención descritos anteriormente tienen una estructura primaria en la que la mayoría de los residuos M están en los llamados bloques M. En esta realización preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 70 o 75 % y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90 o 95 % de los residuos M están en bloques M. Un bloque M es una secuencia contigua de al menos dos residuos M, preferentemente al menos 3 residuos M contiguos, más preferentemente al menos 4 o 5 residuos M contiguos, lo más preferentemente al menos 7 residuos M contiguos.

En particular, al menos el 90 % de los residuos M están unidos mediante enlaces 1-4 a otro residuo M. Más particularmente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 % y, lo más preferentemente, al menos el 99 % de los residuos M del alginato están unidos mediante enlaces 1-4 a otro residuo M.

Otros oligómeros preferidos son los oligómeros de alginato en los que al menos el 70 % de los residuos de monómeros en el oligómero son residuos M unidos por enlaces 1-4 a otro residuo M, o más preferentemente al menos el 75 %, y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de los residuos de monómeros del oligómero son residuos M unidos por enlaces 1-4 a otro residuo M. Este enlace 1-4 de dos residuos M puede expresarse de forma alternativa como una unidad manurónica unida a una unidad manurónica adyacente.

En una realización adicional más, los oligómeros de alginato de la invención comprenden una secuencia de residuos M y G alternantes. Una secuencia de al menos tres, preferentemente al menos cuatro, residuos M y G alternantes representa un bloque MG. Preferentemente los oligómeros de alginato de la invención comprenden un bloque MG. Expresado más específicamente, un bloque MG es una secuencia de al menos tres residuos contiguos que consisten en residuos G y M y en el que cada residuo G no terminal (interno) en la secuencia contigua está unido por enlaces 1-4 y 4-1 a un residuo M y cada residuo M no terminal (interno) en la secuencia contigua está unido por enlaces 1-4 y 4-1 a un residuo G. Preferentemente, el bloque MG tiene al menos 5 u 6 residuos contiguos, más preferentemente al menos 7 u 8 residuos contiguos.

En otra realización el uronato minoritario en el oligómero de alginato (es decir, manuronato o guluronato) se encuentra predominantemente en bloques MG. En esta realización preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 70 o el 75 % y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90 o el 95 % de los monómeros de uronato minoritario en el oligómero de alginato del bloque MG están presentes en bloques MG. En otra realización, el oligómero de alginato está dispuesto de tal manera que al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 %, por ejemplo, el 100 % de los residuos G y M en el oligómero están dispuestos en bloques MG.

Aunque en su forma más amplia, la invención se extiende a realizaciones en las que al menos el 1 % pero menos del 100 % de los residuos de monómero del oligómero son residuos G (es decir, guluronato o ácido gulurónico), más particularmente, y como se define más adelante, al menos el 30 % de los residuos de monómero son residuos G. Así, en su forma más amplia, el oligómero de alginato que contiene bloque MG puede contener al menos 1 %, pero menos del 100 %, de residuos de guluronato (o ácido gulurónico), pero generalmente el oligómero de alginato que contiene el bloque MG contendrá al menos el 30 % (o al menos 35, 40 o 45 % o 50 % de G) pero menos del 100 % de G. Realizaciones específicas incluyen por lo tanto oligómeros de alginato que contienen bloques MG con (por ejemplo, que contienen) del 1 a 30 % de residuos G (guluronato), del 30 al 70 % de residuos G (guluronato) o del 70 al 99 % de residuos G (guluronato). Así, un oligómero de alginato que contiene un bloque MG para usar de acuerdo con la presente invención puede contener más del 30 %, pero menos del 70 %, de residuos G (es decir, más del 30 %, pero menos del 70 %, de residuos de monómero del oligómero de alginato que contiene bloque MG serán residuos G).

Preferentemente más del 30 %, más particularmente más del 35 % o 40 %, incluso más particularmente más del 45, 50, 55, 60 o 65 %, pero en cada caso menos del 70 %, de los residuos de monómero del oligómero de alginato que contiene bloque MG son guluronato. Como alternativa, menos del 70 %, más preferentemente menos del 65 % o 60 %, incluso más preferentemente menos del 55, 50, 45, 40 o 35 %, pero en cada caso más del 30 % de los residuos de monómero del oligómero de alginato de bloque MG son guluronato. Se puede elegir cualquier intervalo formado por cualquier combinación de estos valores. Por consiguiente, por ejemplo, el oligómero de alginato que contiene el bloque MG puede tener entre, por ejemplo, 35 % y 65 %, 40 % y 60 % o 45 % y 55 % residuos G.

En otra realización el oligómero de alginato que contiene el bloque MG puede tener aproximadamente cantidades iguales de residuos G y M (por ejemplo, relaciones entre 65 % G/35 % M y 35 % G/65 % M, por ejemplo 60 % G/40 % M y 40 % G/60 % M; 55 % G/45 % M y 45 % G/55 % M; 53 % G/47 % M y 47 % G/53 % M; 51 % G/49 % M y 49 % G/51 % M; por ejemplo aproximadamente 50 % G y aproximadamente 50 % M) y estos residuos están dispuestos predominantemente, preferentemente enteramente o lo más completamente posible, en un patrón MG alternante (por ejemplo al menos 50 % o al menos 60, 70, 80, 85, 90 o 95 % o 100 % de los residuos M y G están en una secuencia MG alternante).

El nivel o la cantidad de anticoagulación lograda puede variar según las circunstancias precisas, por ejemplo, la manera y el contexto en el cual los oligómeros de alginato se usan, las condiciones en las cuales se usan y la composición del oligómero de alginato. Tal como se muestra en los ejemplos, los oligómeros de alginato de diferentes tamaños, contenido de G y M y disposición de monómeros muestran niveles variables de efecto anticoagulante. Por

lo tanto, la invención proporciona al experto en la materia los medios para seleccionar, de acuerdo con la invención, un oligómero de alginato de una estructura que tenga propiedades anticoagulantes (por ejemplo, potencia y duración del efecto) que satisfagan de la mejor manera o mejor, sus necesidades en el contexto en el cual trabaja, por ejemplo, las características del paciente o la muestra de sangre de interés. Así, la disponibilidad de diferentes oligómeros de alginato que pueden tener diferentes efectos anticoagulantes en un sistema de interés dado abre la posibilidad de adaptar las propiedades del anticoagulante de oligómero de alginato al sistema en cuestión. Se pueden usar combinaciones de oligómeros de alginato de diferentes tamaños, contenido de G y M y disposición de monómero junto con la creación de un efecto de anticoagulación adaptado con precisión. En otras realizaciones un oligómero de alginato de la invención puede tener distintas regiones de contenido de monómero y estructura que conjuntamente contribuyen a un efecto de anticoagulación general adaptado. Por supuesto, la estructura del oligómero, o partes del mismo, se puede seleccionar adicionalmente para facilitar la formulación y/o la inmovilización sobre o dentro de materiales y superficies.

En ciertas realizaciones los residuos de ácido urónico terminales de los oligómeros de la invención no tienen un doble enlace, especialmente un doble enlace situado entre el átomo C_4 y C_5. Dichos oligómeros pueden describirse como que tienen residuos de ácido urónico terminales saturados. Así, en otras realizaciones, los oligómeros de alginato de la invención tienen residuos de ácido urónico terminales insaturados. El experto en la materia podría preparar oligómeros con residuos de ácido urónico terminales saturados sin una carga excesiva. Esto puede ser mediante el uso de técnicas de producción que producen tales oligómeros, o mediante la conversión (saturación) de oligómeros producidos por procesos que producen oligómeros con residuos de ácido urónico terminales insaturados.

El oligómero de alginato generalmente llevará una carga y, por lo tanto, los iones contrarios para el oligómero de alginato pueden ser cualquier ion fisiológicamente tolerable, especialmente aquellos comúnmente utilizados para sustancias farmacológicas cargadas, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, cloruro, mesilato, meglumina, etc. También se pueden usar iones que promueven la gelificación de alginato, por ejemplo, los iones metálicos del grupo 2.

Si bien el oligómero de alginato puede ser un material sintético generado a partir de la polimerización de cantidades apropiadas de residuos de guluronato y manuronato, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden obtenerse, producirse o derivarse convenientemente de fuentes naturales tales como las mencionadas anteriormente, concretamente materiales fuente de alginato natural.

La escisión de polisacárido a oligosacárido para producir el oligómero de alginato utilizable de acuerdo con la presente invención puede realizarse usando técnicas convencionales de lisis de polisacárido tales como digestión enzimática e hidrólisis ácida. En una realización preferida, la hidrólisis ácida se usa para preparar los oligómeros de alginato de la invención. En otras realizaciones, la digestión enzimática se usa con una etapa o etapas de procesamiento adicionales para saturar los ácidos urónicos terminales en los oligómeros.

Los oligómeros pueden separarse después de los productos de descomposición de polisacáridos cromatográficamente usando una resina de intercambio iónico o mediante precipitación fraccionada o solubilización o filtración. Los documentos US 6.121.441 y WO 2008/125828 describen un proceso adecuado para preparar los oligómeros de alginato de uso en la invención. Más información adicional y una descripción puede encontrarse en por ejemplo "Handbooks of Hydrocolloids", Ed. Phillips and Williams, CRC, Boca Ratón, Florida, USA, 2000.

Los oligómeros de alginato también se pueden modificar químicamente, incluyendo, aunque no de forma limitativa, la modificación para añadir grupos cargados (tales como glicanos carboxilados o carboximetilados) y oligómeros de alginato modificados para alternar la flexibilidad (por ejemplo, por oxidación de peryodato).

Los oligómeros de alginato (por ejemplo, los ácidos oligogulurónicos) adecuados para su uso de acuerdo con la invención se pueden producir convenientemente por hidrólisis ácida de la forma de ácido algínico, aunque no de forma limitativa, *Laminaria hyperbora* y *Lessonia nigrescens,* disolución a pH neutro, la adición de ácido mineral para reducir el pH hasta 3,4 para precipitar el oligómero de alginato (ácido oligogulurónico), lavado con ácido débil, resuspensión a pH neutro y liofilización.

Los alginatos para la producción de oligómeros de alginato de la invención también se pueden obtener directamente de fuentes bacterianas adecuadas, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* o *Azotobacter vinelandii.*

En las realizaciones en las que los oligómeros de alginato que tienen estructuras primarias en las que la mayoría de los residuos G están dispuestos en bloques G en lugar de como residuos únicos, se espera que las fuentes de algas sean más adecuadas debido al hecho de que los alginatos producidos en estos organismos tienden a tener estas estructuras. Las fuentes bacterianas pueden ser más adecuadas para obtener oligómeros de alginato de diferentes estructuras.

El aparato molecular implicado en la biosíntesis de alginatos en *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter vinelandii* se ha clonado y caracterizado (WO 94/09124; Ertesvag, H., et al, Metabolic Engineering, 1999, Vol 1.262-269; WO 2004/011628; Gimmestad, M., *et al (supra);* Remminghorst and Rehm, Biotechnology Letters, 2006, Vol 28, 1701-1712; Gimmestad, M. et al, Journal of Bacteriology, 2006, Vol 188(15), 5551-5560) y los alginatos de estructuras

primarias diseñados se pueden obtener fácilmente mediante la manipulación de estos sistemas.

El contenido de G de los alginatos (por ejemplo, un material fuente de algas) puede aumentarse mediante epimerización, por ejemplo, con manuronan C-5 epimerasas de A. *vinelandii* u otras enzimas epimerasa. Así, por ejemplo, la epimerización *in vitro* puede llevarse a cabo con epimerasas aisladas de *Pseudomonas* o *Azotobacter,* por ejemplo, AlgG de *Pseudomonas fluorescens* o *Azotobacter vinelandii* o las enzimas AlgE (AlgE1 a AlgE7) de *Azotobacter vinelandii.* El uso de las epimerasas de otros organismos que tienen la capacidad de producir alginato, particularmente algas, también se contempla específicamente. La epimerización *in vitro* de los alginatos de bajo G con AlgE epimerasas de *Azotobacter vinelandii* se describe en detalle en Ertesvag *et al (supra)* y Strugala et al (Gums and Stabilisers for the Food Industry, 2004, 12, The Royal Society of Chemistry, 84 - 94).

Para obtener alginatos u oligómeros de alginatos que contienen bloque G, se prefiere la epimerización con una o más AlgE epimerasas de *Azotobacter vinelandii* diferentes a AlgE4 ya que estas enzimas son capaces de producir estructuras de bloque G. Por otro lado, la epimerasa AlgE4 se puede usar para crear alginatos u oligómeros de alginato con tramos alternos de secuencia M/G o estructuras primarias que contienen un solo residuo G, ya que se ha descubierto que esta enzima parece preferir epimerizar residuos M individuales para producir residuos G únicos unidos a residuos M en lugar de producir bloques G. Se pueden obtener estructuras primarias particulares usando diferentes combinaciones de estas enzimas.

Las versiones mutadas de estas enzimas u homólogos de otros organismos también se contemplan específicamente para su uso. El documento WO 94/09124 describe enzimas manuronano C-5 epimerasa recombinantes o modificadas (enzimas AlgE), por ejemplo, codificadas por secuencias epimerasa en las que las secuencias de ADN que codifican los diferentes dominios o módulos de las epimerasas se han entremezclado o eliminado y recombinado. Como alternativa, pueden usarse mutantes de enzimas epimerasa de origen natural, (AlgG o AlgE), obtenidas por ejemplo por mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis aleatoria de los genes AlgG o AlgE.

Un enfoque diferente es crear *Pseudomonas* y organismos Azotobacter que están mutados en algunos o todos sus genes de epimerasa de tal manera que esos mutantes producen alginatos de la estructura requerida para la producción posterior de oligómeros de alginato, o incluso oligómeros de alginato de la estructura y tamaño (o peso molecular) requeridos. La generación de varios organismos de *Pseudomonas fluorescens* con genes AlgG mutados se describe en detalle en el documento WO 2004/011628 y Gimmestad, M., *et al,* 2003 *(supra).* La generación de varios organismos de *Azotobacter vinelandii* con genes AlgG mutados se divulga en Gimmestad, M., *et al,* 2006 *(supra).* El experto podría utilizar esta enseñanza para producir nuevos mutantes que podrían usarse para dar lugar a los oligómeros de alginato de la invención sin una carga excesiva.

Otro enfoque es eliminar o inactivar los genes de epimerasa endógenos de un organismo *Azotobacter* o *Pseudomonas* y después introducir uno o más genes de epimerasa exógenos, que pueden o no estar mutados (es decir, pueden ser de tipo silvestre o modificados) y cuya expresión puede controlarse, por ejemplo, mediante el uso de promotores inducibles u otros "promotores controlables". Al seleccionar combinaciones apropiadas de genes, se pueden producir alginatos de estructura primaria predeterminada.

Otro enfoque adicional sería introducir parte o toda la maquinaria de la biosíntesis de alginato de *Pseudomonas* y/o *Azotobacter* en un organismo no productor de alginato (por ejemplo, *E. coli)* e inducir la producción de alginato por estos organismos modificados genéticamente.

Cuando se usan estos sistemas basados en cultivos, la estructura primaria del producto alginato u oligómero de alginato puede estar influida por las condiciones de cultivo. Está dentro de las capacidades del experto en la materia ajustar los parámetros de cultivo tales como temperatura, osmolaridad, niveles/fuentes de nutrientes y parámetros atmosféricos para manipular la estructura primaria de los alginatos producidos por un organismo particular.

Las referencias a "residuos G/G" y "residuos M/M" o al ácido gulurónico o al ácido manurónico, o al guluronato o al manuronato deben leerse indistintamente como referencias al ácido gulurónico/guluronato y al ácido manurónico/manuronato (específicamente ácido α-L-gulurónico/guluronato y ácido β-D-manurónico/manuronato), y además incluyen derivados de los mismos en los que una o más cadenas laterales o grupos disponibles se han modificado sin dar como resultado una capacidad para inhibir o prevenir la coagulación sanguínea que es sustancialmente menor que la del oligómero no modificado. Los grupos modificadores de sacárido comunes incluirían grupos acetilo, sulfato, amino, desoxi, alcohol, aldehído, cetona, éster y anhidro. Cualquiera de estos grupos, excepto el sulfato, puede usarse para modificar los oligómeros de alginato de acuerdo con la presente invención; una característica de los oligómeros de alginato según la presente invención es que no llevan un grupo sulfato. Los oligómeros de alginato también pueden modificarse químicamente para agregar grupos cargados (tales como glicanos carboxilados o carboximetilados) y para alterar la flexibilidad (por ejemplo, por oxidación de peryodato). El experto en la materia conocerá aún más modificaciones químicas que se pueden hacer en las subunidades monosacáridas de los oligosacáridos y que se pueden aplicar a los oligómeros de alginato de la invención.

La invención abarca el uso de un solo oligómero de alginato o una mezcla (multiplicidad/pluralidad) de diferentes oligómeros de alginato. Así, por ejemplo, se puede usar una combinación de diferentes oligómeros de alginato (por

ejemplo, dos o más). En este sentido, como se ha mencionado anteriormente, se puede seleccionar una combinación de oligómeros de alginato que juntos dan un perfil ventajoso de propiedades anticoagulantes. Esto puede ser una combinación de diferentes tamaños de oligómero, diferentes contenidos de G y M y/o diferentes disposiciones de monómero.

Por "coagulación sanguínea" se entiende el proceso natural por el cual se forma una matriz insoluble de filamentos de fibrina a partir de sangre fluida. Esto incluye tanto la ruta del factor tisular como la ruta por contacto descrita anteriormente. De acuerdo con la invención, "coagulación sanguínea" se extiende al proceso que puede observarse en el plasma (es decir, un producto obtenido de la eliminación de células sanguíneas de la sangre completa y que retiene todos los factores de coagulación). De manera similar, la expresión se extiende al proceso que se observa en mezclas artificiales que comprenden factores de coagulación sanguínea que son lo suficientemente completos como para poder formar coágulos de fibrina en condiciones propicias.

"Plasma sanguíneo" se refiere al componente líquido de la sangre completa. Esta solución contiene numerosas proteínas y otras macromoléculas, electrolitos y azúcares. En particular contiene todos los factores de coagulación sanguínea implicados en la coagulación sanguínea.

De acuerdo con la invención, la expresión "composición que comprende plasma sanguíneo" incluye no solo sangre completa o sangre de la que se han eliminado uno o más tipos de células sanguíneas, por ejemplo, eritrocitos o leucocitos, sino también composiciones de una constitución química sustancialmente equivalente al plasma y composiciones que comprenden factores de coagulación sanguínea que son lo suficientemente completos como para formar coágulos de fibrina en condiciones propicias (por ejemplo, composiciones que comprenden los factores XII, XI, X, IX, VIII, V, protrombina y fibrinógeno y opcionalmente Factor XIII, o composiciones que comprenden los Factores VII, III, X, V, protrombina y fibrinógeno y opcionalmente Factor XIII). Se pueden incorporar derivados y homólogos funcionalmente equivalentes. En ciertas realizaciones, estas composiciones pueden no derivarse, o pueden derivarse solo parcialmente, de sangre completa. La composición que comprende plasma sanguíneo puede ser plasma en el que se han retenido algunas o todas las plaquetas.

La expresión "producto derivado de la sangre" debe interpretarse por lo tanto de manera análoga para referirse a cualquier producto que sea o pueda derivarse de la sangre, e incluye en particular fracciones de sangre o productos sanguíneos, y en particular las fracciones o productos que retienen la habilidad o capacidad para formar coágulos (es decir, para coagular). Por lo tanto, un producto derivado de la sangre puede incluir cualquier producto que contenga factores de coagulación suficientes para formar un coágulo, incluido el plasma sanguíneo o cualquier producto o fracción equivalente.

Preferentemente la composición es una composición líquida. Preferentemente la composición es una composición estéril. Preferentemente el plasma sanguíneo es plasma sanguíneo humano o los factores de coagulación presentes en la composición que comprende plasma sanguíneo son humanos, sin embargo, pueden estar presentes homólogos no humanos funcionalmente equivalentes. Preferentemente, la composición que comprende plasma sanguíneo es sangre completa o una composición que comprende sangre completa. En ciertas realizaciones, la sangre completa puede o no contener proteínas heterólogas al organismo hospedador. Preferentemente, la sangre completa se ha recogido recientemente, por ejemplo, menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 minuto antes del contacto con el oligómero de alginato. En otras realizaciones, la composición no está completamente coagulada, por ejemplo, está parcialmente coagulada o preferentemente sustancialmente no coagulada.

La "prevención o inhibición de la coagulación sanguínea" se usa ampliamente en el presente documento para abarcar tanto la prevención absoluta de la coagulación sanguínea como cualquier efecto negativo sobre el inicio de la coagulación sanguínea o sobre un coágulo preexistente o el número de coágulos en la composición que comprende plasma sanguíneo (por ejemplo, la sangre circulante o el sistema circulatorio de un sujeto). Por ejemplo, esto puede ser un retraso en el inicio del proceso de coagulación o una desaceleración en una o más etapas del proceso o del proceso en su conjunto. Esto también se puede ver en una reducción en el tamaño y/o densidad de un coágulo, o una reducción en la velocidad a la que un coágulo preexistente o en crecimiento aumenta en tamaño y/o densidad. Se puede ver además en una reducción en la integridad física, o cualquier tipo de deterioro estructural, de un coágulo preexistente o en crecimiento, aunque en ciertas realizaciones la expresión no abarca la trombólisis o un efecto trombolítico, sobre un coágulo establecido o preexistente. Se puede ver además en una reducción en el número de coágulos en la composición que comprende plasma sanguíneo (por ejemplo, la sangre circulante o el sistema circulatorio de un sujeto), o una reducción en la velocidad a la que crece el número de coágulos. También se puede ver como una reducción en la capacidad de un coágulo de ser perjudicial para la salud o el bienestar de un sujeto. La "anticoagulación" como se usa en la presente memoria debe interpretarse de manera coherente con lo anterior. Se verá que, por lo tanto, estos sorprendentes efectos de los oligómeros de alginato como se definen en la presente memoria pueden usarse para regular o controlar la coagulación sanguínea.

Cualquier retraso en la coagulación (por ejemplo, una reducción en la velocidad de coagulación) y/o reducción del grado de coagulación se puede tomar como una indicación de actividad o efecto anticoagulante de acuerdo con la invención. Así, por ejemplo, un efecto anticoagulante puede manifestarse como una reducción de al menos el 10, 15, 20, 25 o 30 % en la coagulación, en comparación con la coagulación observada en ausencia del oligómero de alginato.

El grado de coagulación de la sangre de una composición que contiene plasma sanguíneo puede determinarse fácilmente en ensayos *in vitro* simples, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos más adelante. Por lo tanto, el tiempo necesario para que se produzca la coagulación de una muestra de sangre puede usarse como una medida del efecto anticoagulante y un mayor tiempo de coagulación en presencia de oligómero de alginato en comparación con un control (por ejemplo, el tiempo de coagulación en ausencia del oligómero de alginato, por ejemplo, un control no tratado o una sustancia de control positivo) puede ser indicativo de un efecto anticoagulante.

Como alternativa, se puede hacer una determinación del efecto anticoagulante por otros medios, por ejemplo, comparando el alcance y/o velocidad de formación de coágulos en presencia y ausencia de oligómero de alginato, por ejemplo el tamaño y/o número de coágulos formados, o el tamaño y/o número de coágulos formados por unidad de tiempo. A modo de ejemplo, esto puede ser en un sistema de ensayo, por ejemplo, determinar el grado o la velocidad de formación de coágulos en una superficie artificial en contacto con sangre o con una composición que comprende plasma sanguíneo en presencia o ausencia de oligómero de alginato. Una disminución en el grado y/o velocidad de formación de coágulos en presencia de oligómero de alginato en comparación con la ausencia de oligómero de alginato puede considerarse como indicativo de un efecto anticoagulante.

Las propiedades físicas de un coágulo de sangre pueden medirse por cualquier medio conveniente, por ejemplo, ecografía, angiografía, TC, o medición visual simple. En otras realizaciones, la coagulación, y por lo tanto su inhibición o prevención, puede medirse mediante una prueba de coagulación de rutina (o prueba de coagulación sanguínea) convenientemente usando un coagulómetro de sangre, por ejemplo, tromboelastografía, la prueba de generación de trombina, la prueba de trombodinamia, la prueba de tiempo parcial de tromboplastina (PTT) (o tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT o APTT)) o prueba de tiempo de protrombina. En realizaciones preferidas, los métodos de la invención darán como resultado una reducción clínicamente relevante en la capacidad de coagulación sanguínea de un sujeto o la velocidad a la que se coagula la sangre de un sujeto. En realizaciones alternativas, el procedimiento descrito en los Ejemplos puede usarse para medir el tiempo de coagulación y en cuyo caso los métodos de la invención darán como resultado un aumento clínicamente relevante en el tiempo de coagulación de la sangre de un sujeto.

"Tratamiento" cuando se usa en relación con el tratamiento de una enfermedad o afección médica asociada con la coagulación sanguínea de acuerdo con la invención se usa ampliamente en la presente memoria para incluir cualquier efecto terapéutico, es decir, cualquier efecto beneficioso en la enfermedad o afección. Así, no solo se incluye la erradicación o eliminación de la enfermedad o afección, o la cura del sujeto de la enfermedad o afección, sino también una mejora en la enfermedad o afección o el bienestar general del sujeto. Así se incluye, por ejemplo, una mejora en cualquier síntoma o signo de la enfermedad o afección, o en cualquier indicador clínicamente aceptado de la enfermedad o afección (por ejemplo, una disminución en el número de coágulos sanguíneos circulantes o un aumento de la oxigenación aguas abajo de una trombosis). En los tratamientos actualmente reivindicados, puede ser que los coágulos de sangre preexistentes no se erradiquen por completo o que la formación de nuevos coágulos no se detenga por completo, pero los tratamientos son suficientes para inhibir estos procesos hasta el punto de que la enfermedad o afección objetivo esté completamente resuelta, o al menos resuelta hasta cierto punto, preferentemente en un grado aceptable para el sujeto. Por lo tanto, el tratamiento incluye terapia curativa y paliativa, por ejemplo, de una enfermedad o afección preexistente o diagnosticada, es decir, un tratamiento de reacción.

"Prevención" cuando se usa en relación con el tratamiento de una enfermedad o afección médica asociada con la coagulación sanguínea de acuerdo con la invención se usa ampliamente en la presente memoria para incluir cualquier efecto profiláctico o preventivo. Este incluye por lo tanto el retraso, limitación, reducción o prevención de la enfermedad o afección o la aparición de la enfermedad o afección, o uno o más síntomas o indicaciones de la misma, por ejemplo, respecto a la afección o síntoma o indicación previa al tratamiento profiláctico. La profilaxis, por lo tanto, incluye explícitamente tanto la prevención absoluta de la aparición o desarrollo de la enfermedad o afección, o síntoma o indicación de la misma, como cualquier retraso en el inicio o desarrollo de la afección o síntoma o indicación, o la reducción o limitación del desarrollo o progresión de la afección o síntoma o indicación.

De acuerdo con la invención, la "terapia de anticoagulación" y la "terapia antitrombótica (o antitrombosis)" incluyen tanto el tratamiento preventivo como el tratamiento terapéutico de una afección existente o en curso y, por lo tanto, estos términos deben interpretarse de acuerdo con lo anterior.

Visto más particularmente, en los métodos de la invención, la composición que comprende plasma se pondrá en contacto con una cantidad eficaz del oligómero de alginato, más particularmente una cantidad del oligómero de alginato que proporciona una inhibición o prevención medible de la coagulación sanguínea. Una cantidad farmacéuticamente efectiva del oligómero de alginato es esa cantidad de oligómero de alginato que proporciona un tratamiento o prevención medible de una enfermedad o afección asociada con la coagulación sanguínea. El experto en la materia sería fácilmente capaz de determinar qué cantidad efectiva/farmacéuticamente efectiva de oligómero de alginato sería basándose en protocolos de respuesta a la dosis de rutina y, de forma conveniente, las técnicas de rutina para evaluar la coagulación sanguínea descritas anteriormente. El experto en la materia, sin una carga excesiva, también podría optimizar estas cantidades y garantizar el uso seguro de los oligómeros de alginato de la invención.

En un contexto terapéutico, las dosis adecuadas de oligómero de alginato variarán de un sujeto a otro y pueden ser determinadas por el médico o el veterinario de acuerdo con el peso, la edad y el sexo del sujeto, la gravedad de la dolencia, el modo de administración y también el oligómero de alginato particular seleccionado, por ejemplo, basado en su tamaño, contenido de G y M y/o disposición de monómero. Generalmente, los oligómeros de alginato de la invención se aplicarán a la ubicación sometida a tratamiento a una concentración local de al menos el 0,05 %, preferentemente al menos 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o al menos 5 %, más preferentemente al menos 6 % y lo más preferentemente al menos 10 % en peso en volumen.

Las enfermedades y afecciones asociadas con la coagulación sanguínea, más específicamente la coagulación sanguínea no deseada o inapropiada, incluyen aunque no de forma limitativa trombosis venosa (por ejemplo, trombosis venosa profunda, venosa portal, venosa renal, venosa yugular y del seno venoso cerebral), trombosis arterial (por ejemplo, trombosis de las arterias coronaria, carótida y hepática), ateroesclerosis, oclusión del injerto venoso, oclusión del injerto arterial, ictus, infarto cardíaco, embolia pulmonar y trombofilia (también conocida como hipercoagulabilidad o estado protrombótico). Los oligómeros de alginato de la invención pueden usarse para tratar o prevenir cualquiera y todas estas enfermedades y afecciones. El tratamiento puede implicar la administración sistémica o local de los oligómeros de alginato.

Otro problema clínico importante asociado con la coagulación sanguínea se refiere a la inducción de trombosis por dispositivos médicos, quirúrgicos o protésicos internos e implantables. La exposición de sangre y/o líquido intersticial a las superficies artificiales, es decir, abióticas (por ejemplo, plástico, caucho, silicona, metal o vidrio), de dichos productos promueven la formación de trombosis. También se ha descrito que los trasplantes de tejidos pueden dar lugar a estas trombosis y pueden causar problemas en el sitio del tejido trasplantado o en partes remotas del sistema circulatorio en caso de que esas trombosis se embolicen.

Por lo tanto, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden usarse para inhibir o prevenir la formación de trombosis en tales dispositivos o tejidos de trasplante. Esto puede incluir cualquier tipo de tubo, incluidos catéteres (por ejemplo, catéteres venosos centrales y venosos periféricos), válvulas cardíacas, stents vasculares, articulaciones artificiales, dispositivos intrauterinos, marcapasos, tubos de traqueostomía, cables de radioterapia e implantes de tejidos blandos. Dichos dispositivos incluyen dispositivos los cuales, cuando se usan pueden ser parcialmente internos. El tejido de trasplante puede incluir tejido cardíaco (por ejemplo, válvula cardíaca), pulmón, riñón, hígado, páncreas, intestino y tejido corneal, injertos arteriales y venosos y piel.

Dichos tratamientos pueden comprender la administración local o sistémica de oligómeros de alginato a un sujeto, en el cual se implantará un dispositivo implantable o un trasplante de tejido. En otras realizaciones, el dispositivo implantable/interno o el trasplante de tejido pueden implantarse después de proporcionar (recibir un tratamiento con), por ejemplo, un recubrimiento de, un oligómero de alginato de uso en la invención sobre superficies que pueden entrar en contacto con la sangre. Dichos tratamientos pueden aplicarse a las superficies implantables justo antes de la implantación, o sustancialmente de forma contemporánea con, implantación, por ejemplo, rociando las superficies relevantes del dispositivo implantable o el trasplante de tejido con una formulación líquida que comprende el oligómero de alginato. En otras realizaciones, la(s) superficie(s) implantable(s) de los dispositivos pueden contener o llevar, por ejemplo, pueden incorporar, o pueden estar impregnados o recubiertos con, un oligómero de alginato de uso de acuerdo con la invención. En estas realizaciones, los oligómeros de alginato pueden recubrirse sobre las superficies implantables/internas o proporcionarse como parte de un recubrimiento superficial. Esto puede ocurrir antes, durante o después de la formación de la superficie implantable y la inmovilización puede realizarse a través de interacciones covalentes o no covalentes, por ejemplo, interacciones iónicas o electrostáticas. Como ejemplo representativo, los oligómeros de alginato de composición monomérica adecuada pueden proporcionarse en una superficie como un gel inducido por cationes, o como parte del mismo. En otras realizaciones adicionales, el oligómero de alginato se puede proporcionar o incluir en un recubrimiento hemocompatible que comprende uno o más compuestos hemocompatibles adicionales, por ejemplo, heparina, heparán sulfato, hialuronano, polietilenglicol o dextrano, o de hecho cualquier otro agente bioactivo que tenga actividad anticoagulante, o un compuesto o agente que tenga una propiedad hemocompatible pasiva, p. ej. un polímero o plástico hemocompatible.

Otro problema clínico importante asociado con la coagulación sanguínea se refiere a la inducción de trombosis durante los procedimientos quirúrgicos. Las incisiones en los tejidos de un sujeto pueden convertirse en sitios para trombosis que a su vez pueden embolizar y viajar a otra parte del sistema circulatorio en el que se alojan y dan lugar a las enfermedades y afecciones discutidas anteriormente.

Por lo tanto, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden usarse antes, durante y/o después de procedimientos quirúrgicos para inhibir o prevenir la formación de trombosis en sitios de incisión quirúrgica. Dichos tratamientos pueden comprender la administración sistémica o, más convenientemente, la administración local de los oligómeros de alginato a un sujeto sometido, a punto de someterse o recuperarse de un procedimiento quirúrgico.

Específicamente, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden considerarse como un tratamiento profiláctico, por ejemplo, para prevenir o al menos minimizar el riesgo, de enfermedad trombótica (por ejemplo, los descritos anteriormente). Generalmente, los sujetos que necesitan tratamiento o profilaxis de acuerdo con la invención serán diagnosticados con o en riesgo de una enfermedad o afección asociada con la coagulación sanguínea, por

ejemplo, las descritas anteriormente. Dichos sujetos incluyen, pero no se limitan a, sujetos que estarán o estarán inmóviles durante períodos prolongados, sujetos con fibrilación arterial, sujetos con placas ateroscleróticas, sujetos con o que reciben dispositivos médicos, quirúrgicos o protésicos implantables, sujetos sometidos, a punto de someterse o en recuperación de un procedimiento quirúrgico, sujetos con trombofilia congénita (por ejemplo, factor V Leiden, protrombina G20210A, deficiencia de antitrombina III, deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, mutación del factor XIII, disfibrinogenemia familiar) y sujetos con trombofilia adquirida (por ejemplo, aquellos con síndrome antifosfolípido, trombocitopenia inducida por heparina (HIT), hemoglobinuria nocturna (HPN), afecciones hematológicas asociadas con lentitud circulatoria (por ejemplo, enfermedad de células falciformes, policitemia vera y trombocitosis esencial (exceso de plaquetas)), cáncer (particularmente tumores metastásicos), síndrome nefrótico, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn)), obesidad y mujeres embarazadas.

El sujeto puede ser cualquier vertebrado humano o no humano, pero más particularmente puede ser un vertebrado, por ejemplo, un vertebrado seleccionado de mamíferos, aves, anfibios, peces y reptiles. El vertebrado no humano puede ser ganado o un animal doméstico o un animal de valor comercial, incluidos animales de laboratorio o un animal en un zoológico o parque recreativo. Animales representativos incluyen por lo tanto perros, gatos, conejos, ratones, cobayas, hámsteres, caballos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, pollos, pavos, pintadas, patos, gansos, loros, periquitos, palomas, salmón, trucha, bacalao, abadejo, lubina y carpa. Los usos veterinarios de la invención están así cubiertos. El sujeto puede considerarse como un paciente. Preferentemente el sujeto es un ser humano.

En ciertas realizaciones el sujeto no tiene una infección, por ejemplo, bacteriana, fúngica, protozoaria, por algas o parasitaria, que muestra indicadores patológicos. Más particularmente en ciertas realizaciones de este tipo, el sujeto no tiene una infección por biopelícula. En otras realizaciones, el sujeto no tiene moco hiperviscoso ni necesita una reducción en la viscosidad del moco.

En una realización de la invención, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden usarse en los métodos o usos de la invención junto con o en combinación con un anticoagulante sanguíneo adicional (en lo sucesivo"anticoagulante adicional")

En el contexto de un uso terapéutico, dicho anticoagulante puede ser cualquier anticoagulante clínicamente útil, por ejemplo antagonistas de la vitamina K (p. ej. warfarina, acenocoumarol, fenprocoumon, atromentina y fenindiona), heparina, heparina de bajo peso molecular, inhibidores sintéticos de pentasacáridos del factor Xa (p. ej. fondaparinux e idraparinux, inhibidores directos del factor Xa (p. ej. rivaroxabán y apixabán), inhibidores directos de la trombina (p. ej. hirudina, lepirudina, bivalirudina, argatrobán, dabigatrán, ximelagatrán, proteína antitrombina, batroxobina y hementina).

En otra realización de la invención, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden usarse en los métodos o usos de la invención junto con o en combinación con un agente trombolítico. Los agentes trombolíticos digieren o descomponen los coágulos sanguíneos preexistentes e incluyen el activador del plasminógeno tisular (t-PA), alteplasa, reteplasa, tenecteplasa, anistreplasa, estreptocinasa y urocinasa.

En otra realización más de la invención, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden usarse en los métodos o usos de la invención junto con o en combinación con un agente antiplaquetario. Los agentes antiplaquetarios inhiben la agregación plaquetaria e incluyen los inhibidores irreversibles de la ciclooxigenasa (p. ej. aspirina), inhibidores del receptor de adenosina difosfato (ADP) (p. ej. clopidogrel), prasugrel, ticagrelor, ticlopidina, inhibidores de la fosfodiesterasa (p. ej. cilostazol), inhibidores de la glucoproteína IIB/MIA (p. ej. abciximab), eptifibatida, tirofibán) inhibidores de la recaptación de adenosina (p. ej. dipiridamol), inhibidores del tromboxano (p. ej. terutrobán)

Los oligómeros de alginato propuestos para uso de acuerdo con la invención y el otro anticoagulante, agente trombolítico o agente antiplaquetario, pueden administrarse por ejemplo conjuntamente, en una única formulación o composición farmacéutica, o por separado (es decir, administración separada, secuencial o simultánea). Así, los oligómeros de alginato de uso en la invención y el otro anticoagulante, agente trombolítico o agente antiplaquetario pueden combinarse, por ejemplo, en un kit farmacéutico o como un producto combinado ("combinación).

Así, también se describen productos (por ejemplo, un kit farmacéutico o un producto combinado ("combinación") o composiciones (por ejemplo, una composición farmacéutica) en las que el producto o composición comprende un oligómero de alginato como se define en la presente memoria y otro anticoagulante, agente trombolítico y/o agente antiplaquetario. Dichos productos farmacéuticos y composiciones farmacéuticas pueden adaptarse para usar en los métodos médicos de la invención.

Los oligómeros de alginato como se definen en la presente memoria pueden usarse para fabricar tales productos farmacéuticos y composiciones farmacéuticas.

Los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden administrarse al sujeto en cualquier forma adecuada o mediante medios prácticos, por ejemplo, por vía tópica, oral, parenteral, enteral, o por inhalación. Preferentemente, el alginato se administrará por vía tópica, oral o parenteral o por inhalación. Que tales oligómeros de alginato se puedan

administrar a través de muchas vías diferentes es una ventaja sobre los anticoagulantes disponibles actualmente.

El experto en la materia podrá formular los oligómeros de alginato de uso en la invención en composiciones farmacéuticas que están adaptadas para estas vías de administración de acuerdo con cualquiera de los métodos convencionales conocidos en la técnica y ampliamente descritos en la literatura.

Así, también se describe una composición farmacéutica para usar en cualquiera de los métodos o usos mencionados anteriormente que comprende un oligómero de alginato como se define en la presente memoria junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Esta composición también puede comprender otros agentes terapéuticos como se describe anteriormente.

Más específicamente, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden incorporarse, opcionalmente junto otros agentes activos, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales, para producir preparaciones galénicas convencionales, tales como comprimidos, píldoras, polvos (p. ej. polvos inhalables), pastillas para chupar, sobrecitos, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un sólido o en un medio líquido), pulverizaciones (p. ej., pulverización nasal), composiciones para su uso en nebulizadores, pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, pesarios, soluciones inyectables estériles acuosas, polvos empaquetados estériles, y similares. Las composiciones inhalables estériles e inyectables estériles son de particular interés.

Ejemplos de vehículos adecuados, excipientes y diluyentes son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, polímeros de alginato inertes, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, agua, agua/etanol, agua/glicol, agua/polietileno, agua salina hipertónica, glicol, propilenglicol, metilcelulosa, metilhidroxibenzoatos, propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, sustancias de aceite mineral o grasas tales como grasa dura o mezclas adecuadas de la misma. Excipientes y diluyentes de interés son manitol y agua salina hipertónica, (solución salina).

Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes y similares. Se pueden incluir agentes terapéuticamente activos adicionales en las composiciones farmacéuticas, como se discutió anteriormente en relación con las terapias de combinación anteriores.

Las formas administrables por vía parenteral, por ejemplo, soluciones intravenosas, deben ser estériles y estar exentas de agentes fisiológicamente inaceptables, y deben tener baja osmolaridad para minimizar la irritación u otros efectos adversos tras la administración y, por lo tanto, las soluciones deben ser preferentemente isotónicas o ligeramente hipertónicas, por ejemplo, agua salada hipertónica (solución salina). Los vehículos adecuados incluyen vehículos acuosos utilizados habitualmente para administrar soluciones parenterales tales como agua estéril para inyección, inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer lactato y otras soluciones como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª ed., Easton: Mack Publishing Co., pp. 1405-1412 and 1461-1487 (1975) y en The National Formulary XIV, 14ª ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975). Las soluciones pueden contener conservantes, agentes antimicrobianos, tampones y antioxidantes convencionalmente usados para las soluciones parenterales, excipientes y otros aditivos que son compatibles con los biopolímeros y que no interferirán con la fabricación, almacenamiento o uso de productos.

Para la administración tópica, el oligómero de alginato de uso en la invención puede incorporarse en cremas, pomadas, geles, parches transdérmicos y similares. Las soluciones estériles simples del oligómero de alginato o las composiciones líquidas estériles simples que comprenden el oligómero de alginato pueden ser especialmente cómodas de usar durante los procedimientos quirúrgicos y para tratar dispositivos implantables. Los oligómeros de alginato también se pueden incorporar en apósitos médicos, por ejemplo, apósitos para heridas, p. ej. apósitos tejidos (por ejemplo, de tela) o apósitos no tejidos (por ejemplo, geles o apósitos con un componente de gel). Se conoce el uso de polímeros de alginato en apósitos, y tales apósitos, o incluso cualquier apósito, pueden incorporar adicionalmente los oligómeros de alginato de uso en la invención.

Otros sistemas tópicos que se consideran adecuados son los sistemas de administración de fármacos in situ, por ejemplo, geles donde se forman in situ matrices de gel cristalinas sólidas, semisólidas, amorfas o líquidas y que pueden comprender el oligómero de alginato (que puede ser cualquier oligómero de alginato como se define en la presente memoria). Dichas matrices se pueden diseñar convenientemente para controlar la liberación del oligómero de alginato de la matriz, p. ej. la liberación puede retrasarse y/o mantenerse durante un período de tiempo elegido. Dichos sistemas pueden formar geles solo en contacto con tejidos o fluidos biológicos. Generalmente los geles son bioadhesivos. La administración a cualquier sitio del cuerpo que pueda retener o adaptarse para retener la composición de pre-gel puede ser dirigida por dicha técnica de administración. Tales sistemas se describen en el documento WO 2005/023176.

El contenido relativo del oligómero de alginato en las composiciones de uso en la invención puede variar dependiendo de la dosis requerida y el régimen de dosificación que se siga y esto dependerá del sujeto a tratar y la ubicación e

identidad del trombo o el sitio o sitios probables de formación. Preferentemente, la composición comprenderá una cantidad del oligómero de alginato que proporcionará una inhibición o prevención medible de la coagulación sanguínea y/o prevención o tratamiento medible, preferentemente clínicamente relevante, prevención o tratamiento de la enfermedad o afección objetivo asociada con la coagulación sanguínea.

Preferentemente, la composición o producto comprenderá una cantidad suficiente de un oligómero de alginato de uso en la invención que después de la administración a un sujeto o aplicación a una localización, la concentración local en la ubicación objetivo del oligómero será al menos 0,05 %, preferentemente al menos 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 % u 8 % y lo más preferentemente al menos 10 % (peso en volumen). El experto en la materia sabría que las cantidades de alginato pueden reducirse si se sigue o aumenta un régimen de dosificación múltiple para minimizar el número de administraciones o aplicaciones.

Las composiciones y productos de uso en la invención comprenderán generalmente de 1 % a 99 %, de 5 % a 95 %, de 10 % a 90 % o de 25 % a 75 % de oligómero de alginato, teniendo en cuenta otros ingredientes.

Los métodos de la invención se pueden aplicar en contextos *in vitro* y *ex vivo*. La sangre y los productos derivados de la sangre con capacidad de coagulación, incluyendo el plasma, se usan comúnmente en numerosos procedimientos médicos. Por ejemplo, las transfusiones de sangre y plasma son lugares comunes durante los procedimientos quirúrgicos y los tratamientos de traumatismos. La recolección de tales productos de los donantes se elimina con mayor frecuencia, tanto física como temporalmente, de la administración al paciente. Por tanto, tales productos deben ser manipulados *in vitro* en algún momento de su vida útil. Los productos sanguíneos con la capacidad de coagulación derivados de la sangre deben, por definición, someterse a una cierta cantidad de procesamiento *in vitro*.

Además, se extrae sangre de forma rutinaria de los pacientes para realizar pruebas diagnósticas y pronósticas *in vitro* en las mismas.

En estas áreas, es fundamental que no se produzca la coagulación de la sangre/producto sanguíneo y es una práctica estándar que se agreguen anticoagulantes como EDTA, citrato y oxalato a la sangre en el momento de la recolección o poco después para garantizar que la coagulación se retarde. Si esa sangre sufre algún tipo de procesamiento, se mantendrá la presencia de un anticoagulante para garantizar que la coagulación no se produzca en un momento posterior.

Por lo tanto, los oligómeros de alginato de uso en la presente invención pueden usarse para inhibir o prevenir la coagulación en composiciones *in vitro* que comprenden plasma sanguíneo, preferentemente sangre completa. La baja toxicidad de tales oligómeros de alginato los hace especialmente ventajosos en este contexto ya que tales composiciones tratadas pueden administrarse a pacientes sin que el anticoagulante cause toxicidad. Preferentemente, el oligómero de alginato se pone en contacto con la composición que comprende plasma sanguíneo (por ejemplo, sangre completa) sustancialmente tras la recogida, p. ej. a los 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 minuto de la recogida, preferentemente contemporáneamente. En otras realizaciones, el oligómero de alginato se pone en contacto con la composición que comprende plasma sanguíneo, p. ej. sangre completa, durante el almacenamiento. Este contacto puede ocurrir una pluralidad de veces durante la vida de la composición.

El oligómero de alginato de uso en la invención puede añadirse en consecuencia a la composición que comprende plasma sanguíneo. Como alternativa o adicionalmente se puede agregar o proporcionar en un recipiente en el que se va a introducir la composición, o en el que se va a contener, p. ej. tubos de recolección de sangre, bolsas de almacenamiento, etc. En realidad, con el oligómero de alginato se puede proporcionar cualquier material (p. ej. vaso o conducto (línea) o superficie o dispositivo) con el que la composición que contiene plasma pudiera entrar en contacto (p. ej. equipo de prueba, así como el equipo de recogida o almacenamiento, dispositivos o equipos médicos o quirúrgicos, dispositivos médicos implantables etc.). Así, cualquier material destinado o que probablemente, pueda entrar en contacto con una composición que comprende plasma sanguíneo puede ponerse en contacto con un oligómero de alginato como se define en la presente memoria de acuerdo con los usos y métodos de la presente invención.

Los productos y dispositivos representativos incluyen productos y dispositivos de prueba de diagnóstico e investigación, que incluyen, por ejemplo, sensores y otros dispositivos para analizar sangre o componentes sanguíneos, y productos, incluidos los consumibles, para usar con estos, por ejemplo, tiras o aplicadores de ensayo, placas, viales o recipientes, etc.

En realizaciones en las que la composición se deriva o se ha derivado de sangre completa y se debe administrar a un paciente a su debido tiempo, esa composición puede considerarse que es *ex vivo.* En otras palabras, los métodos de la invención tal como se exponen anteriormente no se practican ni se llevan a cabo en el cuerpo humano o animal (por ejemplo, en el que la etapa de usar el oligómero de alginato no se produce en el cuerpo humano o animal). En el contexto de esta invención, cualquier método que no sea un método practicado sobre o en el cuerpo de un humano o un animal (por ejemplo, mediante terapia o cirugía) puede considerarse como un método *in vitro*, que puede incluir métodos *ex vivo*. Sin embargo, como se desprende de lo anterior, dichos métodos *in vitro/ex vivo* todavía se pueden realizar con una aplicación clínica en mente.

Un ejemplo particular que ilustra esto sería la diálisis sanguínea. Los anticoagulantes a menudo se usan durante la diálisis sanguínea para garantizar que no se formen trombos problemáticos dentro de la maquinaria de diálisis y se transfieran al paciente con la sangre dializada. La administración del anticoagulante al paciente equivaldría a un tratamiento *in vivo*. Por otro lado, la administración del anticoagulante a la sangre mientras está fuera del paciente y dentro del equipo y los conductos de diálisis equivaldría a un tratamiento *ex vivo/in vitro*.

Por analogía con la diálisis, los oligómeros de alginato como se definen en la presente memoria también se pueden usar como anticoagulantes de acuerdo con la presente invención en cualquier método de plasmaféresis, es decir cuando se extrae sangre del cuerpo, plasma o se extrae o trata uno o más componentes de plasma, y las células sanguíneas y/o plasma son devueltos al cuerpo. Más generalmente, el uso de oligómeros de alginato de acuerdo con la presente invención puede ser aplicable a cualquier método extracorpóreo de tratamiento de la sangre.

En vista de la necesidad comúnmente percibida de mantener sangre y productos sanguíneos *in vitro* en condiciones estériles es rutinario suministrar a los vasos y conductos de recolección estériles un anticoagulante ya presente en ellos en una cantidad efectiva. Los oligómeros de alginato pueden usarse de acuerdo con la invención de la misma manera.

Así, la invención proporciona vasos y conductos de recogida de sangre estériles que contienen un oligómero de alginato como se define en la presente memoria. El oligómero de alginato se puede proporcionar en cualquier forma adecuada, p. ej. libre (p. ej. como parte de una solución o como un sólido, p. ej. sólido liofilizado) o en forma inmovilizada, p. ej. como pretratamiento (p. ej. revestimiento) sobre las superficies internas de los vasos y conductos. Los vasos de recolección de sangre incluyen, aunque no de forma limitativa, bolsas de transfusión de sangre, tubos de ensayo o viales (preferentemente al vacío) y jeringas.

La invención proporciona además consumibles, equipos y maquinaria de diálisis o plasmaféresis, incluidos conductos desechables, receptáculos y filtros que contienen o que tienen superficies que han sido pretratadas, p. ej. recubiertas, con un oligómero de alginato como se define en la presente memoria.

Por "pretratada" se entiende que la superficie está expuesta a un oligómero de alginato de uso en la invención antes de una exposición a la composición que comprende plasma sanguíneo de tal manera que el oligómero de alginato persista en la superficie durante un tiempo suficiente para prevenir o inhibir la coagulación sanguínea en o en la superficie tratada. Preferentemente, el oligómero de alginato persistirá sustancialmente durante la vida útil de la superficie, p. ej. el pretratamiento da como resultado un recubrimiento sustancialmente permanente de un oligómero de alginato. Sin embargo, no es necesario un efecto anticoagulante permanente y puede ser útil proporcionar un producto o dispositivo con un efecto anticoagulante de duración más limitada, por ejemplo, días, semanas o meses. Así, una superficie/producto pretratado es aquel al que se aplica el oligómero de alginato y sobre el que permanece. Tal producto/superficie puede ser un producto/superficie recubierta y/o impregnada. En ciertas realizaciones, un recubrimiento comprenderá una pluralidad, es decir, al menos dos, capas de un oligómero de alginato como se define en la presente memoria. En otras realizaciones, el oligómero de alginato puede proporcionarse en una sola capa, y en otras realizaciones más puede estar unido por el extremo, de modo que el oligómero de alginato esté más libremente disponible para contactar la composición que contiene plasma.

El pretratamiento se puede lograr por cualquier medio adecuado, por ejemplo, cualquier forma de aplicar el oligómero de alginato a la superficie, en particular recubriendo la superficie, p. ej. por pulverización, del recubrimiento de polímero con un polímero que incorpora el oligómero de alginato. Como alternativa, el oligómero de alginato puede incorporarse o impregnarse en el material a partir del cual se fabrica el objeto o sus partes susceptibles. Este enfoque es adecuado para objetos, o partes constituyentes de los mismos, fabricados a partir de polímeros como plásticos y siliconas. Por lo tanto, se contemplan productos de recogida y almacenamiento de sangre y productos de diálisis/plasmaféresis que comprenden una superficie inanimada que comprende un recubrimiento de oligómero de alginato o una composición de recubrimiento, o que incorporan o se impregnan con, un oligómero de alginato.

El método *in vitro/ex vivo* puede comprender así preparar un producto o dispositivo que tenga una capacidad reducida para promover la coagulación sanguínea. La expresión "capacidad reducida para promover la coagulación sanguínea" puede interpretarse de manera análoga a la definición de "prevención o inhibición de la coagulación sanguínea" dada anteriormente. Como se ha analizado anteriormente, una superficie artificial tiene una propensión a inducir la coagulación, y la mayoría de los plásticos sintéticos, polímeros y superficies metálicas son trombogénicos. Los oligómeros de alginato como se definen en la presente memoria pueden usarse de acuerdo con la presente invención para reducir esa propensión o capacidad. Más en particular, el oligómero de alginato puede reducir el grado de coagulación (o formación de coágulos) inducida por el producto o dispositivo cuando se pone en contacto con una composición que comprende plasma sanguíneo, p. ej. sangre o un producto derivado de la sangre, incluyendo cuando se coloca el producto o dispositivo *in situ* en el lugar en un cuerpo animal humano o no humano.

La inducción de la coagulación por dispositivos médicos representa un problema significativo y, como se ha señalado anteriormente, cualquier reducción en la tasa y/o extensión de la coagulación es beneficiosa, incluso si es pequeña (por ejemplo, al menos 5 o 10 % de reducción).

Una superficie artificial puede ser cualquier superficie inanimada, y en particular una superficie de un producto de dispositivo destinado a entrar en contacto con una composición que comprende plasma sanguíneo. En una realización particular, es una superficie de o en un dispositivo médico. Puede ser cualquier superficie sintética, por ejemplo, un polímero, plástico, caucho, silicona, metal o vidrio etc.

La preparación de un producto o dispositivo que tiene una capacidad reducida para promover la coagulación puede implicar una etapa de proporcionar un oligómero de alginato como se define en la presente memoria en o sobre una superficie de dicho producto o dispositivo, especialmente en o sobre una superficie artificial. Como se señaló y discutió anteriormente, el oligómero de alginato puede incorporarse o impregnarse en el material del cual está hecha o formada la superficie o puede aplicarse a la superficie, especialmente mediante recubrimiento.

El oligómero de alginato puede aplicarse (por ejemplo, recubrirse) solo o en combinación con uno o más de otros materiales o componentes. Por lo tanto, el oligómero de alginato puede estar unido o inmovilizado a la superficie directamente (por unión covalente o no covalente, por ejemplo, adsorción) o puede ser incorporado o estar contenido dentro (por ejemplo, atrapado o unido a) un material que se aplica (por ejemplo, recubierto) al producto o dispositivo, cuyo material puede estar unido covalentemente o no covalentemente. Así, a modo de ejemplo, el oligómero de alginato puede quedar atrapado en un polímero o revestimiento aplicado a la superficie, o puede estar unido covalentemente a un polímero matriz utilizado para preparar un revestimiento de polímero. El revestimiento de polímero puede estar diseñado para proporcionar una liberación retardada del oligómero de alginato, por ejemplo, incorporándolo (por ejemplo, atrapándolo) en diferentes capas de polímero. Tal liberación retrasada puede ser durante diferentes períodos de tiempo, por ejemplo, de días a meses.

Se conocen varias tecnologías de recubrimiento diferentes para dispositivos médicos y similares, por ejemplo, de SurModics, y se puede usar cualquier tecnología de este tipo. En realidad, como se ha señalado anteriormente, se sabe proporcionar dispositivos y productos médicos con recubrimientos hemocompatibles para tratar de reducir la coagulación. "Hemocompatible" como se define en la presente memoria significa que la superficie/material/producto/dispositivo/recubrimiento o compuesto, etc. en cuestión no produce ninguna respuesta negativa cuando se pone en contacto con sangre o con una composición que comprende plasma, o que cualquier respuesta negativa se reduce o inhibe, por ejemplo, minimiza. Una respuesta negativa puede ser la coagulación, la activación plaquetaria, etc., y en particular cualquier respuesta que pueda conducir a, o aumentar, la coagulación.

Un material o revestimiento hemocompatible puede ser "activo", es decir, puede comprender agentes bioactivos que inhiben o evitan la coagulación, por ejemplo inhibiendo la generación de trombina (por ejemplo, heparina), o pueden ser "pasivos" y pueden proporcionar un efecto anticoagulante o hemocompatible por ej. protegiendo la superficie de la sangre, o reduciendo su capacidad para inducir la coagulación, por ejemplo reduciendo la adsorción de proteínas a la superficie de la sangre, y/o la activación plaquetaria. Un recubrimiento pasivo puede considerarse como "disfrazando" o "camuflando" la superficie para que no se reconozca como extraño en la sangre. En el estado de la técnica se conocen diversos recubrimientos hemocompatibles activos y pasivos diferentes. Un oligómero de alginato como se define en el presente documento puede usarse en combinación con tales recubrimientos y puede usarse para impartir un efecto activo y/o pasivo.

Así, el oligómero de alginato de uso en la invención puede proporcionarse como parte de, o incluido en, un recubrimiento hemocompatible, y puede usarse en combinación con uno o más compuestos hemocompatibles como se ha descrito anteriormente, incluyendo ambos agentes bioactivos que pueden tener un efecto anticoagulante, por ejemplo, heparina, hialuronano, dextrano, etc. y polímeros y/o plásticos que pueden tener un efecto pasivo hemocompatible.

Otro ejemplo de un compuesto hemocompatible es una molécula que puede liberar óxido nítrico (ON), que se sabe que previene la activación plaquetaria. Se han desarrollado polímeros liberadores de ON.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Efecto de los oligómeros de alginato de bloque G sobre el tiempo de coagulación sanguínea de sangre humana completa

Materiales y métodos

Materiales de prueba y controles

El oligómero de alginato fue OligoG CF-5/20, un oligómero de alginato con bloque G (DP 5 a 20, peso molecular promedio 2600, 90-95 % de residuos G). El OligoG fue proporcionado por AlgiPharma AS, Noruega. El control positivo fue tierra de Fuller, tamaño de malla 8-16, Sigma-Aldrich A/S.

Formulación de OligoG

Una muestra pesada de OligoG se roció lentamente en pequeñas cantidades en agua estéril (Fresenius Kabi AG, Alemania) que se agitó magnéticamente. Cuando se añadió toda la muestra, se continuó la agitación durante 50 minutos más y se añadió agua estéril adicional para obtener el volumen final total apropiado. La formulación bloqueó rápidamente un filtro Sartorius MiniSart (tamaño de poro de 0,2 µm), por lo que se almacenó a temperatura ambiente durante la noche y luego se agitó magnéticamente durante una hora más. Todavía no era posible filtrar la formulación, por lo que se usó en la prueba sin filtración.

La concentración final de la formulación de OligoG fue 200 mg/ml, expresada en términos del contenido de materia seca (declarado 95,2 % en la muestra de OligoG suministrada).

Procedimiento de la prueba de coagulación

Se introdujeron alícuotas (53 µl y 111 µl) de la formulación OligoG a 200 mg/ml en tubos de ensayo separados. Se introdujo tierra de Fuller (aproximadamente 100 mg/tubo) en tubos de control positivos. También se prepararon tubos vacíos como controles negativos (sin tratar).

Se obtuvieron muestras de sangre frescas por venopunción de cuatro adultos sanos. Las muestras de sangre se recogieron de cada donante utilizando tubos Liquidraw (plástico liso). A medida que se recogía cada muestra de sangre, se añadieron alícuotas (1 ml) en unos pocos segundos desde la recolección a cada uno de los tubos para cubrir los elementos de prueba y control. La formulación de OligoG se mezcló con sangre a 5 y 10 % v/v y, por lo tanto, las concentraciones finales de OligoG en las mezclas fueron de 10 y 20 mg/m (expresadas en términos del contenido de materia seca de OligoG). Un tubo que contiene cada concentración de OligoG y un tubo con cada control se analizaron con la sangre de cada donante. Inmediatamente, los tubos se colocaron en un baño de agua a aproximadamente 37 °C y se agitaron hasta que se produjo la coagulación. La agitación suave de las muestras no coaguladas fue continua durante aproximadamente 20 a 30 minutos, después cada aproximadamente 5 a 10 minutos y después menos frecuentemente. El tiempo transcurrido entre la recolección de la alícuota de sangre y la coagulación completa se registró para cada tubo.

Resultados

Tabla 1: Tiempos de coagulación para 4 muestras de sangre humana diferentes en presencia de OligoG a 10 mg/ml o 20 mg/ml

Tratamiento	Tiempo de coagulación (s-segundos; h=horas)					
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Media ± D.T.	% del control
Control negativo	481s	428s	660s	615s	546 ± 109s	100
Control positivo	222s	200s	207s	204s	208 ± 10s	38
OligoG 20 mg/ml	>5h[a]	>5h[a]	>5h[a]	>5h[a]	-	-
OligoG 10 mg/ml	>5h[a]	3986s a 6671s[b]	>5h[a]	>5h[a]	-	>931

Leyenda de la Tabla 1:

% del control	Tiempo medio de coagulación como un porcentaje del tiempo medio del control negativo
D.T.	Desviación típica
Control negativo	Sin tratar
Control positivo	Tratamiento con tierra de Fuller
OligoG	Tratamiento con OligoG CF-5/20
a	Mezcla que permanece sin coagular
b	Mezcla coagulada a veces entre estos dos puntos de observación

El tratamiento del control positivo con tierra de Fuller provocó una gran reducción en el tiempo de coagulación medio hasta el 38 % del valor medio del control negativo, lo que demuestra la eficacia y sensibilidad de la prueba.

El tiempo de coagulación medio para las cuatro muestras de sangre no tratadas fue 546 segundos. El tratamiento con OligoG a 10 mg/ml aumentó el tiempo de coagulación sanguínea de un donante en un factor mayor a 9.31: la coagulación ocurrió entre las observaciones a 3986 y 6671 segundos. Las mezclas que contenían el objeto de ensayo a 10 mg/ml para los otros tres donantes y a 20 mg/ml para los cuatro donantes permanecieron sin coagular durante más de cinco horas (>18000 segundos) después de que se prepararon y no hubo más observaciones de las mezclas.

Conclusión

Se concluye que OligoG CF-5/20, y por extensión los oligómeros de alginato en general, es capaz de inhibir significativamente, si no prevenir, la coagulación de la sangre completa. Con esta evidencia, se puede proponer el uso de oligómeros de alginato como anticoagulantes tanto *in vitro*, p. ej. en el manejo de sangre y productos sanguíneos

como *in vivo*, p. ej. en terapia anticoagulante.

Ejemplo 2 - Efecto de los oligómeros de alginato de bloque M y bloque MG sobre el tiempo de coagulación de sangre humana completa

Materiales y métodos

Materiales de prueba y controles

Los oligómeros de alginato ensayados fueron un oligómero de alginato de bloque M (DPn 10, 100 % de residuos M) y un oligómero de alginato de bloque MG (DPn 15, esencialmente una secuencia alterna de residuos M y G). Los oligómeros de alginato fueron proporcionados por AlgiPharma AS, Noruega. El control positivo fue tierra de Fuller, tamaño de malla 8-16, Sigma-Aldrich A/S. El objeto de referencia fue heparina LEO 5000 IE/ml, LEO Pharma A/S.

Formulación de los materiales de prueba y controles

Una muestra pesada de cada oligómero (200 mg para bloques M DPn10 y 200,1 mg para bloques MG DPn 15) se roció lentamente en pequeñas cantidades en agua destilada estéril (880 µl, Fresenius Kabi AG, Alemania) que se agitó magnéticamente. Una vez agregada la totalidad de cada objeto de ensayo, la agitación continuó durante 92 - 95 minutos más hasta que cada objeto de ensayo se disolvió. La concentración final de cada obajeto de ensayo de la formulación de OligoG fue 200 mg/ml, expresada en términos del objeto de muestra suministrada, y suponiendo que el desplazamiento del objeto de referencia fue de 0,6 ml/g. Las formulaciones de los objetos de ensayo se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso en la prueba de coagulación al día siguiente.

Las diluciones del elemento de referencia se prepararon en agua destilada estéril (Fresenius Kabi AG, Alemania) el día de la prueba de coagulación para dar concentraciones finales de heparina de 200, 20 y 2 UI/ml.

Procedimiento de la prueba de coagulación

Se introdujeron alícuotas (53 µl y 111 µl) de cada formulación de oligómero de alginato a 200 mg/ml en tubos de ensayo separados. Se introdujeron alícuotas (53 µl) de las formulaciones del objeto referencia a 200, 20 y 2 UI/ml en tubos de ensayo independientes. Se introdujo tierra de Fuller (aproximadamente 100 mg/tubo) en tubos de control positivos. También se prepararon tubos vacíos como controles negativos (sin tratar).

Se obtuvieron muestras de sangre fresca por venopunción de cuatro adultos sanos. Las muestras de sangre se recogieron de cada donante utilizando tubos Liquidraw (plástico liso). A medida que se recogía cada muestra de sangre, se añadieron alícuotas (1 ml) en unos pocos segundos desde la recolección a cada uno de los tubos para cubrir los oligómeros del alginato de ensayo, referencia y control. Las formulaciones de oligómero de alginato se mezclaron con sangre a 5 y 10 % v/v y, por lo tanto, las concentraciones finales de cada oligómero de alginato en las mezclas fueron 10 y 20 mg/ml (expresadas en términos de las muestras de oligómero de alginato tal como se recibieron). Cada dilución del artículo de referencia se mezcló con sangre al 5 % v/v y, por lo tanto, las concentraciones finales del artículo de referencia (heparina) en las mezclas fueron 10, 1 y 0,1 UI/ml. Un tubo que contiene cada concentración de cada oligómero de ensayo, un tubo que contiene cada concentración del objeto de referencia y un tubo con cada control se analizaron con la sangre de cada donante. Inmediatamente, los tubos se colocaron en un baño de agua a aproximadamente 37 °C y se agitaron regularmente hasta que se produjo la coagulación. El tiempo transcurrido entre la recolección de la alícuota de sangre y la coagulación completa se registró para cada tubo. Las muestras que permanecieron sin coagular más de seis o siete horas después del inicio del tratamiento se descartaron en ese momento y no se hicieron más observaciones.

Resultados

Tabla 2 - Tiempos de coagulación para 4 muestras de sangre humana diferentes en presencia de oligómeros de alginato de bloque M (DPn 10) y oligómeros de alginato de bloque MG (DPn 15) a 10 mg/ml o 20 mg/ml; heparina a 10, 1 y 0,1 UI/ml y tierra de Fuller.

Tratamiento	Tiempo de coagulación (s=segundos; h=horas)					
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Media ± D.T.[a]	% del control
Control negativo	921s	933s	938s	1046s	960 ± 58s	100
Control positivo	257s	270s	219s	289s	259 ± 30s	27
Objeto de ensayo A 20 mg/ml	5035s	2295s	>6hb	10259s	>5863 ± 4046s	>611
Objeto de ensayo A 10 mg/ml	2327s	2674s	1607s	2189s	2199 ± 444s	229

(continuación)

Tratamiento	Tiempo de coagulación (s=segundos; h=horas)					
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Media ± D.T.[a]	% del control
Objeto de ensayo B 20 mg/ml	>7hb	>7hb	>6hb	>6hb	-	-
Objeto de ensayo B 10 mg/ml	3359s	8331s	4473s	10850s	6753 ± 3464s	703
Heparina 0,1 UI/ml	1594s	1168s	2388s	1365s	1629±535s	170
Heparina 1 UI/ml	>7hb	>7hb	>6hb	>6hb	-	-
Heparina 10 UI/ml	>7hb	>7hb	>6hb	>6hb	-	-

Leyenda de la Tabla 2:

% del control	Tiempo medio de coagulación como un porcentaje del tiempo medio del control negativo
D.T.	Desviación típica
a	Todas las medias y D.T. excluyen valores de muestras no coaguladas
b	Mezcla que permanece sin coagular
Control negativo	Sin tratar
Control positivo	Tratamiento con tierra de Fuller
Objeto de ensayo A	Oligómero de alginato de bloque M Dpn 10
Objeto de ensayo B	Oligómero de alginato de bloque MG Dpn 15

El tratamiento del control positivo con tierra de Fuller provocó una gran reducción en el tiempo de coagulación medio hasta el 27 % del valor medio del control negativo, lo que demuestra la eficacia y sensibilidad de la prueba.

El tratamiento con el oligómero de alginato de bloque M (DPn 10) retrasó la coagulación en ambas concentraciones analizadas y en muestras de sangre de los cuatro donantes. A 10 mg/ml, el tiempo medio de coagulación mostró un aumento hasta 229 % del valor medio del control negativo. A 20 mg/ml, el tiempo medio de coagulación de tres de los donantes mostró un aumento hasta 611 % del valor medio del control negativo, mientras que la muestra de sangre del cuarto donante permaneció sin coagular más de seis horas después del inicio del tratamiento.

El tratamiento con el oligómero de alginato de bloque MG (DPn 15) retrasó la coagulación en ambas concentraciones analizadas y en muestras de sangre de los cuatro donantes. El efecto fue mayor que el causado por el oligómero de alginato de bloque M: a 10 mg/ml el oligómero de alginato de bloque MG aumentó el tiempo de coagulación medio hasta el 703 % del valor medio del control negativo. A 20 mg/ml, las muestras de sangre de los cuatro donantes permanecieron sin coagular más de seis horas después del inicio del tratamiento. Este efecto es menor que el causado por el oligómero de alginato de bloque G donde la sangre de todos los donantes excepto uno permaneció sin coagular después de 5 horas a 10 mg/ml o 20 mg/ml de oligómero de alginato de bloque G

El objeto de referencia, heparina, retrasó la coagulación en las tres concentraciones probadas y en muestras de sangre para los cuatro donantes. A 0,1 UI/ml, el tiempo medio de coagulación mostró un aumento hasta el 170 % del valor medio del control negativo. A 1 y 10 UI/ml, las muestras de sangre de los cuatro donantes permanecieron sin coagular más de seis horas después del inicio del tratamiento. Así, el efecto sobre el tiempo de coagulación de los oligómeros de alginato de bloque M y bloque MG a 10 mg/ml fue equivalente al efecto de la heparina entre 0,1 y 1 UI/ml.

Conclusión

Se concluye que tanto los oligómeros de alginato de bloque M como los oligómeros de alginato de bloque MG causaron aumentos marcados en el tiempo de coagulación sanguínea de los cuatro donantes. El efecto de los oligómeros de alginato de bloque M y de los oligómeros de alginato de bloque MG a 10 mg/ml fue equivalente al efecto de la heparina entre 0,1 y 1 UI/ml.

El efecto del oligómero de alginato de bloque MG fue mayor que el del oligómero de alginato de bloque M, pero menor que el oligómero de alginato de bloque G del Ejemplo 1. Así, diferentes secuencias de monómero de ácido urónico y/o diferentes longitudes de oligómero pueden tener diferentes grados de efecto anticoagulante y, por lo tanto, la selección apropiada de oligómeros de alginato puede permitir que se alcancen grados particulares de anticoagulación en

escenarios particulares. Por ejemplo, se puede seleccionar una mayor cantidad de residuos G y/o longitud de bloque G para dar un efecto anticoagulante más potente.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* o *ex vivo* para la prevención o inhibición de la coagulación sanguínea, comprendiendo dicho método poner en contacto una composición que comprende plasma sanguíneo o un material con el que dicha composición está, o puede estar, en contacto, con un oligómero de alginato de 2 a 30 residuos de monómero, en la que dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato.

2. El método *in vitro* o *ex vivo* de la reivindicación 1, en el que dicha composición que comprende plasma sanguíneo es sangre completa.

3. El método *in vitro* o *ex vivo* de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha composición que comprende plasma sanguíneo es estéril.

4. El método *in vitro* o *ex vivo* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el material es, o es parte de, un producto o dispositivo que durante el uso entra en contacto con sangre o un producto derivado de la sangre que tiene la capacidad de coagularse.

5. El método *in vitro* o *ex vivo* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho método es para la preparación de un producto o dispositivo que tiene una capacidad reducida para promover la coagulación sanguínea, comprendiendo dicho método proporcionar el oligómero de alginato en o sobre una superficie de dicho producto o dispositivo.

6. El método *in vitro* o *ex vivo* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oligómero de alginato se incorpora o se impregna en el material, o se aplica a una superficie del material que entra en contacto con la composición.

7. El método *in vitro* o *ex vivo* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el oligómero de alginato se recubre sobre una superficie del material, o se proporciona como parte de un recubrimiento superficial.

8. El método *in vitro* o *ex vivo* de la reivindicación 7, en el que el oligómero de alginato se proporciona o se incluye en un recubrimiento hemocompatible que comprende uno o más compuestos hemocompatibles adicionales, preferentemente en el que el compuesto hemocompatible adicional se selecciona de heparina, heparán sulfato, hialuronano, polietilenglicol o dextrano.

9. El método *in vitro o ex vivo* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el material se selecciona de:

(i) un vaso o conducto de recolección de sangre estéril,
(ii) un consumible de diálisis o plasmaféresis o una pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis,
(iii) un dispositivo médico, quirúrgico o protésico implantable,
(iv) un tejido de trasplante, o
(v) un producto o dispositivo diagnóstico, o una parte del mismo.

10. Un oligómero de alginato para usar en terapia de anticoagulación, en el que dicho oligómero de alginato contiene de 2 a 30 residuos de monómero, y dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato.

11. El oligómero de alginato para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho oligómero de alginato es para usar en un método para tratar o prevenir la trombosis o una enfermedad o afección asociada con la coagulación sanguínea, preferentemente en el que dicha enfermedad o afección es trombosis venosa, trombosis arterial, ateroesclerosis, oclusión del injerto venoso, oclusión del injerto arterial, ictus, infarto cardíaco, embolia pulmonar o trombofilia.

12. El oligómero de alginato para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que dicho oligómero de alginato se administra a un sujeto seleccionado de un sujeto

(i) que estará o está inmóvil durante períodos prolongados,
(ii) con fibrilación arterial,
(iii) con una placa ateroesclerótica,
(iv) con o que recibe un dispositivo médico, quirúrgico o protésico implantable,
(v) sometido, a punto de someterse o en recuperación de un procedimiento quirúrgico,
(vi) con trombofilia congénita o adquirida.

13. El oligómero de alginato para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicho oligómero de alginato es para usar en un método para inhibir o prevenir la formación de trombosis en una superficie de un material seleccionado de un dispositivo médico, quirúrgico o protésico implantable o interno, un trasplante de tejido, un consumible de diálisis o plasmaféresis o una pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis.

14. El método *in vitro* o *ex vivo* de la reivindicación 9 o el oligómero de alginato para usar de acuerdo con la reivindicación 13 en el que

(i) dicho dispositivo médico, quirúrgico o protésico implantable es un catéter, una válvula cardíaca, un stent vascular, una articulación artificial, un dispositivo intrauterino, un marcapasos, un tubo de traqueostomía, un cable de radioterapia o un implante de tejido blando,
(ii) dicho tejido de trasplante es tejido cardíaco, preferentemente una válvula cardíaca, pulmón, riñón, hígado, páncreas, intestino o tejido corneal, un injerto arterial o venoso o piel, y
(iii) dicho consumible de diálisis o plasmaféresis o una pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis es un conducto de diálisis o plasmaféresis, receptáculo o filtro.

15. El método *in vitro* o *ex vivo* de la reivindicación 9 o la reivindicación 14 o el oligómero de alginato para usar de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14 en el que dicho material contiene o lleva el oligómero de alginato en o sobre una superficie con la cual puede entrar en contacto una composición que comprende plasma sanguíneo, opcionalmente en el que dicha superficie también contiene o lleva u o más compuestos hemocompatibles, preferentemente en el que el compuesto hemocompatible adicional se selecciona de heparina, heparán sulfato, hialuronano, polietilenglicol o dextrano.

16. El oligómero de alginato para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho oligómero de alginato es para usar antes, durante y/o después de un procedimiento quirúrgico para inhibir o prevenir la formación de trombosis en sitios de incisión quirúrgica.

17. Un recipiente o conducto de recolección de sangre estéril o un consumible de diálisis o plasmaféresis o una pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis, en el que dicho recipiente o conducto o en el que dicho consumible de diálisis o plasmaféresis o pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis contiene o lleva un oligómero de alginato en o sobre una superficie con la que el plasma sanguíneo puede entrar en contacto, en el que dicho oligómero de alginato contiene de 2 a 30 residuos de monómero, y dichos residuos de monómero no llevan un grupo sulfato.

18. El recipiente o conducto de recolección de sangre estéril de la reivindicación 17 en el que dicho recipiente o conducto es una bolsa de transfusión de sangre, un tubo o vial, o una jeringa de recolección de sangre.

19. El consumible de diálisis o plasmaféresis o una pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis de la reivindicación 17, en el que dicho consumible, equipo o maquinaria es un conducto de diálisis o plasmaféresis, receptáculo o filtro.

20. El recipiente o conducto de recolección de sangre estéril o un consumible de diálisis o plasmaféresis o una pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que dicha superficie contiene o lleva un compuesto hemocompatible adicional, preferentemente seleccionado de heparina, heparán sulfato, ácido hialurónico, polietilenglicol o dextrano.

21. El método, oligómero de alginato para usar, vaso o conducto de recolección de sangre estéril, consumible de diálisis o plasmaféresis o una pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el oligómero de alginato

(i) tiene un grado de polimerización promedio en número de 2 a 25 o de 2 a 20; o
(ii) tiene de 3 a 28 residuos, de 4 a 25 residuos, de 5 a 20 residuos, de 6 a 22 residuos, de 8 a 20 residuos, o de 10 a 15 residuos.

22. El método, oligómero de alginato para usar, vaso o conducto de recolección de sangre estéril, consumible de diálisis o plasmaféresis o una pieza de un equipo o maquinaria de diálisis o plasmaféresis de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que

(i) el oligómero de alginato tiene al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 %, 100 % de residuos G preferentemente en el que al menos el 80 % de los residuos G están dispuestos en bloques G; o
(ii) el oligómero de alginato tiene al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o 100 % de residuos M, preferentemente en el que al menos el 80 % de los residuos M están dispuestos en bloques M; o
(iii) al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o 100 % de los residuos G y M en el oligómero están dispuestos en bloques MG.