

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 368**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2015** **E 20182629 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023** **EP 3748358**

54 Título: **Método celular para determinar la potencia de la defibrotida**

30 Prioridad:

**27.11.2014 EP 14195277**

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

**12.06.2024**

73 Titular/es:

**GENTIUM S.R.L. (100.0%)**

**Piazza XX Settembre 2**

**22079 Villa Guardia (Como), IT**

72 Inventor/es:

**IGNONI, TERENCE;**

**KUMAR, VIJAY y**

**VERGA, CLAUDIO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 972 368 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

Método celular para determinar la potencia de la defibrotida

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las sustancias medicinales deben producirse con un nivel de actividad específico constante para que puedan administrarse con seguridad. Por ejemplo, los ensayos de moléculas biológicas como la heparina tienen variabilidad de un lote a otro en términos de longitud de cadena, peso molecular, composición, grado de sulfatación, etc. También es necesario normalizar otras sustancias que se extraen de sustancias naturales. Consultar, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 7.575.886. Una de estas sustancias es la defibrotida. La defibrotida es una mezcla heterogénea de polinucleótidos de cadena sencilla de longitudes variables que se extrae de órganos de mamíferos.

Hay disponibles ensayos para evaluar la actividad biológica de la defibrotida, incluyendo la prueba de la placa de fibrina y el registro tromboelastográfico del tiempo de lisis de la euglobulina (Prino G. et al., Indagini preliminari sull'attività fibrinolitica, nell'animale e nell'uomo, di una nuova sostanza presente in diversi organi animali, Simposio Internazionale: La ricerca scientifica nell'industria farmaceutica in Italia, Roma, 2-4 oct. 1975-II Farmaco, Ed. Prat). (1969), 24, 552-561), el método de la plasmina (Patente de Estados Unidos N° 7,338,777), y el método de la euglobulina (WO2013/190582). Aunque estos métodos son herramientas de fabricación farmacéutica útiles, todos estos métodos, que se basan en las propiedades profibrinolíticas de la defibrotida, implican una evaluación de la actividad de la defibrotida sobre proteínas o enzimas aisladas. Por tanto, hay una necesidad en la técnica de métodos novedosos para determinar la actividad biológica de la defibrotida en un contexto celular que proporcione un proceso preciso y fiable para evaluar la potencia, por ejemplo, por comparación con una preparación estándar de defibrotida de referencia, de nuevos lotes de defibrotida independientemente del proceso de fabricación usado.

25 **SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la defibrotida protege a las células de mamífero de la citotoxicidad inducida por agentes citotóxicos particulares de forma dependiente de la dosis. Los inventores han aprovechado este efecto de protección celular y han desarrollado un método basado en células para evaluar la potencia de los lotes de defibrotida y han definido una unidad de medición para facilitar una administración eficaz y segura. Tales métodos permiten, entre otras cosas, el control de calidad durante el proceso de fabricación de la defibrotida, la estandarización de lotes de defibrotida producidos por diferentes métodos o fuentes, y la dosificación consistente de pacientes con defibrotida.

35 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**Figura 1.** Viabilidad de las células HMEC incubadas con fludarabina en presencia o ausencia de concentraciones variables de defibrotida, medido mediante el ensayo MTT. Se incubaron células HMEC-1 con fludarabina (F-Ara) a 10 µg/ml en presencia o ausencia de concentraciones variables de defibrotida (DF) (1 µg/ml-100 µg/ml) durante 72 horas y se midió la viabilidad de las células con el ensayo MTT. Prueba t de Student:  $\$p < 0,01$ , F-ara 10 µg/ml frente a control (ctr); \*  $p < 0,05$ , células tratadas con DF a 1 µg/ml frente a F-ara 10 µg /ml; \*\*  $p < 0,001$ , DF a 10 y 100 µg/ml frente a F-ara 10 µg/ml.

**Figura 2.** Viabilidad de las células SK-HEP-1 incubadas con doxorrubicina en presencia o ausencia de concentraciones variables de defibrotida, medido mediante el ensayo CCK-8. Se incubaron células SK-HEP-1 con doxorrubicina (Dox) a 0,1 µg/ml en presencia o ausencia de concentraciones variables de defibrotida (DF) (1 µg/ml-100 µg/ml) durante 72 h y se midió la viabilidad de las células con el ensayo CCK-8. Prueba t de Student:  $\$p < 0,01$ , Dox 0,1 µg/ml frente a control (ctr); \*  $p < 0,01$ , células tratadas con DF a 50 o 100 µg/ml frente a Dox 0,1 µg /ml.

**Figura 3.** Viabilidad de las células HMEC-1 incubadas con fludarabina en presencia o ausencia de concentraciones variables de defibrotida, AC o ACTG, medido mediante el ensayo MTT. Las células HMEC-1 se incubaron con fludarabina (F-Ara) a 50 µg/ml en presencia o ausencia de concentraciones variables de oligonucleótidos sintéticos aleatorios de adenina-citosina (AC) de aproximadamente 16 kDa (1-500 µg/ml) (**Figura 3A**), oligonucleótidos sintéticos aleatorios de adenina-citosina-guanina-timina (ACGT) de aproximadamente 17 kDa (12,5-50 µg/ml) (**Figura 3A**), 5-50 µg/ml) (**Figura 3B**), o defibrotida (5-100 µg/ml) (**Figura 3C**) durante 72 h y la viabilidad de las células se midió con el ensayo MTT. Prueba t de Student: \*  $p < 0,01$ , F-ara 50 µg/ml frente a control (Ctr), \*\*  $p < 0,01$  F-ara 50 µg/ml frente a defibrotida. No hubo protección significativa por ninguno de los oligonucleótidos sintéticos.

**Figura 4.** Viabilidad de células SK-HEP-1 incubadas con fludarabina en presencia o ausencia de concentraciones variables de ACTG, tPA o glutatión, medido mediante el ensayo CCK-8. Las células SK-HEP-1 se incubaron con fludarabina (F-Ara) a 10 µg/ml en ausencia o presencia, (A-G), de concentraciones variables de oligonucleótidos sintéticos aleatorios de Adenina-Citosina-Guanina-Timéina (ACGT) de aproximadamente 17 kDa (1,25-80 µg/ml), tPA (10-320 U/ml), o glutatión (1,25-80 µg/ml) durante 72 h y se midió la viabilidad de las células con el ensayo CCK-8. Prueba t de Student: \*  $p < 0,01$ , F-Ara 10 µg/ml frente a control (Ctr). No se observó una protección significativa frente a la citotoxicidad inducida por F-Ara mediante ACGT, tPA o glutatión.

**Figura 5.** Comparación de las curvas de respuesta a la dosis del defibrotide estándar frente a las muestras de defibrotide con estrés ácido (**Figura 5A**) y con estrés básico (**Figura 5B**) en el ensayo de protección celular. Los

datos brutos de absorbancia se procesaron usando el programa de análisis estadístico PLA2 (análisis de función logística de 4 parámetros). La absorbancia del colorante indicador de la viabilidad celular (CCK-8) se traza en el eje Y como "respuesta". La dosis se representa en el eje X y es una serie de diluciones dobles de defibrotida en el ensayo (1,25 - 80 µg/ml); STD representa la defibrotida estándar de referencia. Los trazos inferiores de cada panel, que corresponden a las muestras estresadas, indican una potencia reducida. Usando este programa de análisis estadístico, ambas muestras estresadas no cumplieron los criterios estadísticos de aceptación.

**Figura 6.** Viabilidad de las células SK-HEP-1 incubadas con fludarabina en presencia o ausencia de concentraciones variables de defibrotida medido mediante el ensayo CCK-8. Se incubaron células SK-HEP-1 con fludarabina (F-Ara) a 10 µg/ml en ausencia o presencia de concentraciones variables de defibrotida (DF) (1 µg/ml-100 µg/ml) durante 72 horas y se midió la viabilidad de las células con el ensayo CCK-8. Prueba t de Student:  $p < 0,01$ , F-Ara 10 µg/ml frente a control (Ctr) y para células tratadas con DF a  $>1$  µg/ml frente a F-Ara 10 µg/ml.

**Figura 7.** Evaluación de la relación de potencia entre una muestra estandarizada de defibrotida de referencia (estándar) y una muestra de defibrotida de actividad biológica desconocida. Se expusieron células SK-HEP-1 a 6 diluciones en serie (1:2) de defibrotida estándar y de muestra para obtener concentraciones de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 y 1,25 µg/ml en presencia de fludarabina (F-Ara) (10 µg/ml). Cada concentración del estándar y de la muestra consistía en 4 réplicas. Tras 72 h de incubación a 37° C, se midió la viabilidad de las células con el ensayo CCK-8. Las mediciones de absorbancia se sometieron a un análisis estadístico para determinar la potencia de la muestra (análisis logístico de 4 parámetros).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método fiable para determinar la actividad biológica de la defibrotida sobre la base de la capacidad de la defibrotida para proteger a las células vivas de los efectos de ciertos agentes citotóxicos. Este efecto de protección celular es importante para el uso de la defibrotida como producto medicinal. Este método permite normalizar la actividad de la defibrotida obtenida por diferentes métodos o fuentes. El método también permite establecer y asignar una unidad de medición para facilitar la administración eficaz y segura de la defibrotida.

En una realización de la invención, el método para evaluar la potencia de un lote de muestras de defibrotida comprende (i) hacer crecer células de mamífero en cultivo, (ii) incubar las células con una solución que contiene por lo menos un agente citotóxico y por lo menos una concentración de defibrotida del lote de muestra, (iii) determinar la viabilidad de las células después de un periodo de incubación, y (iv) calcular la potencia del lote de muestras de defibrotida sobre la base de la medición de la viabilidad celular. En algunas realizaciones, el método comprende además comparar la viabilidad celular para el lote de muestras de defibrotida con la viabilidad celular para un lote de referencia de defibrotida, y calcular la potencia del lote de muestras de defibrotida basándose en la comparación.

A efectos de la presente invención, el término "*potencia*" se refiere a la medida de la actividad biológica de la defibrotida, en particular basada en la medida de la capacidad de la defibrotida para proteger a las células vivas de los efectos de los agentes citotóxicos.

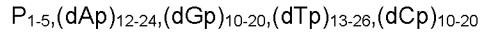
La defibrotida (Merck Index, 1996, N° 2915; número CAS 83712-60-1) es una sustancia de origen natural. Es la sal sódica de polideoxirribonucleótidos de bajo peso molecular que se obtienen por extracción de órganos animales. Se sabe que la defibrotida tiene un peso molecular (MW) de entre 14 y 19 kDa, pero las técnicas de medición específicas muestran que la defibrotida tiene un peso molecular (MW) medio de alrededor de 16,1 kDa  $\pm$  2,0 kDa si se determina mediante la técnica SEC-HPLC; un MW de alrededor de 17,6 kDa  $\pm$  1,0 kDa si se determina mediante la técnica PAGE; y un MW de alrededor de 16,7 kDa  $\pm$  1,6 kDa si se determina mediante la técnica de dispersión de luz láser multiángulo. "Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals" H. Mahler y W. Jiskoot (eds.), 2012 John Wiley & Sons, Inc.

La defibrotida tiene numerosas aplicaciones terapéuticas, como agente antitrombótico (Patente de Estados Unidos N° 3.829.567), tratamiento de arteriopatías periféricas, tratamiento de la insuficiencia renal aguda (Patente de Estados Unidos N° 4.694.134) y tratamiento de la isquemia miocárdica aguda (Patente de Estados Unidos N° 4.693.995). Más recientemente, la defibrotida se ha usado para el tratamiento y la prevención del síndrome de obstrucción sinusoidal/enfermedad oclusiva venosa (ensayo clínico de la UE EudraCT:2004-000592-33, ensayo clínico de US 2005-01 (identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00358501). Otros usos de la defibrotida se describen en las siguientes patentes y solicitudes de patente: Patentes de Estados Unidos N° 3,770,720; 3,829,567; 3,899,481; 4,693,134; 4,693,995; 4,938,873; 4,985,552; 5,081,109; 5,116,617; 5,223,609; 5,646,127; 5,646,268; 5,977,083; 6,046,172; 6,699,985; 6,767,554; 7,338,777; 8,551,967; 8,771,663, Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 20080194506; 20090131362; 20110092576; 20130231470; 20140005256, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 14/323.918; y WO 2013/190582.

Los métodos descritos en la presente pueden usarse para evaluar la potencia de lotes de defibrotida fabricados por diferentes métodos o extraídos de diferentes órganos animales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el lote de muestras de defibrotida se extrae de tejido bovino, como pulmón, intestino o membranas mucosas de bovino. En otras realizaciones, el lote de muestras de defibrotida se extrae de tejido porcino, como pulmón, intestino o membranas mucosas porcinas. Los lotes de muestras de defibrotida también pueden extraerse de otros órganos de

otras especies animales, como ovejas y caballos.

En ciertas realizaciones, los lotes de muestras de defibrotida que se van a evaluar para determinar su potencia mediante los métodos descritos en la presente se fabrican mediante un proceso como el descrito en las Patentes de Estados Unidos N° 4.985.552 y 5.223.609. En particular, el defibrotido obtenido con este proceso es un polidesoxirribonucleótido correspondiente a la siguiente fórmula de secuencia aleatoria:



en donde:

P=radical fosfórico  
dAp=monómero desoxiadenílico  
dGp=monómero desoxiguanílico  
dTp=monómero desoxitimidílico  
dCp=monómero desoxicidílico.

Los lotes de muestras de defibrotida pueden tener una o varias o todas las propiedades químico-físicas siguientes: electroforesis=movilidad anódica homogénea;

coeficiente de extinción,  $E_{1cm}^{1\%}$  a 260±1nm =220±10; relación de extinción,  $E_{230}/E_{260}$  =0.45±0.04; coeficiente de extinción molar (referido al fósforo),  $\epsilon(P)$ =7750±500; potencia rotatoria  $[\alpha]_D^{20^\circ}$  =53°±6; hipercromicidad reversible, indicada como % en el ADN nativo, h=15±5; y una relación purina:pirimidina de 0,95±0,5.

En ciertas realizaciones, los lotes de muestra de defibrotida cuya potencia se va a evaluar mediante los métodos de la invención pueden haber estado sometidos a un estrés fisicoquímico o se sospecha que han estado expuestos a un estrés fisicoquímico, como alta temperatura, pH extremo, peróxido de hidrógeno, etc. Por tanto, los métodos de la invención también pueden usarse para evaluar la potencia de lotes de defibrotida o composiciones que comprenden defibrotida que se han almacenado en condiciones subóptimas o durante periodos de tiempo prolongados. En ciertas realizaciones, los métodos pueden usarse para monitorizar la estabilidad de lotes de defibrotida o composiciones que comprenden defibrotida, por ejemplo, para predecir la vida útil.

Los métodos de la invención comprenden el crecimiento de células de mamífero en cultivo. En ciertas realizaciones, las células de mamífero son células humanas. En algunas realizaciones, las células humanas son células epiteliales humanas. En otras realizaciones, las células humanas son células endoteliales humanas. En una realización particular, las células endoteliales humanas son células endoteliales sinusoidales hepáticas humanas, como las células SK-HEP-1. En otra realización particular, las células endoteliales humanas son células endoteliales microvasculares humanas, como las células HMEC-1. En otra realización particular, las células epiteliales son queratinocitos (por ejemplo, células HaCaT) o células epiteliales alveolares (por ejemplo, células A549). Las células de mamífero pueden obtenerse de depósitos reconocidos, como la American Type Culture Collection (ATCC), así como de otras fuentes. Los medios de crecimiento adecuados para cultivar células de mamífero en cultivo son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications" R. I. Freshney, 2010, Wiley-Blackwell. El medio óptimo para cada tipo de células puede obtenerse de proveedores especializados en células (por ejemplo: ATCC-LGC, MI, Italia; CDC, Atlanta, GA, USA). En ciertas realizaciones, las células de mamífero se cultivan en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2,5 µg/ml de anfotericina B. En otras realizaciones, las células de mamífero se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), 100 unidades/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomycin, y 2,5 µg/ml de Anfotericina B. En ciertas realizaciones, el medio de crecimiento puede contener L-glutamina (por ejemplo, 2 mM), hidrocortisona (por ejemplo, 10 µg/ml) y factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, 10 µg/ml).

La densidad de las células de mamífero puede ser de aproximadamente 5x10<sup>4</sup> células/ml a aproximadamente 5x10<sup>5</sup> células/ml, de aproximadamente 2,5x10<sup>4</sup> células/ml a aproximadamente 2,5x10<sup>5</sup> células/ml, o de aproximadamente 5 x10<sup>4</sup> células/ml a aproximadamente 2 x10<sup>5</sup> células/ml. Para obtener una respuesta óptima del ensayo, la densidad celular puede, en ciertas realizaciones, optimizarse teniendo en cuenta la naturaleza del agente citotóxico y el tipo de célula usada para el ensayo. Por ejemplo, en las realizaciones en las que se usan células endoteliales humanas para el ensayo, las densidades celulares particularmente adecuadas varían entre aproximadamente 2,5x10<sup>4</sup> células/ml y aproximadamente 2 x10<sup>5</sup> células/ml, preferiblemente aproximadamente 5x10<sup>4</sup> células/ml. Estas densidades celulares son especialmente adecuadas para ensayos en los que la doxorrubicina o la fludarabina son el agente citotóxico.

En otro aspecto de la invención, los métodos comprenden incubar las células de mamífero en cultivo con una solución que comprende un agente citotóxico y por lo menos una concentración de defibrotida del lote de muestras en evaluación. Como se usa en la presente, el término "agente citotóxico" se refiere a un compuesto que tiene un efecto tóxico sobre una célula, como inducir la necrosis celular, inhibir el crecimiento celular o la división celular, o inducir la apoptosis celular. La citotoxicidad de los compuestos puede ser el resultado de varias propiedades que incluyen, entre

otras, propiedades antimetabolito, propiedades alquilantes, propiedades de intercalación de ácidos nucleicos o propiedades apoptóticas. Una propiedad antimetabolito es la capacidad del compuesto, o de sus metabolitos, de interferir con la síntesis apropiada de biomoléculas, como el ADN y el ARN. Los ejemplos de compuestos con propiedades antimetabolito son los análogos de nucleobases (por ejemplo, análogos de purina y pirimidina), análogos de nucleósidos y nucleótidos, y compuestos antifolato. Los análogos de nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen efectos citotóxicos incluyen, entre otros, azatioprina, tiopurinas (por ejemplo tioguanina, mercaptopurina), fludarabina, pentostatina, 5-fluorouracilo, 6-azauracilo, clofarabina, nelarabina, cladribina, citarabina, floxuridina, capecitabina, gemcitabina, azacitidina y decitabina. Los ejemplos de antifolatos incluyen metotrexato, aminopterina, pemetrexed, pralatrexato y raltitrexed.

Una propiedad alquilante es la capacidad del compuesto, o de sus metabolitos, para transferir grupos alquilo a biomoléculas o formar enlaces covalentes con grupos reactivos dentro de biomoléculas (por ejemplo, grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y fosfato), lo que puede inactivar o interferir con su función biológica. Muchos agentes alquilantes pueden entrecruzar las cadenas de ADN, impidiendo la replicación del ADN, lo que puede llevar a la inducción de la apoptosis. Los ejemplos de agentes alquilantes son las mostazas nitrogenadas (por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida y busulfán), las nitrosoureas (por ejemplo, N-Nitroso-N-metilurea, carmustina, lomustina y semustina, fotemustina y estreptozotocina), tetrazinas (por ejemplo, dacarbazina, mitozolomida y temozolomida), aziridinas (por ejemplo, tiotepa, mitomicina y diaziquona) y cisplatinas (por ejemplo, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino).

Una propiedad intercalante del ácido nucleico es la capacidad del compuesto, o de sus metabolitos, de insertarse en la doble hélice del ADN, lo que puede provocar mutaciones, o intercalarse dentro de regiones de estructuras helicoidales de ARN. Los ejemplos de agentes intercalantes son el bromuro de etidio, la mitomicina, la actinomomicina, la plicamicina, las antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina y mitoxantrona), la talidomida y las bleomicinas.

Una propiedad apoptótica es la capacidad del compuesto, o de sus metabolitos, de inducir la muerte celular programada. Una clase particular de compuestos que pueden inducir la apoptosis son los agentes antimicrotúbulos, que interfieren con la mitosis y provocan la detención del ciclo celular, induciendo de este modo la apoptosis. Los agentes antimicrotúbulos incluyen alcaloides de vinca, como vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina y vinflunina, y taxanos, como paclitaxel y docetaxel.

Los inhibidores de la topoisomerasa también son citotóxicos por su capacidad para impedir la replicación y transcripción del ADN y/o por provocar roturas de la cadena de ADN, induciendo de este modo la apoptosis. Los inhibidores de la topoisomerasa incluyen, entre otros, irinotecán, topotecán, etopósido, doxorubicina, mitoxantrona y tenipósido.

El agente citotóxico usado en los métodos de la invención es generalmente un compuesto químico sintético, semisintético o natural. El compuesto puede tener una o más de las propiedades descritas anteriormente. El agente citotóxico puede ser cualquiera de los compuestos descritos en la presente o un metabolito del mismo. En algunas realizaciones, el agente citotóxico puede seleccionarse entre fludarabina, citarabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, busulfán, melfalán, cisplatino, bromuro de etidio, antraciclinas, talidomida o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente citotóxico usado en los métodos de la invención es fludarabina o su metabolito activo, 9-beta-D-arabinofuranosil-2-fluoroadenina (F-Ara-A).

Para su uso en los métodos de la presente invención son igualmente adecuados agentes citotóxicos alternativos comúnmente conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los agentes citotóxicos ralentizan o detienen la progresión del ciclo celular, y/o inducen la apoptosis de las células. Tales tipos de agentes citotóxicos incluyen estaurosporina, bendamustina, carmustina, imatinib y sales de los mismos (comercializados como Gleevec), Ara-C, gemtuzumab (como gemtuzumab ozogamicina, comercializado como Mylotarg), Azacitidine (comercializado como Vidaza), Decitabine (comercializado como Dacogen), Vorinostat (comercializado como Zolinza), y Thapsigargin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y Forbol Miristato Acetato. Ver también la lista NIOSH e antineoplásicos y otros fármacos peligrosos en entornos sanitarios 2012, HHS, Publicación N° 2012-150 (<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2012-150/pdfs/2012-150.pdf>).

La concentración del agente citotóxico usado en los métodos de la invención variará dependiendo del agente citotóxico particular y del tipo de célula de mamífero que se esté usando. En las realizaciones en las que el agente citotóxico es fludarabina o F-Ara-A, el agente está presente en el medio de crecimiento a una concentración final de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml.

Los agentes citotóxicos pueden usarse por separado o en combinación de 2, 3, 4, 5, 6 o más agentes. En ciertas realizaciones, la potencia de un único lote de muestras de defibrótida puede evaluarse evaluando independientemente su efecto de protección celular para dos agentes citotóxicos diferentes. A modo de ejemplo, un primer valor de potencia del lote de muestras de defibrótida puede obtenerse realizando el método con un primer agente citotóxico (por ejemplo, fludarabina) y un segundo valor de potencia puede obtenerse realizando el método con

un segundo agente citotóxico.

Puede determinarse una potencia global del lote de muestras de defibrotida mediante una comparación matemática del primer y el segundo valores de potencia, por ejemplo promediando los dos valores o calculando una relación de los dos valores.

En ciertas realizaciones, puede usarse un conjunto particular de condiciones de cultivo para inducir la citotoxicidad de las células de mamífero en lugar de emplear un agente o agentes citotóxicos específicos. Por ejemplo, los métodos pueden comprender exponer células de mamífero a un medio de cultivo inductor de apoptosis en presencia de por lo menos una concentración de defibrotida, determinar la viabilidad de las células después de un periodo de incubación y calcular la potencia de la defibrotida basándose en la medición de la viabilidad celular. Un medio de cultivo inductor de apoptosis puede incluir un medio que tenga un pH ácido (por ejemplo, un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 o de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5) o un pH básico (por ejemplo, un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5). El medio de cultivo inductor de apoptosis también incluye el medio que no contiene factores de crecimiento esenciales (por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas), ya que la retirada de factores de crecimiento se reconoce como un inductor de apoptosis. Como se usa en la presente, "medio inductor de apoptosis" también puede referirse a un medio a un intervalo de temperatura particular (por ejemplo, de más de 37° C) o a un intervalo de concentración de oxígeno (inferior al 5% de oxígeno) que induzca la apoptosis. El medio o las condiciones de cultivo inductoras de apoptosis pueden ajustarse fácilmente por un experto en la técnica para el tipo de célula de mamífero particular que se emplee en los métodos. Para inducir la apoptosis también puede usarse U.V. u otros tipos de radiación. En algunas realizaciones, la solución de incubación comprende por lo menos una concentración de defibrotida del lote de muestras evaluado, además del agente citotóxico. La concentración de defibrotida del lote de muestras (por ejemplo, la concentración final en el medio que contiene células) puede estar en el intervalo de entre aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 1mg/ml, entre aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 100 µg/ml, entre aproximadamente 1,25 µg/ml y aproximadamente 80 µg/ml, o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 50 µg/ml.

En ciertas realizaciones, se prueban múltiples concentraciones de defibrotida del lote de muestras. Por ejemplo, en una realización, se prueban por separado por lo menos dos concentraciones diferentes de defibrotida del lote de muestras. En otra realización, se prueban por separado por lo menos tres concentraciones diferentes de defibrotida del lote de muestras. En una realización particular, se prueban por separado por lo menos cuatro concentraciones diferentes de defibrotida del lote de muestras. Las concentraciones múltiples de defibrotida del lote de muestras están preferiblemente dentro de los intervalos divulgados anteriormente. En algunas realizaciones, las concentraciones múltiples de defibrotida del lote de muestras se preparan mediante diluciones sucesivas 1:2 de una solución madre.

En algunas realizaciones, el método comprende además probar un lote de defibrotida de referencia simultáneamente con el lote de muestras de defibrotida. El lote de defibrotida de referencia se prueba típicamente a varias concentraciones conocidas de defibrotida. En algunas realizaciones, pueden probarse múltiples concentraciones del lote de defibrotida de referencia. Al igual que con las concentraciones múltiples del lote de muestras de defibrotida, las concentraciones múltiples del lote de referencia de defibrotida pueden prepararse mediante dilución en serie de una solución madre de acuerdo con un factor de dilución predeterminado. Las concentraciones de defibrotida del lote de referencia se encuentran preferiblemente en el mismo intervalo de concentración que las concentraciones de defibrotida del lote de muestra. Por ejemplo, las concentraciones de defibrotida del lote de referencia (por ejemplo, la concentración final en el medio que contiene células) pueden ser de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 1mg/ml, de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 1,25 µg/ml a aproximadamente 80 µg/ml, o de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml.

En algunas realizaciones del método, se preparan por lo menos 4 concentraciones del lote de muestras de defibrotida y del lote de referencia de defibrotida con por lo menos 3 réplicas para cada concentración del lote de muestras y del lote de referencia.

En ciertas realizaciones, los métodos comprenden un control positivo de citotoxicidad. Por ejemplo, las células de mamífero se incuban con el agente citotóxico solo (es decir, sin defibrotida) en las mismas condiciones.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden un control negativo de citotoxicidad. Por ejemplo, en una realización, las células de mamífero se incuban en una solución sin defibrotida ni agente citotóxico en las mismas condiciones. Tales soluciones pueden contener el medio de crecimiento celular y, opcionalmente, cualquier vehículo o solvente.

En una realización particular, la incubación de las células de mamífero con el agente citotóxico con y sin defibrotida (lotes de referencia y de muestra, controles positivos y negativos) se realiza en una placa de microtitulación de múltiples pocillos (por ejemplo, de 96 pocillos). La determinación posterior de la viabilidad celular también puede

realizarse en la placa de microtitulación. En algunas realizaciones relacionadas, los pocillos de la placa de microtitulación están recubiertos con una matriz de fijación celular, como la poli-D-lisina. El periodo de incubación para obtener una respuesta aceptable del ensayo puede optimizarse, en relación con el agente citotóxico y el tipo de célula usados en el método. Un experto en la técnica puede ajustar estos parámetros basándose en los conocimientos generales comunes.

En ciertas realizaciones de los métodos, las células pueden incubarse con el agente citotóxico y defibrotida de los lotes de muestra y/o referencia durante un periodo que varía entre aproximadamente 12 y aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 24 y aproximadamente 96 horas, entre aproximadamente 48 y aproximadamente 72 horas, o entre aproximadamente 48 y aproximadamente 96 horas. En una realización, el periodo de incubación es de por lo menos 24 horas. En otra realización, el periodo de incubación es de por lo menos 48 horas. En otra realización, el periodo de incubación es de por lo menos 72 horas.

Las condiciones de incubación adecuadas para tipos específicos de células de mamíferos pueden encontrarse en manuales generales de laboratorio, como "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications" R. I. Freshney, 2010, Wiley-Blackwell. Los puntos de ajuste para la temperatura y el % de CO<sub>2</sub> durante el periodo de incubación son otras variables que pueden ajustarse para optimizar la respuesta del ensayo. De acuerdo con una realización de la presente invención, las células de mamífero se incuban a una temperatura comprendida entre aproximadamente 35° C y aproximadamente 39° C. En otra realización, las células de mamífero se incuban a una temperatura comprendida entre aproximadamente 36° C y aproximadamente 38° C. De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, las células de mamífero se incuban a una concentración de CO<sub>2</sub> que varía entre aproximadamente el 0 y aproximadamente el 10% (v/v) para mantener un pH óptimo del medio para el crecimiento celular. En otra realización, la concentración de CO<sub>2</sub> puede ser de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5%.

En otro aspecto de los métodos de la invención, la viabilidad de las células de mamífero se determina después de la incubación con el agente citotóxico y defibrotida a partir de un lote de muestra. Hay múltiples técnicas disponibles para evaluar la viabilidad celular (consultar, por ejemplo, Assay Guidance Manual, NCBI, 2013, G. Sitta Sittampalam et al. Eds., disponible en Internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>; Stoddart MJ., Cell viability assays: introduction; Methods Mol Biol. 2011;740:1-6 y Riss et al., ASSAY and Drug Development Technologies, Vol. 2(1): 51-62, 2004, y cualquier técnica específica descrita en la presente es únicamente ilustrativa. En algunas realizaciones, la viabilidad celular se evalúa usando kits disponibles comercialmente, como el Cell Counting Kit 8 (Dojindo Molecular Technology Inc.; Sigma-Aldrich) y los disponibles en Life Technologies (consultar <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/assays-for-cell-viability-proliferation-and-function.html>) y Thermo Scientific (consultar <http://www.piercenet.com/product/alamarblue-cell-viability-assay-reagent>).

Algunos métodos adecuados para determinar la viabilidad celular que pueden usarse con los métodos de la invención incluyen métodos de evaluación de la integridad de la membrana, ensayos que miden la reducción u oxidación, métodos que miden el contenido de ATP celular, ensayos de actividad mitocondrial y ensayos de caspasas. Los métodos para evaluar la integridad de la membrana (por ejemplo, ensayos de citólisis o fuga de membrana) incluyen métodos de exclusión de colorantes vitales, como los que utilizan azul tripán, yoduro de propidio, eritrosina B o 7-aminoactinomicina D, ensayos de lactosa deshidrogenasa y ensayos para biomarcadores de proteasa. Tales métodos generalmente implican medir la presencia de enzimas intracelulares en el medio extracelular (por ejemplo, lactosa deshidrogenasa) o la presencia de colorantes impermeables a la membrana intracelularmente como indicaciones de membranas celulares comprometidas.

Los ensayos basados en redox son típicamente métodos colorimétricos o fluorimétricos en los que ciertas clases de compuestos (colorantes/tintes) cambian de color o fluorescencia como resultado de reacciones bioquímicas llevadas a cabo por células vivas. Un ejemplo de este tipo de ensayos es el ensayo MTT, en el que las enzimas oxidoreductasas celulares reducen el colorante de tetrazolio MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro a su formazán insoluble, que tiene un color púrpura. Otros colorantes de tetrazolio estrechamente relacionados pueden usarse en ensayos similares para medir la viabilidad celular. Por tanto, en ciertas realizaciones de los métodos de la invención, la viabilidad celular se determina realizando un ensayo colorimétrico basado en la reducción de colorantes de tetrazolio. Los colorantes de tetrazolio adecuados incluyen bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), y sales de tetrazolio solubles en agua, como WST-1 y WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio). Tales técnicas son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," J Immunol Methods. 16 de diciembre de 1983; 65: 55-63.

Un ensayo similar basado en redox para determinar la viabilidad celular utiliza el colorante fluorescente resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido). La resazurina se reduce a resorufina fluorescente de color rojo intenso en células vivas y, por tanto, la viabilidad celular puede determinarse midiendo el aumento de fluorescencia en presencia del colorante.

La viabilidad celular también puede evaluarse midiendo los cambios en los procesos intracelulares, como los cambios en los radicales libres intracelulares (por ejemplo, especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico), la concentración de iones libres (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) y el potencial de membrana. En el mercado hay disponibles indicadores de fluorescencia para controlar y cuantificar estos cambios, como los reactivos fluorescentes de Life Technologies y Promega. Uno de tales ensayos implica el uso de calceína AM, que es un colorante permeable a las células que es un sustrato para las esterasas celulares. La actividad enzimática en células vivas convierte la calceína AM en un producto fluorescente, lo que permite determinar el número de células vivas por el aumento de la fluorescencia. La cuantificación del contenido de trifosfato de adenosina (ATP) también se ha usado como marcador de la viabilidad celular. El contenido celular de ATP puede medirse por la cantidad de luz producida a través de la reacción con la enzima luciferasa usando, por ejemplo, un luminómetro.

En algunas realizaciones, la viabilidad celular puede medirse manualmente, por ejemplo contando las células vivas con la ayuda de microscopios adecuados o mediante un equipo adecuado que evalúe el cambio de absorbancia/fluorescencia, seleccionado entre un espectrofotómetro, un espectrofluorímetro, un citómetro de flujo o una combinación de los mismos. Los expertos en la técnica conocen otras técnicas para evaluar la viabilidad celular y pueden adoptarlas para su uso con los métodos de la presente invención,

Dependiendo del ensayo usado para evaluar la viabilidad celular, la medición de la viabilidad celular puede ser un cambio en la absorbancia o fluorescencia de la solución o medio que contiene células, un porcentaje o número de células vivas, o un porcentaje o número de células muertas. En algunas realizaciones, un cambio en la absorbancia o fluorescencia puede convertirse en un porcentaje o número de células vivas o muertas. Por ejemplo, en las realizaciones en las que se produce un cambio de color o fluorescencia como resultado de un colorante o tinción que permea una membrana celular comprometida (por ejemplo, azul tripán, eritrosina B o yoduro de propidio), un aumento de la absorbancia o fluorescencia a una longitud de onda determinada indica un aumento del número de células muertas. En otras realizaciones en las que se produce un cambio de color o fluorescencia como resultado de una reacción celular (por ejemplo, ensayo MTT, ensayo calceína AM), el número de células vivas se correlaciona con un aumento de la absorbancia o fluorescencia a una longitud de onda particular. Por tanto, en ciertas realizaciones de los métodos de la invención, la viabilidad celular se determina midiendo la absorbancia o fluorescencia de la solución que contiene las células de mamífero después de la incubación con el agente citotóxico y defibrotida. En una realización, se mide la viabilidad celular (por ejemplo, absorbancia o fluorescencia) para cada concentración de defibrotida del lote de muestras (por ejemplo, absorbancia/fluorescencia de cada pocillo de la placa de microtitulación que contiene diferentes concentraciones de defibrotida del lote de muestras) y se representa gráficamente frente a la concentración correspondiente de defibrotida para crear una curva de respuesta a la dosis. En algunas realizaciones, la curva de respuesta a la dosis es una curva sigmoideal (es decir, "en forma de S"). El intervalo de concentraciones de defibrotida que se prueban puede ampliarse o puede añadirse un número adicional de concentraciones para obtener una curva sigmoideal de respuesta a la dosis.

Las lecturas de absorbancia o fluorescencia u otras mediciones de la viabilidad celular (por ejemplo, número o porcentaje de células vivas; por ejemplo, número o porcentaje de células muertas) de cada una de las muestras (por ejemplo, los controles positivo y negativo, el lote de referencia de defibrotida y el lote de muestras de defibrotida), conocidas como datos brutos, pueden procesarse y someterse a un análisis estadístico posterior. Para el análisis estadístico puede emplearse software dedicado, como el PLA 2 (Stegmann Systems GmbH, Alemania), diseñado especialmente para la evaluación de bioensayos, o alternativamente una hoja de cálculo comercial personalizada para la evaluación estadística de datos de ensayos biológicos.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención comprenden comparar la viabilidad celular medida para muestras que contienen el lote de muestras de defibrotida con la viabilidad celular medida para un lote de referencia de defibrotida. En algunas realizaciones, las mediciones de viabilidad celular para el lote de referencia de defibrotida se obtuvieron antes del análisis del lote de muestras de defibrotida. Tales mediciones previas para lotes de referencia de defibrotida pueden almacenarse en una base de datos de referencia o en un medio de almacenamiento legible por ordenador. En ciertas realizaciones, las mediciones de viabilidad celular para el lote de referencia representan una media de las mediciones de viabilidad celular obtenidas de una población de lotes de referencia de defibrotida. Por tanto, la potencia del lote de muestras de defibrotida puede calcularse basándose en las mediciones de viabilidad celular para el lote de muestras por comparación con una curva de calibración estándar obtenida de un análisis previo de un lote de referencia de defibrotida o de una población de lotes de defibrotida. En otras realizaciones, las mediciones de viabilidad celular para el lote de referencia de defibrotida se adquieren al mismo tiempo que las mediciones de viabilidad celular para el lote de muestras de defibrotida. Por ejemplo, una serie de concentraciones para el lote de muestras de defibrotida se ejecuta en paralelo con una serie de concentraciones para el lote de referencia de defibrotida.

El lote de referencia de defibrotida es preferiblemente un lote de defibrotida estandarizado que tiene una actividad biológica conocida (por ejemplo, actividad profibrinolítica, actividad de protección celular). Por ejemplo, en una realización particular, el lote de referencia de defibrotida tiene una actividad de protección celular de entre 630 - 905 unidades/mg. El lote de defibrotida normalizado puede tener una o más de las siguientes características: un peso

molecular medio de entre aproximadamente 14 y aproximadamente 19 kDa medido por SEC-HPLC, un coeficiente de extinción ( $\epsilon_{1\%}$ ) de aproximadamente 207-233, una relación de extinción ( $E_{min}/E_{max}$ ) de aproximadamente 0,41 - 0,49, una relación de purina a pirimidina de más de aproximadamente 0,80 (por ejemplo, de aproximadamente 0,80 a aproximadamente 1,50), un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon(P)$ , referido al fósforo) de aproximadamente 7200 a aproximadamente 8400, una potencia rotatoria ( $[\alpha]_D^{20^\circ}$ ) de aproximadamente  $45^\circ$  a aproximadamente  $60^\circ$ , y una hipercromicidad reversible, indicada como % en ADN nativo (h) de aproximadamente 8 a aproximadamente 22. En algunas realizaciones, el lote de referencia de defibrotida es un lote de defibrotida fabricado en condiciones GMP para uso clínico. En otras realizaciones, el lote de referencia de defibrotida es un lote comercial de defibrotida disponible en Gentium (Villa Guardia, Italia).

En algunas realizaciones, se adquieren mediciones de viabilidad celular para múltiples concentraciones de defibrotida del lote de referencia para crear una curva de calibración. En una realización, la creación de la curva de calibración comprende la adquisición de los datos de absorbancia relativos a las muestras a concentraciones crecientes conocidas de defibrotida del lote de referencia y el procesamiento estadístico de esos datos para obtener la curva de calibración, que representa la correlación entre el aumento de la viabilidad celular en presencia de un agente citotóxico y la dosis de defibrotida. En ciertas realizaciones, la viabilidad celular medida para el lote de muestras de defibrotida se compara con una curva de calibración obtenida a partir de mediciones de viabilidad celular con un lote de referencia de defibrotida para determinar la potencia del lote de muestras de defibrotida.

En algunas realizaciones, una curva de respuesta a la dosis obtenida a partir de mediciones de viabilidad celular del lote de muestras de defibrotida se compara con la curva de calibración obtenida a partir de mediciones de viabilidad celular con un lote de referencia de defibrotida. En tales realizaciones, la curva de respuesta a la dosis y la curva de calibración pueden ser curvas sigmoidales (consultar la Figura 7, por ejemplo). La diferencia entre las dos curvas es una función de la diferencia de actividad biológica entre el lote de muestras de defibrotida y el lote de referencia de defibrotida. Esta diferencia es la potencia del lote de muestras de defibrotida en comparación con el lote de referencia. En una realización, se usa un modelo de función logística de cuatro parámetros (4-PL, Farmacopea Europea, sección 5.3.2) para determinar la diferencia entre la curva de respuesta a la dosis del lote de muestras de defibrotida y la curva de calibración del lote de referencia de defibrotida para calcular la potencia del lote de muestras de defibrotida. En otra realización, se usa un modelo de función logística de cinco parámetros (5-PL, R.A. Dudley et al., "Guidelines for immunoassay data processing", Clin. Chem., 1985, 31: 1264-1271) para determinar la diferencia entre la curva de respuesta a la dosis del lote de muestras de defibrotida y la curva de calibración del lote de referencia de defibrotida para calcular la potencia del lote de muestras de defibrotida.

En algunas realizaciones, los datos obtenidos de las mediciones de viabilidad celular de las muestras con el lote de muestras de defibrotida pueden evaluarse para parámetros estadísticos adicionales para garantizar la validez de los datos. Por ejemplo, puede requerirse que los datos satisfagan ciertos criterios estadísticos, como los exigidos por las agencias reguladoras. Tales pruebas pueden incluir pruebas de linealidad, paralelismo y regresión lineal al nivel de significancia de, por ejemplo, 0,05, de tal manera que,  $F_{no-linealidad} < F_{critica}$ ,  $F_{no-paralelismo} < F_{critica}$ , y  $F_{Regresión} > F_{critica}$ , respectivamente, como se detalla en, por ejemplo, Farmacopea Europea, sección 5.3.2, 2014 y Farmacopea de Estados Unidos Capítulo (1034) Análisis de Ensayos Biológicos, 2014.

La potencia del lote de muestras de defibrotida calculada a partir de los métodos estadísticos anteriores puede expresarse como un porcentaje del lote de referencia de defibrotida, unidades de actividad de protección por peso de defibrotida u otras unidades que pueden o no ser arbitrarias. En algunas realizaciones, una unidad de protección de defibrotida es la concentración de defibrotida que media en la protección celular semimáxima de células SK-HEP-1 en presencia de 10  $\mu\text{g/ml}$  de fludarabina en las condiciones de ensayo dadas. En una realización, la potencia del lote de muestras de defibrotida se expresa como una relación de potencia relativa a la potencia del lote de referencia de defibrotida. En ciertas realizaciones, la relación de potencia para el lote de muestras de defibrotida se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Relación de potencia} = C_{ref}/C_{muest}$$

Donde, C son las concentraciones de materiales de defibrotida de referencia (ref) y de muestra (muest) necesarias para lograr el mismo efecto.

Los métodos de evaluación de la potencia de un lote de muestras de defibrotida como se describen en la presente pueden usarse en la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden defibrotida para ajustar la cantidad de defibrotida incluida en las composiciones para garantizar que las composiciones comprenden dosificaciones precisas y coherentes. Por tanto, los métodos de la invención pueden usarse durante el proceso de fabricación para evaluar la potencia de diferentes lotes de defibrotida preparados en diferentes lugares, por diferentes métodos o a partir de diferentes fuentes.

Los métodos de la invención también pueden usarse para monitorizar la estabilidad de lotes de defibrotida o composiciones farmacéuticas que comprenden defibrotida a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la potencia de un lote o composición puede determinarse mediante los métodos descritos en la presente periódicamente a lo largo del tiempo

(por ejemplo, mensualmente, semestralmente, anualmente) o después de la exposición a condiciones extremas para monitorizar la actividad de la defibrotida e identificar lotes o composiciones que se hayan deteriorado o degradado.

Estos y otros aspectos de la invención se ilustrarán mejor en los siguientes ejemplos, que, sin embargo, no deben considerarse limitativos de la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas.

## **EJEMPLOS**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

En los Ejemplos que se presentan a continuación se han usado los siguientes materiales.

#### **Aparatos**

Un lector de microplacas Victor 3 equipado con diferentes filtros de emisión y absorción (Perkin Elmer, Milán, Italia), operado por el software Wallac (Perkin Elmer, Milán, Italia).

Pipetas monocanal y multicanal con ajuste continuo de volumen equipadas con puntas estériles para biología molecular (Gilson, Milán, Italia). Incubador celular con control de temperatura y CO<sub>2</sub> (Thermo Fischer Scientific, Milán, Italia). Campanas de flujo laminar para cultivo de tejidos modelo HERAcell-150 (Thermo Fischer Scientific, Milán, Italia).

Balanza analítica AX 26 DR (Mettler, Milán, Italia).

Medidor de pH modelo 780 (Metrohm Italia, Milán, Italia).

Matraces de cultivo celular, 25 y 75 cm<sup>2</sup>, tapa de ventilación (Corning Incorporated, NY, USA).

Estériles, transparentes de 96 pocillos de poli-D-lisina recubiertos o sin recubrir (Sigma Aldrich, Milán, Italia).

Cámara de recuento de Neubauer y microscopio óptico (Carl Zeiss, Milán, Italia).

Unidad de esterilización por filtro de medio al vacío (Sigma Aldrich, Milán, Italia).

#### **Programas informáticos**

Microsoft Excel 2003. (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA)  
PLA 2 (Stegmann Systems GmbH, Alemania)

#### **Células**

Línea de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1, CDC, Atlanta, GA, USA)  
Línea de células endoteliales sinusoidales hepáticas (SK-HEP-1, ATCC, Manassas, VA, USA)

#### **Reactivos y productos químicos**

Defibrotida (Gentium, Italia)  
9-beta-D-arabinofuranosil-2-fluoroadenina, calidad analítica (Sigma Aldrich, Milán, Italia), denominada fludarabina o F-ara en las Figuras y Ejemplos siguientes  
Doxorrubicina, calidad analítica (Sigma Aldrich, Milán, Italia)  
Anfotericina B (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Gelatina, 2% en agua, grado cultivo de tejidos (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Etanol absoluto (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Penicilina-estreptomina 100X (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
MTT (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
CCK-8 (Sigma Aldrich, Milán, Italia)  
Azul tripán (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) Número ATCC: 30-2003 (ATCC Manassas, VA, USA)  
Oligonucleótido (ACGT)<sub>n</sub> de aproximadamente 17 Kda (Sigma Genosys, Milán, Italia)  
Oligonucleótido (AC)<sub>n</sub> de aproximadamente 17 KDa (Sigma Genosys, Milán, Italia)  
Glutación (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Activador tisular del plasminógeno humano (tPA) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)  
Agua de calidad para biología molecular (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)

**Preparación del medio de crecimiento celular para SK-HEP-1**

El medio de crecimiento celular para SK-HEP-1 fue el Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), 1x Penicilina-Estreptomicina y 1x Anfotericina B. De 500 ml de medio EMEM se extrajeron 65 ml y se añadieron 50 ml de FBS, 5 ml de un concentrado 100x de Penicilina-Estreptomicina madre y 10 ml de un concentrado 50x de Anfotericina B madre. El medio se esterilizó por filtración usando una unidad de esterilización por filtración del medio.

**Preparación del medio de crecimiento celular para HMEC-1**

El medio de crecimiento celular para HMEC-1 fue medio RPMI 1640 suplementado con un 10% (v/v) de FBS, 1x Penicilina-Estreptomicina y 1x Anfotericina B. De 500 ml de medio RPMI 1640 se extrajeron 65 ml y se añadieron 50 ml de FBS, 5 ml de un concentrado 100x de Penicilina-Estreptomicina madre y 10 ml de un concentrado 50x de Anfotericina B madre, 2 mM de L-glutamina, 10 µg/ml de hidrocortisona. El medio se esterilizó por filtración usando una unidad de esterilización de filtros de medio y se añadió factor de crecimiento epidérmico estéril a una concentración de 10 µg/ml.

**Cultivo y preparación de SK-HEP-1**

La línea de células endoteliales sinusoidales de hígado humano SK-HEP-1 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivó en medio EMEM completo en una incubadora celular humidificada que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C usando matraces de cultivo tisular recubiertos de gelatina. Las células se subcultivaron mediante desprendimiento mediado por tripsina cada 2-3 días siguiendo las instrucciones proporcionadas por la ATCC. Las células se transfirieron en serie a matraces de cultivo cuando el cultivo era confluyente en un 80-90 % y se usaron para el ensayo de protección entre los pases +3 a +10. Es decir, de 3 a 10 pases más allá del número de pase caracterizado de las células recibidas del ATCC.

Se preparó y contó una suspensión de SK-HEP-1 para su uso en el ensayo de protección celular. Las células se lavaron brevemente con D-PBS, se separaron con 1 ml de solución de tripsina y se volvieron a suspender en medio completo hasta alcanzar una concentración celular de 10<sup>5</sup>, 2x10<sup>5</sup> o 4x10<sup>5</sup> células/ml. Las células se contaron usando una cámara de recuento de Neubauer en presencia de azul tripán para evaluar el porcentaje de viabilidad de los cultivos. El cultivo celular usado en el ensayo de protección celular tenía una viabilidad ≥ 90%.

**Cultivo y preparación de HMEC-1**

Se obtuvo la línea celular endotelial microvascular humana (HMEC-1) de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) y se cultivó en medio RPMI 1640 completo en una incubadora celular humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. Las células se subcultivaron mediante desprendimiento mediado por tripsina cada 2-3 días y se transfirieron en serie a matraces de cultivo cuando el cultivo tenía una confluencia del 80-90% y se usaron para el ensayo de protección entre los pases +3 a +10.

Se preparó y contó una suspensión de HMEC-1 para usarla en el ensayo de protección celular. Las células se lavaron brevemente con D-PBS, se separaron con 1 ml de solución de tripsina y se volvieron a suspender en medio completo hasta alcanzar una concentración celular de 10<sup>5</sup>, 2x10<sup>5</sup> o 4x10<sup>5</sup> células/ml. Las células se contaron usando una cámara de recuento de Neubauer en presencia de azul tripán para evaluar el porcentaje de viabilidad de los cultivos. El cultivo celular usado en el ensayo de protección celular tenía una viabilidad ≥ 90%.

**Preparación de soluciones madre****1. Fludarabina**

Se disolvió un vial de 10 mg de Fludarabina en 1 ml de DMSO para obtener una solución de 10 mg/ml y se almacenó a 4° C. La solución madre se diluyó 1:1 con medio de crecimiento completo para obtener la solución madre de trabajo de 5 mg/ml.

**2. Defibrotida**

La solución madre de defibrotida se preparó el día de su uso. Se pesaron con precisión aproximadamente 100 mg de defibrotida en un tubo estéril de 50 ml y se disolvieron en 20 ml de D-PBS para obtener una solución de 5 mg/ml. Esta solución se diluyó 1:10 con medio de crecimiento completo para obtener la solución madre de trabajo de 0,5 mg/ml usada para producir las series de dilución de concentración.

**3. Activador tisular del plasminógeno (tPA)**

Se disolvió el contenido de dos viales de 10 µg de t-PA (aproximadamente 400.000 UI/mg por vial) en 2 ml

de D-PBS para obtener una solución de 4.000 UI/ml y se almacenó a -80° C.

#### 4. Oligonucleótido ACGT,

Se disolvió un vial de 1 mg de oligonucleótido ACGT en 2 ml de D-PBS para obtener una solución de 0,5 mg/ml y se almacenó a 4° C.

#### 5. Glutatión

Se disolvieron 100 mg de glutatión en 20 ml de PBS? y se diluyeron 1:10 con medio de crecimiento completo hasta alcanzar una concentración final de 0,5 mg/ml.

#### 6. Doxorrubicina

Se disolvió un vial de 10 mg de doxorrubicina en 10 ml de DMSO y se almacenó a - 80° C. Se preparó una solución madre de trabajo por dilución en medio completo hasta 200 µg /ml.

### Depósitos de placas

En los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta de poli-D-lisina se colocaron cincuenta µl de las suspensiones celulares, o de medio solo para muestras en blanco, preparadas a las concentraciones descritas anteriormente. Las placas se colocaron en la incubadora de células durante 3 horas, tras lo cual se añadieron 50 µl de la solución de desafío a los pocillos que contenían células. Se usaron tres o cuatro pocillos replicados para cada condición experimental. Por ejemplo, en la Tabla 1 se indica la preparación de soluciones que contienen fludarabina en ausencia o presencia de defibrotida. Tras la adición de la solución a los pocillos, las placas se volvieron a colocar en la incubadora y se evaluó la viabilidad celular a las 24, 48 o 72 horas. Para una medición de fondo, se incluyeron 100 µl de medio completo solo en 3 a 4 pocillos replicados.

**Tabla 1. Preparación de las soluciones de fludarabina y defibrotida**

| Tipo de muestra          | Defibrotida (*) (µg/ml) | Medio (µl) | Solución madre de fludarabina (µl) | Solución madre de defibrotida (µl) |
|--------------------------|-------------------------|------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Control negativo         | 0                       | 3486       | 14                                 | 0                                  |
| Defibrotida Muestra 1:1  | 1.25                    | 3468.5     | 14                                 | 17.5                               |
| Defibrotida Muestra 1:2  | 2.5                     | 3451       | 14                                 | 35                                 |
| Defibrotida Muestra 1:4  | 5                       | 3416       | 14                                 | 70                                 |
| Defibrotida Muestra 1:8  | 10                      | 3346       | 14                                 | 140                                |
| Defibrotida Muestra 1:16 | 20                      | 3206       | 14                                 | 280                                |
| Defibrotida Muestra 1:32 | 40                      | 2926       | 14                                 | 560                                |
| Defibrotida Muestra 1:64 | 80                      | 2366       | 14                                 | 1120                               |
| En blanco                | 0                       | 3500       | 0                                  | 0                                  |

(\*) Concentración final en cada pocillo tras la adición de 50 µl de suspensión celular y 50 µl de la solución indicada.

### Viabilidad celular usando el ensayo MTT

Después del periodo de incubación especificado, se midió la viabilidad celular en cada pocillo mediante el ensayo MTT. El ensayo MTT se basa en la escisión de las sales de tetrazolio por la deshidrogenasa mitocondrial en células viables, lo que lleva a la producción de un colorante formazán insoluble. Se añadió colorante MTT, 10 µl de una solución de 2 mg/ml en D-PBS, a cada pocillo y luego se incubaron las placas durante 3 horas. A continuación, se centrifugaron las placas y se aspiró cada pocillo. El colorante se solubilizó con 200 µl de una mezcla DMSO/Etanol (1:1) y la absorbancia en los pocillos se leyó a 570-590 nm en un lector de microplacas. En todos los experimentos se usó como control un pocillo de muestra en blanco que sólo contenía medio y fármaco citotóxico (fludarabina o doxorrubicina).

### Viabilidad celular usando el ensayo CCK-8

Después del periodo de incubación especificado, se midió la viabilidad celular en cada pocillo usando el kit de recuento celular CCK-8 (Sigma Aldrich, Milán, Italia) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en la reducción por la actividad deshidrogenasa de las células viables de la sal de tetrazolio soluble en agua WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio). El colorante formazán reducido es soluble en los medios de cultivo de tejidos. La cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células viables. La sensibilidad de detección del CCK-8 es mayor que la de otras sales de tetrazolio como el MTT. A diferencia del MTT, no se requiere ningún paso de solubilización, por lo que el ensayo puede medirse de forma continua. Brevemente, tras el tiempo de incubación especificado, se añadieron 10 µl del reactivo suministrado a cada pocillo de

la placa de microtitulación y se volvió a colocar la placa en la incubadora. Después de 3 horas, se midió la absorbancia a 450 nm con una corrección de fondo a 590 nm. La absorbancia de la muestra en blanco del medio se restó de las muestras de ensayo.

## 5 Ejemplo 1

El presente ejemplo muestra la magnitud del efecto protector de la defibrotida frente a la citotoxicidad inducida por fludarabina de las células HMEC-1 a concentraciones fisiológicamente relevantes de fludarabina y defibrotida.

10 Las células HMEC-1 se cultivaron de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Para el ensayo se usó una densidad celular de 500.000 células/ml. El agente citotóxico fue fludarabina a una concentración de 10 µg/ml. Se añadió defibrotida al pocillo de la microplaca a una concentración de 100, 10 o 1 µg/ml. Se realizaron cuatro réplicas de cada condición. La viabilidad de las células HMEC se evaluó después de 72 horas con el ensayo MTT descrito anteriormente. La defibrotida protegió a las células de la citotoxicidad inducida por la fludarabina de  
15 manera dependiente de la dosis, observándose un efecto protector de más del 50% con 100 µg/ml de defibrotida (Figura 1).

## Ejemplo 2

20 El presente ejemplo muestra la magnitud del efecto protector de la defibrotida contra la citotoxicidad inducida por la doxorrubicina en las células SK-HEP-1 a concentraciones fisiológicamente relevantes de doxorrubicina y defibrotida.

25 Las células SK-HEP-1 se cultivaron siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Para el experimento se usó una densidad celular de aproximadamente 50.000 células/ml. El agente citotóxico fue doxorrubicina a una concentración de 0,1 µg/ml. Se añadió defibrotida al pocillo de la microplaca a una concentración de 100, 50, 20, 10, 5 o 1 µg/ml. Se realizaron tres réplicas de cada condición. La viabilidad se evaluó después de 72 horas con el kit de ensayo CCK-8, como se ha descrito anteriormente. A concentraciones de 50 µg/ml o superiores, la defibrotida protegió significativamente a las células SK-HEP-1 de la citotoxicidad inducida por la doxorrubicina. (Figura  
30 2).

## Ejemplo 3

35 El presente ejemplo compara la eficacia protectora frente a la citotoxicidad inducida por fludarabina del defibrotide y de oligonucleótidos sintéticos de longitud media y composición de bases similares al defibrotide.

Se cultivaron células HMEC-1 de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Para el experimento se usó una densidad celular de aproximadamente 500.000 células/ml. El agente citotóxico fue fludarabina a una concentración de 50 µg/ml. Se añadieron oligonucleótidos sintéticos (Adenina-Citosina (AC) de  
40 aproximadamente 16 kDa o Adenina-Citosina-Guanina-Timeína (ACGT) de aproximadamente 17 kDa) o defibrotida a cada pocillo a concentraciones variables. Específicamente, los oligonucleótidos AC se añadieron a cada pocillo a una concentración de 1, 10, 100 o 500, mientras que los oligonucleótidos ACGT se añadieron a cada pocillo a una concentración de 12,5, 25 o 50 µg/ml. La defibrotida se añadió a cada pocillo a una concentración de 5, 25, 50 o 100 µg/ml. Cada condición de tratamiento se realizó por triplicado. La viabilidad se evaluó con el ensayo MTT después de  
45 24, 48 y 72 horas.

Como se muestra en las Figuras 3A y 3B, ni los oligonucleótidos AC ni los oligonucleótidos ACGT tuvieron ningún efecto protector contra la citotoxicidad inducida por fludarabina de las células HMEC-1 después de 72 horas de incubación. Por el contrario, la defibrotida mostró una protección dependiente de la dosis de las células frente a la citotoxicidad inducida por fludarabina (Figura 3C).  
50

## Ejemplo 4

55 Los experimentos descritos en este ejemplo probaron la capacidad de un oligonucleótido ACGT sintético, tPA y glutatión para proteger a las células SK-HEP-1 de la toxicidad inducida por fludarabina.

Las células SK-HEP-1 se cultivaron y expandieron de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Para el experimento se usó una densidad celular de aproximadamente 50.000 células/ml. El agente citotóxico fue fludarabina a una concentración de 10 µg/ml. Se añadió a cada pocillo un oligonucleótido sintético  
60 aleatorio (ACGT), tPA o glutatión a concentraciones variables. Específicamente, se añadieron a cada pocillo el oligonucleótido ACGT o el glutatión a una concentración de 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 u 80 µg/ml, mientras que el tPA se añadió a una concentración de 10, 20, 40, 80, 160 o 320 UI/ml. Cada condición de tratamiento se realizó por triplicado. La viabilidad se evaluó con el kit de ensayo CCK-8 después de 72 horas de incubación. No se observó protección de las células SK-HEP-1 frente a la citotoxicidad inducida por fludarabina con ninguno de los tres compuestos (Figura 4).  
65

**Ejemplo 5**

El presente ejemplo evalúa la eficacia protectora frente a la citotoxicidad inducida por fludarabina de la defibrotida que ha sido modificada como resultado del estrés fisicoquímico.

Las muestras de defibrotida se sometieron a estrés sometiendo una muestra estándar de defibrotida a 1) estrés ácido o 2) estrés básico. El estrés ácido consistió en incubar la muestra estándar de defibrotida en un tampón fosfato con un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 80° C durante 18 horas. El estrés básico consistió en incubar la muestra de defibrotida estándar en un tampón fosfato con un pH de aproximadamente 12 a aproximadamente 80° C durante 18 horas. Después del período de incubación, las soluciones se llevaron a la neutralidad con ácido fosfórico o hidróxido de sodio.

Las células SK-HEP-1 se cultivaron de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Para el experimento se usó una densidad celular de aproximadamente 50.000 células/ml. El agente citotóxico fue fludarabina a una concentración de 10 µg/ml. En cada pocillo se añadió defibrotida estándar (sin modificar), defibrotida sometida a estrés ácido o defibrotida sometida a estrés básico a una concentración de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 o 1,25 µg/ml. Cada condición de tratamiento se realizó por triplicado. La viabilidad de las células se evaluó con el kit de ensayo CCK-8 después de 72 horas de incubación. Se construyeron curvas de respuesta a la dosis para la defibrotida no modificada, la defibrotida con estrés ácido y la defibrotida con estrés básico. En la Figura 5 se muestra una comparación de las curvas de respuesta a la dosis. Tanto las muestras de defibrotida sometidas a estrés ácido como las sometidas a estrés básico fueron menos potentes que la defibrotida sin modificar a la hora de proteger a las células SK-HEP-1 de la citotoxicidad inducida por la fludarabina (Figura 5).

**Ejemplo 6**

El presente ejemplo muestra la magnitud del efecto protector de la defibrotida frente a la citotoxicidad inducida por fludarabina en células SK-HEP-1 a concentraciones fisiológicamente relevantes de defibrotida y fludarabina.

Las células SK-HEP-1 se cultivaron y expandieron de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Las células, a una densidad celular de aproximadamente 50.000 células/ml, se sembraron en una microplaca de 96 pocillos recubierta de poli-D-lisina. El agente citotóxico fue fludarabina a una concentración de 10 µg/ml. Se añadió defibrotida a cada pocillo a una concentración de 100, 50, 40, 20, 10, 5 o 1 µg/ml. Cada condición de tratamiento se realizó en 4 pocillos replicados. La viabilidad se evaluó después de 72 horas de incubación con el kit de ensayo CCK-8. La defibrotida produjo un efecto de protección celular dependiente de la dosis frente a la citotoxicidad inducida por fludarabina, con más del 80% de las células supervivientes con concentraciones de defibrotida de 40 µg/ml o mayores (Figura 6).

**Ejemplo 7**

El presente ejemplo muestra la aplicación del ensayo de protección celular para la evaluación de la potencia de una muestra de defibrotida de actividad biológica desconocida.

Las células SK-HEP-1 se cultivaron y expandieron de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Las células se sembraron en placas a una densidad celular de aproximadamente 50.000 células/ml en microplacas recubiertas de poli-D-lisina. El agente citotóxico fue fludarabina a una concentración de 10 µg/ml. El estándar de referencia de defibrotida y la muestra de prueba de defibrotida se añadieron a pocillos separados a una concentración de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 o 1,25 µg/ml. Se realizaron cuatro réplicas de pocillos para cada condición de tratamiento. La viabilidad de las células se evaluó con el kit de ensayo CCK-8 después de 72 horas de incubación.

Las absorbancias medidas para las muestras estándar de referencia de defibrotida y las muestras de prueba de defibrotida se sometieron a un análisis de función logística de 4 parámetros. Es decir, la respuesta a la dosis de las curvas de defibrotida de referencia y de muestra puede describirse mediante una función logística de 4 parámetros:

$$v = \delta + \frac{\alpha - \beta}{1 + e^{-\beta(x - \gamma)}}$$

Donde,  $v$  es la respuesta,  $\alpha$  es la asíntota superior,  $\delta$  es la asíntota inferior,  $\beta$  es el factor de pendiente, y  $\gamma$  es la ubicación horizontal de la curva de la muestra en el eje  $x$ . La potencia de la muestra de prueba de defibrotida se determinó calculando una relación de potencia frente al patrón de referencia de defibrotida. La relación de potencia de la muestra de prueba de defibrotida fue de 1,157 (Figura 7).

**Ejemplo 8**

El presente ejemplo evalúa la precisión de las determinaciones de la potencia de defibrotida del ensayo de protección basado en células. Se midió la potencia de la misma muestra de prueba de defibrotida, frente a un estándar de referencia de defibrotida, en ensayos repetidos por diferentes analistas, usando diferentes lotes de medio cualificado, lotes de células y dispositivos de pipeteo.

Las células SK-HEP-1 se cultivaron y expandieron de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Las células se sembraron en placas a una densidad celular de aproximadamente 50.000 células/ml en microplacas recubiertas de poli-D-lisina. El agente citotóxico fue fludarabina a una concentración de 10 µg/ml. El estándar de referencia de defibrotida y la muestra de prueba de defibrotida se añadieron a pocillos separados en la misma serie de concentraciones descritas en el Ejemplo 7. Se realizaron cuatro pocillos replicados para cada condición experimental. La viabilidad de las células se evaluó con el kit de ensayo CCK-8 después de 72 horas de incubación.

Las absorbancias medidas para cada pocillo en cada serie de ensayo se sometieron a un análisis de función logística de 4 parámetros y se calculó la relación de potencia frente al estándar de referencia de defibrotida, como se describe en el Ejemplo 7. En la Tabla 2 se muestra la relación de potencia de la misma muestra de prueba de defibrotida en cada serie del ensayo. De las mediciones de potencia realizadas por diferentes analistas en las condiciones variables que se muestran en la Tabla 2, el ensayo tiene una alta precisión (% de desviación estándar relativa de 7,8) y un bajo sesgo de < 3 %.

**Tabla 2. La precisión del ensayo se demuestra analizando la misma muestra de prueba, frente al estándar de defibrotida, en diferentes series de ensayo, en diferentes días y células de un número de pases diferente.**

| Serie de ensayo | Día | Analista | Número de pase celular | Conjunto de dispositivo de pipeteo | Potencia medida |
|-----------------|-----|----------|------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 1               | 1   | 1        | 1                      | #1                                 | 0.901           |
| 2               | 2   | 1        | 1                      | #2                                 | 0.998           |
| 3               | 2   | 1        | 2                      | #1                                 | 0.937           |
| 4               | 2   | 1        | 1                      | #1                                 | 1.087           |
| 5               | 2   | 1        | 2                      | #2                                 | 1.011           |
| 6               | 3   | 2        | 1                      | #1                                 | 1.057           |
| 7               | 3   | 2        | 2                      | #1                                 | 1.068           |
| 8               | 3   | 1        | 2                      | #1                                 | 0.944           |
| 9               | 4   | 2        | 1                      | #1                                 | 0.971           |
| 10              | 4   | 2        | 2                      | #1                                 | 1.11            |
| 11              | 5   | 2        | 1                      | #2                                 | 1.135           |
| 12              | 5   | 2        | 2                      | #2                                 | 1.13            |

**Ejemplo 9**

El presente ejemplo muestra una comparación de la potencia determinada por el ensayo de protección celular para tres lotes diferentes de defibrotida y un estándar de referencia de defibrotida. Las células SK-HEP-1 se cultivaron y expandieron de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Las células se sembraron a una densidad celular de aproximadamente 50.000 células/ml en microplacas recubiertas de poli-D-lisina. El agente citotóxico fue fludarabina a una concentración de 10 µg/ml. El estándar de referencia de defibrotida y las diferentes muestras de ensayo de defibrotida de tres lotes separados se añadieron a pocillos separados a una concentración de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 o 1,25 µg/ml. Se realizaron cuatro réplicas de pocillos para cada condición experimental. La viabilidad de las células se evaluó con el kit de ensayo CCK-8 tras 72 horas de incubación.

Las absorbancias medidas para cada pocillo se sometieron a un análisis de función logística de 4 parámetros y se calculó la relación de potencia para cada lote de defibrotida, como se describe en el Ejemplo 7. En la Tabla 3 se muestra la relación de potencia relativa al estándar de defibrotida de cada una de las muestras de prueba de defibrotida de los tres lotes.

**Tabla 3 Relaciones de potencia de tres lotes diferentes de defibrotida analizados con respecto a un estándar de referencia de defibrotida.**

| Lote de defibrotida | Pruebas de linealidad, regresión y paralelismo | Intervalo de confianza del 95% | Potencia |
|---------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|----------|
| 1080030021          | Aprobado                                       | 0.823-0.989                    | 0.902    |
| 1080060117          | Aprobado                                       | 0.697-0.889                    | 0.787    |
| 1080010016          | Aprobado                                       | 1.116-1.725                    | 1.387    |

- 5 Se entiende que la invención divulgada no se limita a la metodología, protocolos y materiales particulares descritos, ya que éstos pueden variar. También se entiende que la terminología usada en la presente tiene el propósito describir únicamente realizaciones particulares y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de medición de la actividad biológica de un lote de muestras de defibrotida que comprende:

- 5            crecer células de mamífero en cultivo;  
               incubar las células con una solución que contenga por lo menos un agente citotóxico y por lo menos una  
               concentración de defibrotida del lote de muestras;  
               determinar la viabilidad de las células después de un periodo de incubación; comparar la viabilidad celular con la  
               viabilidad celular para un lote de referencia de defibrotida y  
 10            calcular la actividad biológica del lote de muestras de defibrotida basándose en la comparación;  
               en donde dicho por lo menos un agente citotóxico tiene propiedades antimetabólicas, alquilantes, intercalantes  
               de ácidos nucleicos o apoptóticas.
- 15            2. El método de la reivindicación 1, en el que las células se incuban con el agente citotóxico y por lo menos cuatro  
               concentraciones diferentes de defibrotida del lote de muestras, y en donde se determina la viabilidad celular para cada  
               una de las concentraciones para crear una curva de respuesta a la dosis.
- 20            3. El método de la reivindicación 1, en el que la viabilidad celular medida para el lote de muestras de defibrotida se  
               compara con una curva de calibración obtenida a partir de mediciones de viabilidad celular con el lote de referencia  
               de defibrotida.
- 25            4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cálculo de la actividad biológica del lote de  
               muestras de defibrotida comprende determinar una relación de actividad biológica con respecto a la actividad biológica  
               de un lote de referencia de defibrotida.
- 30            5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente citotóxico que tiene propiedad  
               antimetabolito se selecciona de:  
               i) análogos de nucleobases, análogos de nucleósidos y nucleótidos, preferiblemente azatioprina, tiopurinas,  
               preferiblemente tioguanina y mercaptopurina, fludarabina, pentostatina, 5-fluorouracilo, 6-azauracilo, clofarabina,  
               nelarabina, cladribina, citarabina, floxuridina, capecitabina, gemcitabina, azacitidina y decitabina; o  
               ii) compuestos antifolato, preferiblemente metotrexato, aminopterina, pemetrexed, pralatrexato y raltitrexed.
- 35            6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente citotóxico con propiedad alquilante se  
               selecciona de:  
               i) mostazas nitrogenadas, preferiblemente mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida o  
               busulfán;  
               ii) nitrosoureas, preferiblemente N-Nitroso-N-metilurea, carmustina, lomustina, semustina, fotemustina o  
               estreptozotocina;  
               iii) tetrazinas, preferiblemente dacarbazina, mitozolomida o temozolomida;  
               iv) aziridinas, preferiblemente tiotepa, mitomicina o diaziquona; o  
               v) cisplatinas, preferiblemente cisplatino, carboplatino u oxaliplatino.
- 40            7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente citotóxico con propiedad intercalante de  
               ácidos nucleicos se selecciona de: bromuro de etidio, mitomicina, actinomicina, plicamicina, antraciclinas,  
               preferiblemente, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina o mitoxantrona, talidomida y bleomicinas.
- 45            8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente citotóxico que tiene propiedades  
               apoptóticas es:  
               i) un agente antimicrotúbulos, preferiblemente alcaloides de la vinca, preferiblemente vincristina, vinblastina,  
               vinorelbina, vindesina y vinflunina o taxanos, preferiblemente paclitaxel y docetaxel; o  
               ii) un inhibidor de la topoisomerasa, preferiblemente irinotecán, topotecán, etopósido y tenipósido
- 50            9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las células de mamífero son células endoteliales  
               humanas, células epiteliales humanas, células endoteliales sinusoidales hepáticas humanas o células endoteliales  
               microvasculares humanas.
- 55            10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células de mamífero están presentes a una  
               densidad de aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/ml a aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/ml.
- 60            11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la por lo menos una concentración de defibrotida  
               del lote de muestras está en el intervalo de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml.
- 65

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el periodo de incubación es de por lo menos 24 horas, por lo menos 48 horas o por lo menos 72 horas.
- 5 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la determinación de la viabilidad celular comprende la realización de un ensayo colorimétrico basado en la reducción de colorantes de tetrazolio.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el colorante de tetrazolio es bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio.
- 10 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la determinación de la viabilidad celular comprende medir la absorbancia de la solución tras la incubación con las células.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el lote de muestras de defibrotida se extrae de tejido bovino o tejido porcino.
- 15 17. Un método para preparar una composición farmacéutica que comprende defibrotida, en donde el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 se usa para medir la actividad biológica de la defibrotida para:
- 20 a) ajustar la cantidad de defibrotida incluida en las composiciones para asegurar que las composiciones comprenden dosificaciones precisas y consistentes; y/o
- b) medir la actividad biológica de diferentes lotes de defibrotida preparados en diferentes ubicaciones, por diferentes métodos o a partir de diferentes fuentes.
- 25 18. Un método para monitorizar la estabilidad de lotes de defibrotida o composiciones farmacéuticas que comprenden defibrotida, en donde el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 se usa para medir la actividad biológica de la defibrotida en el lote o composición a lo largo del tiempo; opcionalmente en donde, la actividad biológica de la defibrotida se mide: mensualmente, semestralmente, anualmente, tras la exposición a condiciones extremas para monitorizar la actividad de la defibrotida, o para identificar lotes o composiciones que se han deteriorado o degradado.

FIGURA 1

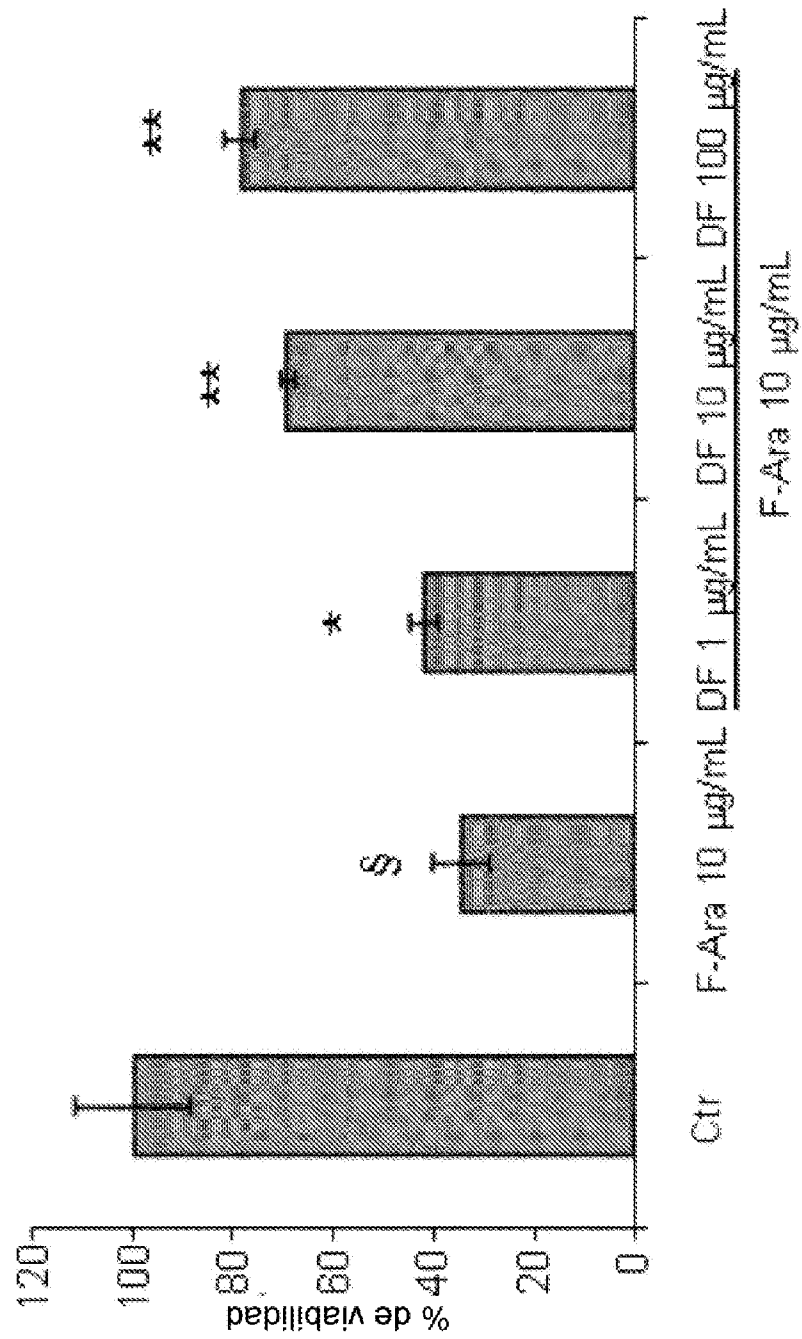


FIGURA 2

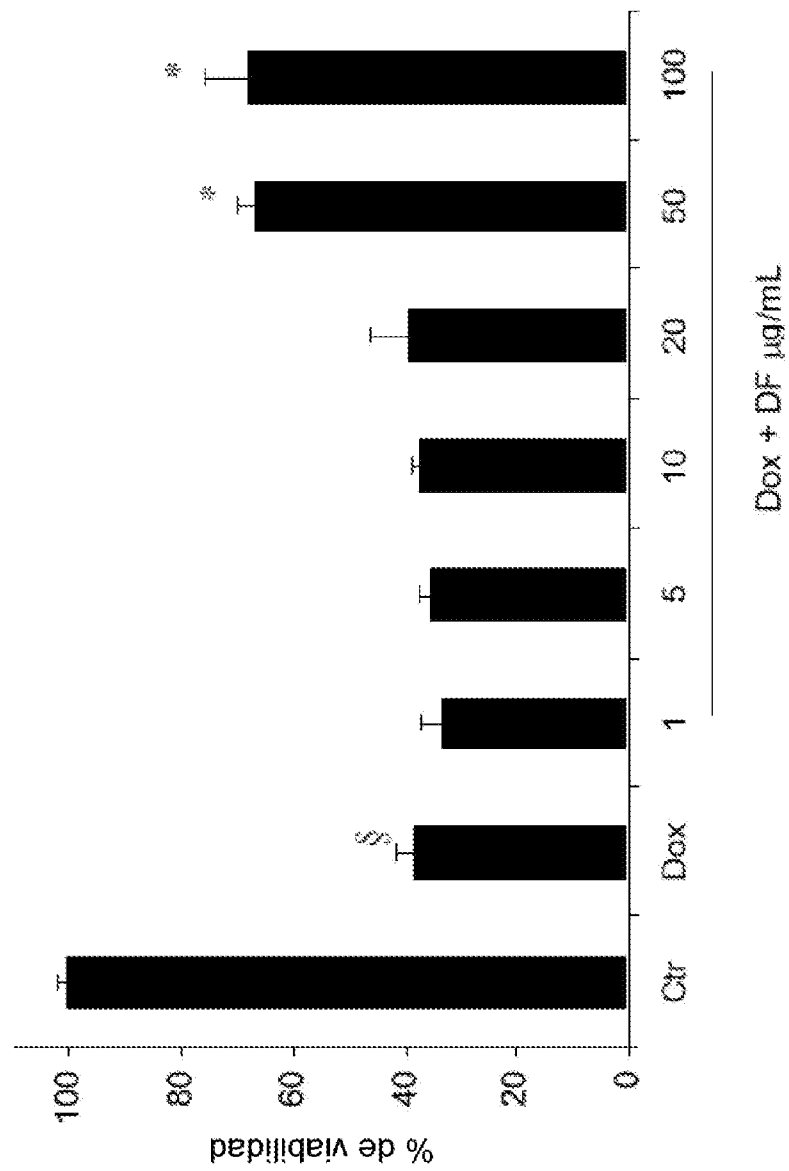


FIGURA 3A

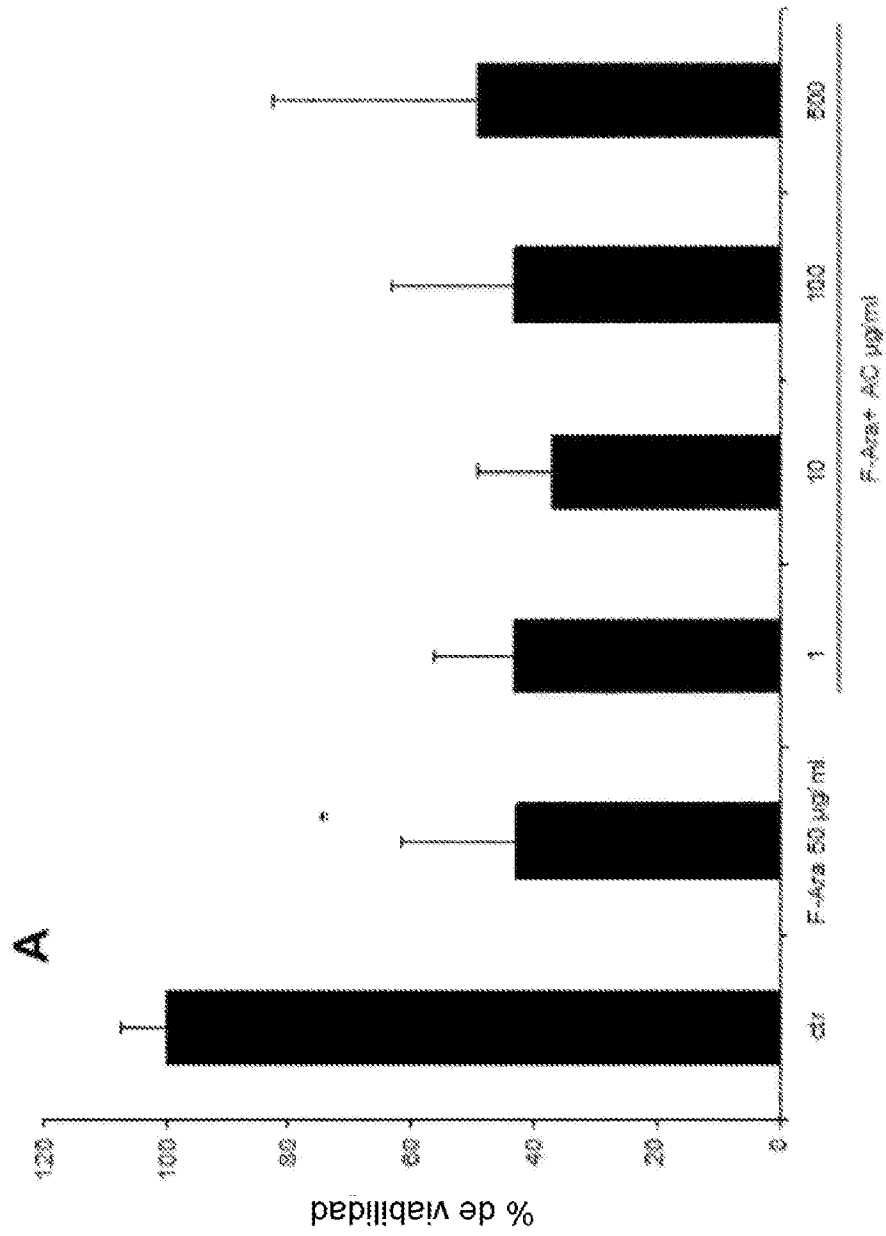


FIGURA 3B

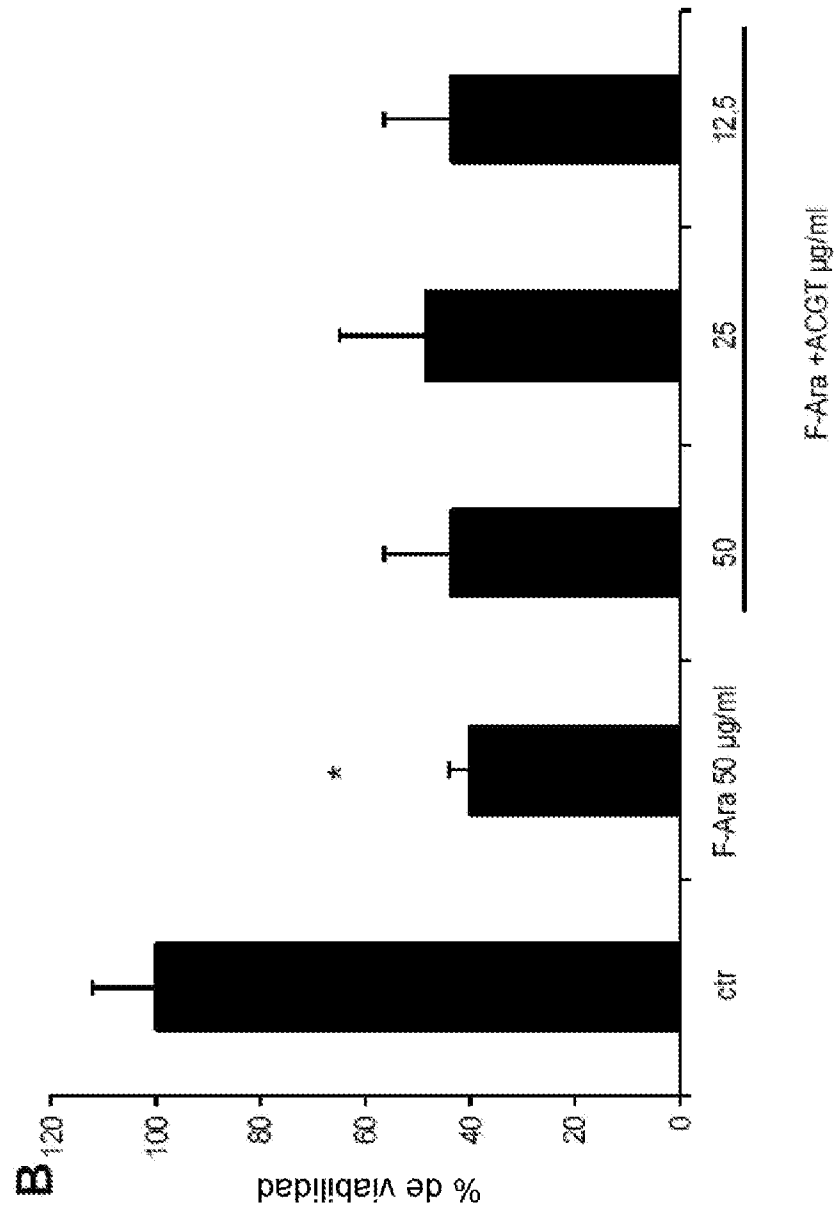


FIGURA 3C

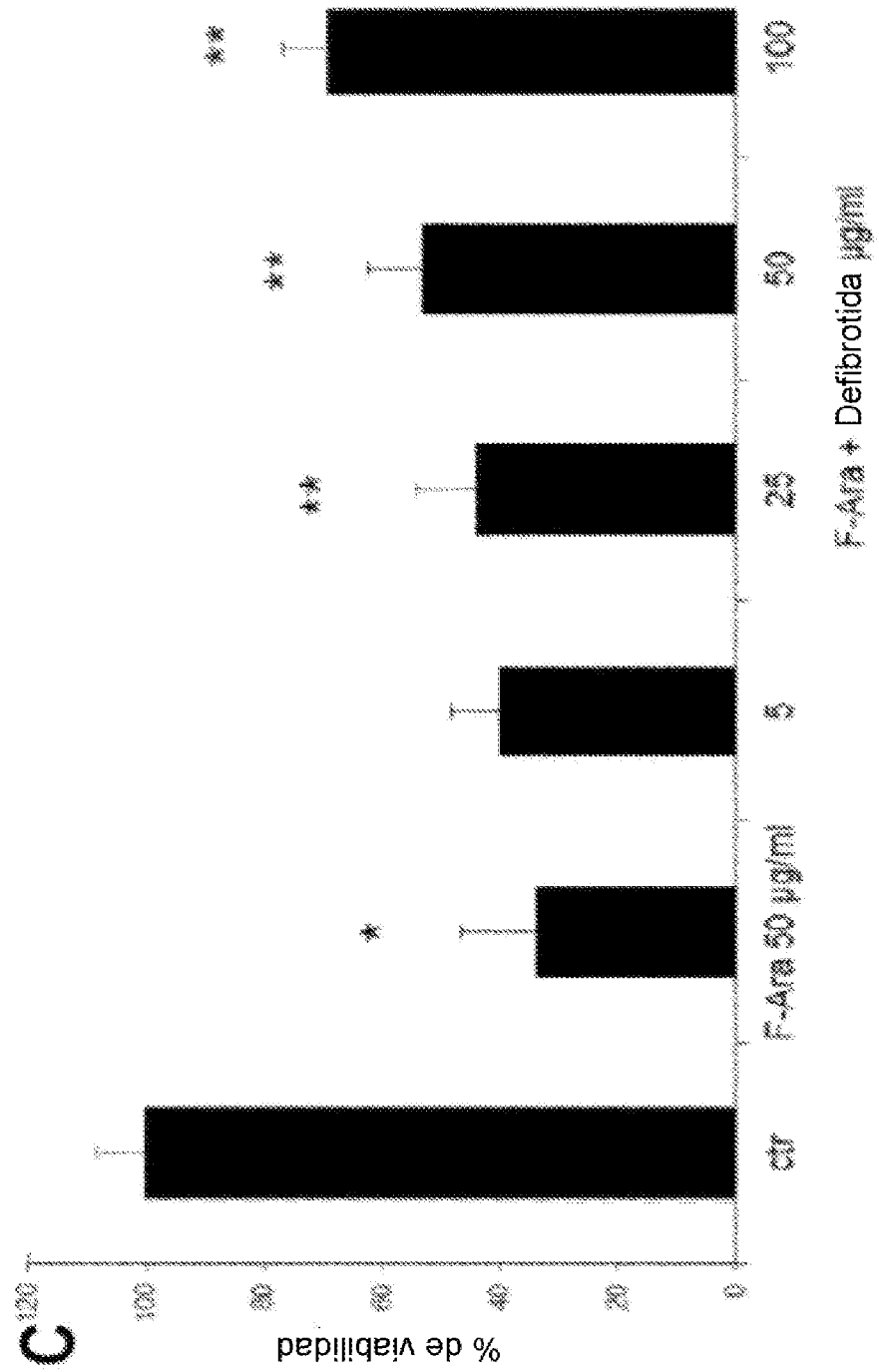


FIGURA 4

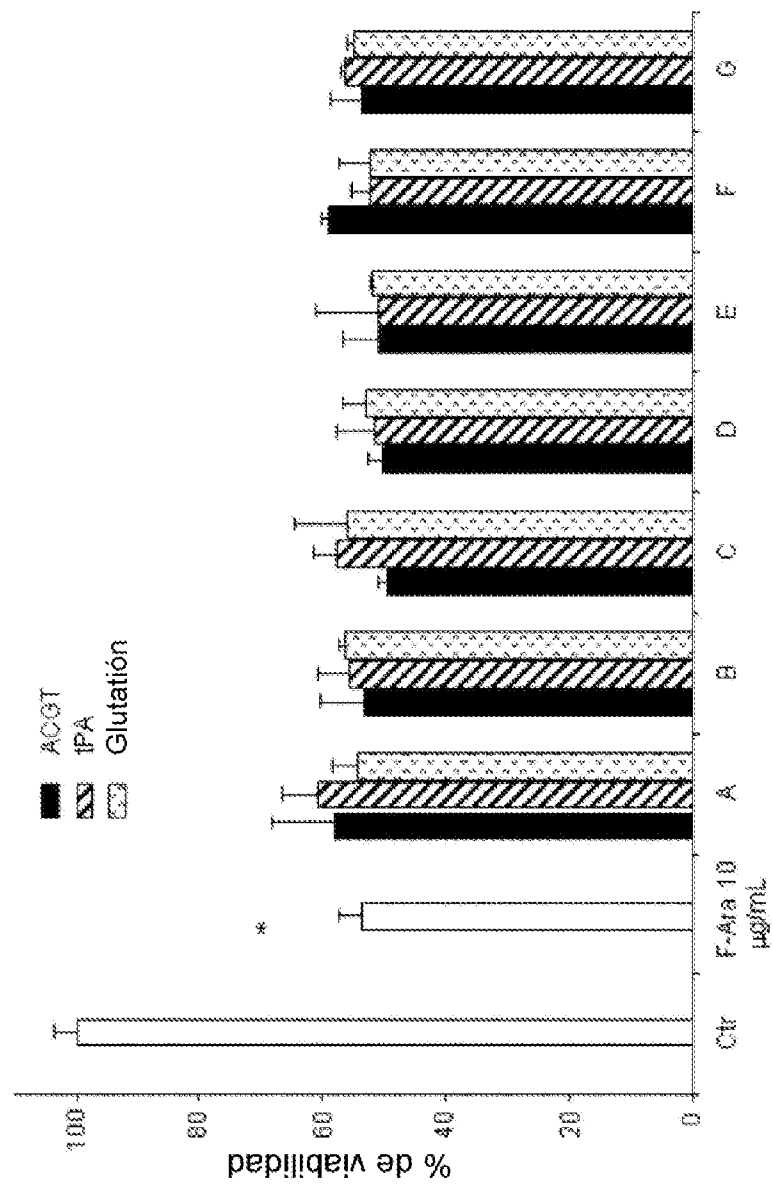


FIGURA 5A

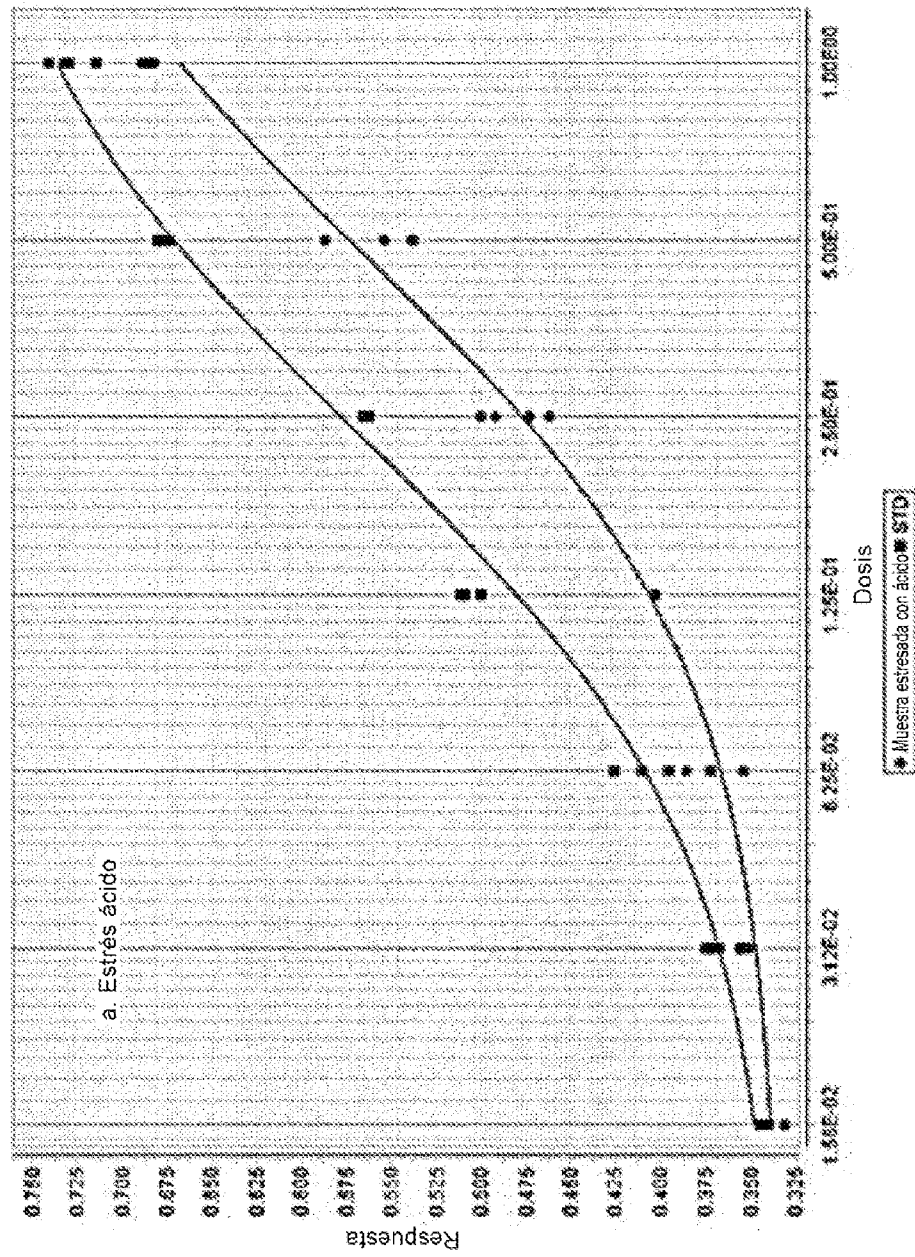


FIGURA 5B

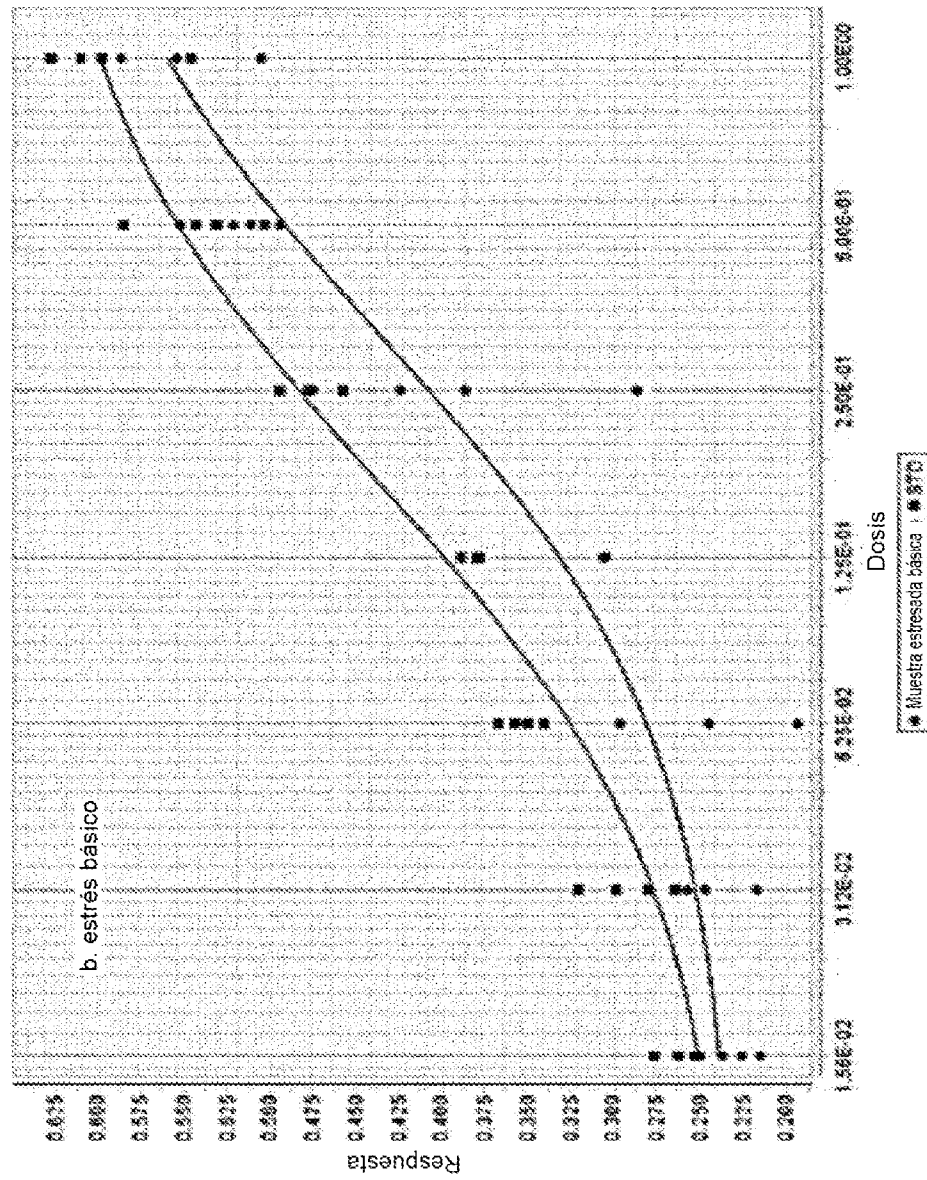


FIGURA 6

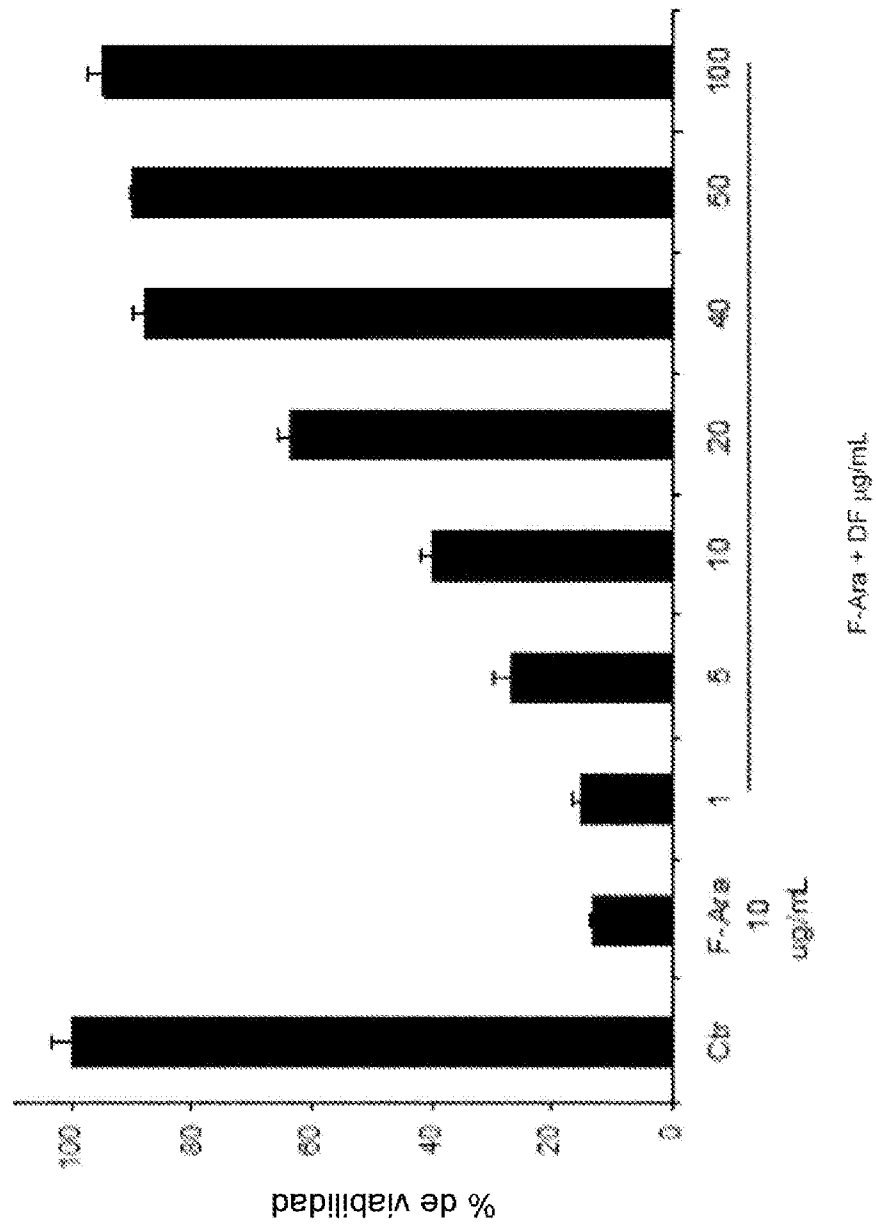


FIGURA 7

