

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0713123-2 A2**



(22) Data de Depósito: 24/05/2007
(43) Data da Publicação: 10/04/2012
(RPI 2153)

(51) *Int.Cl.:*
C08B 37/10
A61K 31/727

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO DE HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR E USO DA MESMA

(30) **Prioridade Unionista:** 25/05/2006 US 60/809,136, 04/10/2006 US 60/849,578, 04/10/2006 US 60/849,578, 25/05/2006 US 60/809,136

(73) **Titular(es):** Momenta pharmaceutical Inc

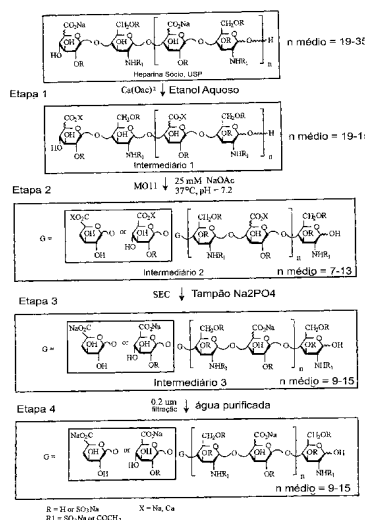
(72) **Inventor(es):** Corinne Bauer, Cuihua Liu, Daniele Beccati, Ganesh Venkataram, Ian Fier, Ishan Capila, Mallik Sundaram, Nur Sibel Gunay, Patricia Oliver, Yi We Qi, Yiming Yao, Ying Li, Zachary Shriver, Zainab Sirajbhai Mamuwala

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007069626 de 24/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/140231 de 06/12/2007

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO DE HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR E USO DA MESMA. A presente invenção refere-se a preparações de heparinas de baixo peso molecular (LMWHs) que tem propriedades aperfeiçoadas, por exemplo, propriedades que proporcionam uma vantagem clínica. Métodos de produção e uso, bem como métodos de análise de materiais de partida, processamento, intermediários e produtos finais na produção de tais preparações de LMWH, são providos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO DE HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR E USO DA MESMA**".

Este pedido de patente reivindica prioridade dos Pedidos Provisórios dos Estados Unidos Números de Séries 60/809.136, depositado em 5 25 de maio de 2006; 60/849.578, depositado em 4 de outubro de 2006; e 60/849.628, depositado em 5 de outubro de 2006, os conteúdos dos quais são incorporados aqui por referência.

Antecedentes

A presente invenção refere-se a coagulação que é uma trajetória 10 fisiológica envolvida na manutenção de hemostasia de sangue normal em mamíferos. Sob condições nas quais um dano vascular ocorre, a trajetória de coagulação é estimulada para formar um coágulo de sangue para prevenir a perda de sangue. Imediatamente após o dano vascular ocorrer, as plaquetas sanguíneas começam a agregarem-se no local de dano, formando 15 um tampão físico para cessar o vazamento. Em adição, o vaso que sofreu dano suporta vasoconstrição para reduzir o fluxo sanguíneo para a área, e fibrina começa a se agregar, formando uma rede insolúvel ou coágulo, que cobre a área que sofreu ruptura.

Quando um desequilíbrio na trajetória de coagulação altera a 20 coagulação excessiva, o resultado é o desenvolvimento de tendências trombóticas que são frequentemente manifestadas como ataques de coração, derrames cerebrais, trombose de veia profunda, e síndromes coronarianas agudas, tais como enfartos miocárdiais, e angina instável. Além disso, um embolismo pode se originar de um trombo, e resultar em um embolismo 25 pulmonar ou embolismo vascular cerebral, incluindo derrame cerebral ou ataque de isquemia transiente. As terapias atuais para tratamento de distúrbios associadas com desequilíbrios na trajetória de coagulação envolvem muitos riscos, e devem ser cuidadosamente controladas.

A heparina e heparinas de baixo peso molecular (LMWHs), 30 complexo, polissacarídeos sulfatados isolados de fontes endógenas, são moduladores potentes de hemostasia. A heparina, um glicosaminoglican similar a heparina altamente sulfatada (HLGAG) produzido por células mastro,

é um anticoagulante clínico amplamente usado, e é um dos primeiros fármacos biopoliméricos e um dos poucos fármacos de carboidrato. A heparina e moléculas derivadas do mesmo são anticoagulantes potentes que são usados em uma variedade de situações clínicas, especialmente para distúrbios tromboembólicos incluindo a profilaxia e tratamento de trombose venosa profunda e embolismo pulmonar, trombozes arteriais, e síndromes coronárias agudas similares a infarto e angina instável. A heparina e LMWHs interagem com componentes múltiplos da cascata de coagulação para inibir o processo de coagulação. A heparina induz principalmente seu efeito através de dois mecanismos, ambos dos quais envolvem ligação de antitrombina III(AT-III) a uma sequência de pentassacarídeo específica $H_{NAC/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ contida dentro do polímero. Primeiro, a ligação de AT-III ao pentassacarídeo induz uma mudança conformacional na proteína que intermedia sua inibição de fator Xa. Segundo, a trombina (fator IIa) também se liga a heparina em um local próximo ao pentassacarídeo/local de ligação de AT-III. A formação de um complexo ternário entre AT-III, trombina e heparina, resulta em inativação de trombina. Diferente de sua atividade de anti-Xa que requer somente o local de ligação de AT-III-pentassacarídeo, a atividade anti-IIa da heparina é dependente do tamanho, em adição a unidade de pentassacarídeo responsável pela atividade de anti-Xa para a formação eficiente de um AT-III, trombina, e complexo ternário de heparina. A heparina também media a liberação de inibidor de trajetória de fator de tecido (TFPI) de células endoteliais. O TFPI, um co-fator de heparina, é uma serina protease que se liga diretamente a e inibe fator. TFPI é um antitrombótico potente, particularmente quando co-administrado com heparina.

Embora a heparina seja altamente eficaz em uma variedade de situações clínicas, e tenha o potencial para ser usada em muitas outras, os efeitos colaterais associados com terapia de heparina são muitos e variados. A anticoagulação tem sido a aplicação clínica principal para heparina não-fracionada por cerca de 65 anos. Devido às suas farmacocinéticas intravenosas erráticas e falta de biodisponibilidade subcutânea, a UFH tem sido administrada por injeção intravenosa ao invés. Adicionalmente, a aplicação

de UFH como um anticoagulante tem sido prejudicada por muitos efeitos colaterais com ligação de proteína de plasma não-específica com UFH.

Isto tem conduzido a explosão na geração e utilização de heparina de baixo peso molecular (LMWH) como uma alternativa eficaz a UFH. LMWH proporciona uma ação farmacológica mais prognosticável, efeitos colaterais reduzidos, e melhor biodisponibilidade do que UFH. Desde que as preparações de LMWH comercialmente disponíveis não sejam totalmente neutralizadas por protamina, uma reação inesperada pode ter efeitos extremamente adversos; a atividade de anti-Xa de enoxaparina e outra LMWH são neutralizáveis somente para uma extensão de cerca de 40% com $\leq$ de Protamina/100 IU de anti-Xa LMWH. A atividade de anti-IIa é neutralizável somente para a extensão de cerca de 60% com $\leq$ 2 mg de Protamina/100 IU anti-Xa LMWH. (Por outro lado, a atividade de anti-Xa e anti-IIa de UFH é neutralizável quase completamente ($>90\%$) com $\leq$ 2 mg de Protamina sulfato/100 IU anti-Xa UFH).

Preparações farmacêuticas destes polissacarídeos, tipicamente isolados da mucosa intestinal suína, são heterogêneas no comprimento e composição. Como tal, somente uma porção de uma preparação típica possui atividade anticoagulante. Na melhor das hipóteses, a maioria das cadeias de polissacarídeo em uma preparação farmacêutica de heparina ou LMWH são inativas, na pior das hipóteses, estas cadeias interagem não-especificamente com proteínas de plasma para induzir os efeitos colaterais associados com terapia de heparina. Portanto, é importante desenvolver novas LMWHs que retêm a atividade anticoagulante e outras atividades desejadas de UFH, mas tenham efeitos colaterais reduzidos. As LMWHs, essencialmente devido a seus tamanhos de cadeias reduzidos e dispersidade, revelam ligação de proteína de plasma não-específica menos marcante. Contudo, todas as LMWHs que são atualmente clinicamente disponíveis também possuem atividade de anti-IIa reduzida conforme comparada a UFH. Devido a esta atividade diminuída, uma grande dose de LMWH é requerida (comparada a UFH) de modo a alcançar uma atividade de anti-Xa e anti-IIa similar, e os testes padrões para atividade de UFH, tempo de tromboplastina parcial

ativado (aPTT), ou tempo de coagulação ativado, não são úteis, visto que eles ocorrem principalmente na atividade de anti-IIa para uma leitura. O teste mais amplamente usado para monitoramento de níveis de LMWH é um teste de atividade de anti-Xa, que depende do indivíduo ter níveis suficientes de antitrombina III (ATIII), que não é sempre o caso. Este teste é muito oneroso (bem acima de \$100.000), e não é rotina ou prontamente disponível, visto que as amostras geralmente devem ser enviadas para um laboratório externo para análise. Consequentemente, o uso de LMWHs tem sido grandemente limitado à prevenção de trombose, e não a seu tratamento, e a população de pacientes a quem ela pode ser administrada tem sido limitado, excluindo, entre outros, pacientes pediátricos, pacientes com função renal anormal conforme medida por RFI, uréia, creatinina, fósforo, taxa de filtração glomerular (GFR), ou BUN (nível de Uréia Nitrogênio no Sangue) no sangue e urina, e a população de paciente de cardiologia intervencional.

15 Sumário da Invenção

A invenção é baseada, em parte, no desenvolvimento de preparações de LMWHs tendo, por exemplo, designadas para terem, propriedades aperfeiçoadas, por exemplo, propriedades que proporcionam uma vantagem clínica. Tais propriedades funcionais incluem, por meio de exemplo, uma ou mais de: reversibilidade em resposta a sulfato de protamina, farmacocinéticas prognosticáveis ou, de outro modo, aperfeiçoadas, atividade de anti-IIa aperfeiçoada, conforme comparada, por exemplo, a enoxaparina; uma razão de atividade de anti-Xa para atividade de anti-IIa relativamente constante sobre um período de cerca de 30 a 180 minutos, níveis de atividade monitoráveis, biodisponibilidade subcutânea, e probabilidade reduzida de causar trombocitopenia induzida por heparina (HIT). As LMWHs aqui descritas também têm características estruturais que as distinguem de outras LMWHs comercialmente disponíveis. Por exemplo, uma preparação de LMWH aqui provida pode ter uma ou mais das seguintes características: região de ligação substancialmente não-detectável; uma quantidade aumentada de 3-O sulfatos, conforme comparada a preparações de LMWH comercialmente disponíveis; um subconjunto das cadeias tem um ΔU não-sulfatado na ex-

tremidade de não-redução; um subconjunto das cadeias, por exemplo, uma maioria, por exemplo, substancialmente todas as cadeias, têm uma hexosamina N-acetilada na extremidade de redução; uma razão de $\Delta UH_{\text{Nac,6S}}GH_{\text{NS,3S,6S}}$ para $\Delta U_{2S}H_{\text{NS,6S}}IH_{\text{Nac,6S}}GH_{\text{NS,3S,6S}}$ de cerca de 1:1 a 4:1 (por exemplo, cerca de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1), e substancialmente estruturas terminais de redução não-modificadas. A invenção inclui preparações de LMWH tendo uma ou mais destas propriedades e características, bem como métodos de produção e uso de tais preparações. A invenção também caracteriza métodos de análise de materiais de partida, processamento, intermediários, e produtos finais, na produção de tais preparações de LMWH.

Consequentemente, em um primeiro aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo: um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da, por exemplo, cerca de 5000 a 8300 Da, por exemplo, cerca de 5500 a 8000 Da, por exemplo, cerca de 5700 a 7900 Da, por exemplo, cerca de 5800 a 6800 Da; e

uma atividade de anti-IIa de cerca de 50 a 300, por exemplo, cerca de 70 a 280, por exemplo, cerca de 90 a 250 IU/mg, por exemplo, cerca de 100 a 250 IU/mg, por exemplo, cerca de 100 a 140 IU/mg, por exemplo, cerca de 150 a 200 IU/mg, cerca de 130 a 190 IU/mg, por exemplo, cerca de 155 a 195 IU/mg.

Em um segundo aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo:

um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da, por exemplo, cerca de 5000 a 8300 Da, por exemplo, cerca de 5000 a 8000 Da, por exemplo, cerca de 5500 a 8000 Da, por exemplo, cerca de 5700 a 7900 Da, por exemplo, cerca de 5800 a 6800 Da; e

uma atividade de anti-IIa que é pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% neutralizável com protamina, por exemplo, conforme medida pelo tempo de coagulação ativado (ACT), ou tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT). Preferivelmente, a atividade de anti-IIa da LMWH é neutralizada por pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% dentro de 5, 10, 15, 30 minutos após admi-

nistração de protamina.

Em um terceiro aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo:

um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da, por exemplo, cerca de 5000 a 8300 Da, por exemplo, cerca de 5500 a 8000 Da, por exemplo, cerca de 5700 a 7900 Da, por exemplo, cerca de 5800 a 6800 Da; e

$\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ é 5 a 15%, por exemplo, 7 a 14%, 9 a 12% da composição, por exemplo, conforme medido por mol%. Preferivelmente, o $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ na extremidade de não-redução da molécula de cerca de 5 a 15%, por exemplo, 7 a 14%, por exemplo, 9 a 12% das cadeias na composição, por exemplo, conforme medido por mol%.

Em um quarto aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo:

um comprimento de cadeia médio de cerca de 9 a 18 dissacarídeos, ou 8 a 18 dissacarídeos, por exemplo, cerca de 9 a 16, ou 8 a 16 dissacarídeos; e

$\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ é 5 a 15%, por exemplo, 7 a 14%, por exemplo, 9 a 12% da composição, por exemplo, conforme medido por mol%. Preferivelmente, o $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ na extremidade de não-redução da molécula de cerca de 5 a 15%, por exemplo, 7 a 14%, por exemplo, 9 a 12% das cadeias na composição, por exemplo, conforme medido por mol%.

Em um quinto aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo:

um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da, por exemplo, cerca de 5000 a 8300 Da, por exemplo, cerca de 5500 a 8000 Da, por exemplo, cerca de 5700 a 7900 Da, por exemplo, cerca de 5800 a 6800 Da; e

uma razão de anti-Xa para anti-IIa de 3:1 ou menos, por exemplo, 2:1, por exemplo, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, ou 0,5:1.

Preferivelmente, a razão de anti-Xa para anti-IIa permanece relativamente constante sobre o curso de uma administração da preparação de

LMWH, por exemplo, a razão de anti-Xa para anti-IIa varia não mais do que cerca de $\pm 1,5$, ± 1 , $\pm 0,5$, $\pm 0,2$, sobre um período de cerca de 30, 60, 120, 180, 240, 300 minutos. Por exemplo, se uma razão inicial de atividade anti-Xa para atividade de anti-IIa é 2, então a razão medida em um segundo tempo (por exemplo, 30, 60, 120, 180, 240, 300 minutos) após a administração inicial preferivelmente será menor do que 3, e preferivelmente em ou ao redor de 2.

Em um sétimo aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo:

10 opcionalmente, um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da, por exemplo, cerca de 5000 a 8300 Da, por exemplo, cerca de 5500 a 8000 Da, por exemplo, cerca de 5700 a 7900 Da, por exemplo, cerca de 5800 a 6800 Da; e

15 quando analisado por digestão com heparinase I, heparinase II e heparinase III, e eletroforese capilar, cada um dos picos 1-14 da Tabela 10A está presente.

20 Em uma concretização preferida: a quantidade de cada pico na composição de LMWH, conforme analisada por digestão com heparinase I, heparinase II e heparinase III, e eletroforese capilar, é cerca daquela encontrada na Tabela 10A, a quantidade de cada pico está dentro de uma faixa provida na Tabela 10A; a quantidade dos picos 10 e 11 está dentro de uma faixa provida na da Tabela 10A.

Em um oitavo aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo:

25 opcionalmente, um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da, por exemplo, cerca de 5000 a 8300 Da, por exemplo, cerca de 5500 a 8000 Da, por exemplo, cerca de 5700 a 7900 Da, por exemplo, cerca de 5800 a 6800 Da; e

30 quando analisado por prótons de ressonância magnética nuclear 2D (RMN) para cada uma das estruturas da Tabela 11A estão presentes.

Em uma concretização preferida: a quantidade de cada uma das estruturas na composição de LMWH, conforme analisada por 2D RMN, é

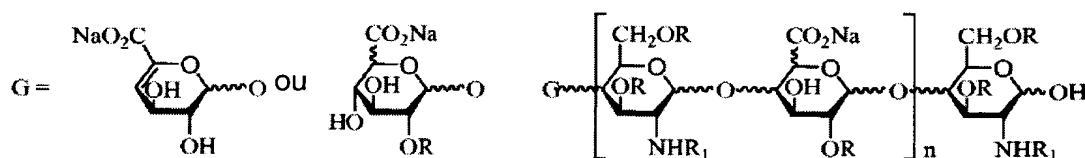
cerca daquela encontrada na Tabela 11A.

Em um nono aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo uma ou mais das seguintes características:

a composição tem substancialmente estruturas terminais de redução não-modificadas (por exemplo, pelo menos 85%, 90%, 95% ou mais das cadeias não têm); pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% das cadeias da composição têm H_{Nac} na extremidade de não-redução; menos do que 90%, 95%, 98%, 99%, preferivelmente nenhuma das cadeias da composição tem um ΔU sulfatado na extremidade de não-redução; não existe substancialmente região de ligação (por exemplo, menos do que cerca de 0,1% de região de ligação) presente na composição; a composição tem mais cadeias com 3-O sulfatos do que as LMWHs comercialmente disponíveis, por exemplo, enoxaparina ou dalteparina; e a razão de $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ para $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ na composição é cerca de 1:1 a 4:1.

Em uma concretização, a composição tem duas, três, quatro, cinco ou todas destas características.

Em um décimo aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo a seguinte estrutura:



no qual R é H ou SO₃X;

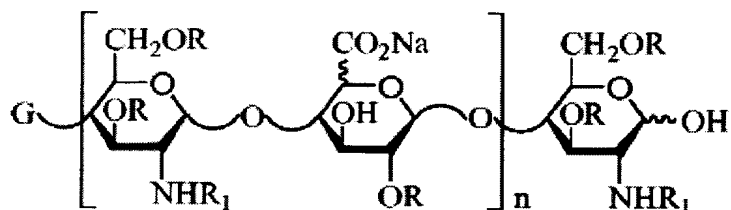
R₁ é SO₃X ou COCH₃;

X é um cátion monovalente ou divalente;

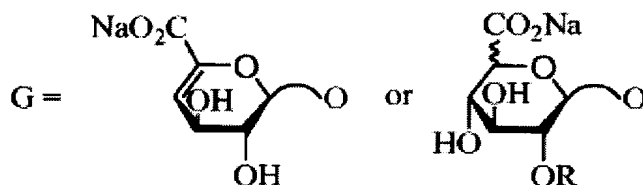
n = 2-50, por exemplo, 2-40; e

a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 9-16, 8-16, ou 8-15.

Em uma concretização, a composição de LMWH tem a seguinte estrutura:



no qual



R é H ou SO₃X;

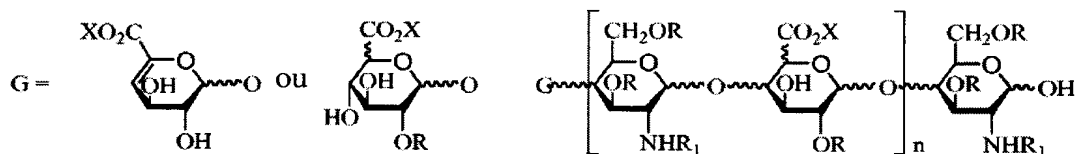
R1 é SO₃X ou COCH₃;

X é um cátion monovalente ou divalente,

5 n = 2-50, por exemplo, 4-40; e

a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 9-16, 8-16, ou 8-15.

Em um décimo primeiro aspecto, a composição de LMWH tem a seguinte estrutura:



10 no qual X é Na ou Ca, R é H ou SO₃Na;

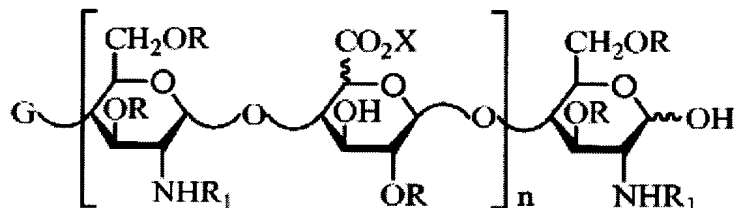
R1 é SO₃Na ou COCH₃;

n = 2-45, por exemplo, 2-35; e

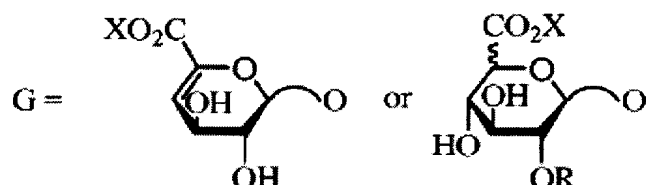
a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 7-13 ou 8-12.

Em uma concretização, a composição de LMWH tem a seguinte

15 estrutura:



no qual:



X é Na ou Ca, R é H ou SO₃Na;

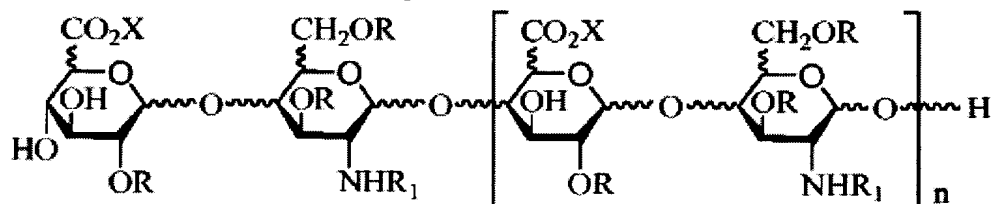
R₁ é SO₃Na ou COCH₃;

n = 2-45, por exemplo, 2-35; e

- 5 a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 7-11, ou 8-12.

Esta composição pode ocorrer como um intermediário na produção de uma LMWH, por exemplo, como o produto de digestão enzimática da fração de movimento rápido (conforme aqui discutido).

- 10 Em um décimo segundo aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo a seguinte estrutura:



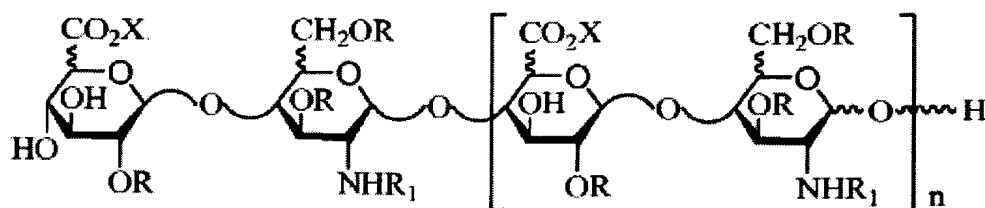
no qual X é Na ou Ca, R é H ou SO₃Na;

R₁ é SO₃Na ou COCH₃;

n = 2-50, por exemplo, 2-40; e

- 15 a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 8 a 15, por exemplo, 10 a 15, ou 9 a 16, por exemplo, 11 a 16.

Em uma concretização, a composição de LMWH tem a seguinte estrutura:



no qual X é Na ou Ca, R é H ou SO₃Na;

R1 é SO₃Na ou COCH₃;

n = 2-50, por exemplo, 2-40; e

a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 8 a 15, por exemplo, 10 a 15, ou 9 a 16, por exemplo, 11 a 16.

Esta composição pode ocorrer como um intermediário na produção de uma LMWH, por exemplo, como o produto de precipitações para proporcionar uma fração de movimento rápido (conforme aqui discutido).

Qualquer das LMWHs aqui descritas, por exemplo, descritas acima, podem ter outras propriedades. Por exemplo, uma das composições acima descritas pode adicionalmente ter uma ou mais das propriedades funcionais ou estruturais colocadas abaixo.

Desse modo, em uma concretização, a composição de LMWH tem uma atividade de anti-Xa de cerca de 100 a 400 IU/mg, por exemplo, cerca de 120 a 380 IU/mg, por exemplo, cerca de 150 a 350 IU/mg, por exemplo, cerca de 170 a 330 IU/mg, por exemplo, cerca de 180 a 300 IU/mg, por exemplo, cerca de 150 a 200 IU/mg, 130 a 220 IU/mg, 225 a 274 IU/mg.

Em uma concretização, a composição de LMWH tem uma atividade de anti-Xa que é pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% neutralizável, por exemplo, conforme medido por uma atividade de anti-Xa, ACT ou aPTT. Preferivelmente, a atividade de anti-Xa é neutralizada por pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% dentro de 5, 10, 15 minutos após administração de protamina. Por exemplo, a atividade de anti-Xa pode ser neutralizada por pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% dentro de 5, 10, 15, 30 minutos após administração de protamina a uma dose de cerca de 1, 2, 3 mg da composição de LMWH por 100 anti-Xa IU de plasma.

Em outra concretização, a composição de LMWH tem uma ou mais das seguintes propriedades: a atividade da composição pode ser monitorada por um aPTT e/ou ACT; a polidispersibilidade da composição é menor do que 1,6, por exemplo, a polidispersibilidade é cerca de 1,6 a 1,1, por exemplo, 1,5 a 1,1, por exemplo, 1,4 a 1,1, por exemplo, 1,3 a 1,1, por exemplo, 1,2 a 1,1; menos do que 70%, 60%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30% das cadeias presentes na composição têm um peso molecular maior do que 7500 ou 8000 Da; menos do que 40%, 35%, 25% das cadeias presentes na composição têm um peso molecular menor do que 5500 ou 5000 Da; a composição compreende uma mistura de estruturas de ΔU e I/G nas extremidades de não-redução das cadeias; e poucas cadeias na composição têm locais de ligação de PF4 do que enoxaparina, dalteparina, UFH.

Em uma concretização, cerca de 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 45%, 50% das cadeias têm um ΔU na extremidade de não-redução. Preferivelmente, cerca de 15% a 50%, por exemplo, 15% a 35% das cadeias, por exemplo, 20% a 35% das cadeias na composição têm um ΔU na extremidade de não-redução.

Em uma concretização, a composição de LMWH tem um grau mais alto de sulfatação do que enoxaparina ou dalteparina. Em uma concretização, a composição de LMWH tem mais dissacarídeos trissulfatados presentes na composição do que enoxaparina ou dalteparina, por exemplo, a composição de LMWH tem cerca de 50 a 65% de dissacarídeos trissulfatados, por exemplo, 55 a 60%, 55 a 58%, 57 a 60% de dissacarídeos trissulfatados, conforme determinado por mol%.

Em uma concretização, a composição compreende um nível mais alto de $\Delta UH_{\text{Nac},6S}GH_{\text{NS},3S,6S}$ do que enoxaparina, dalteparina e/ou UFH, por exemplo, compreende cerca de 5 a 15 mol%, por exemplo, 7 a 14 mol%, por exemplo, 9 a 12 mol%.

Em uma concretização, a composição de LMWH tem um teor de cálcio menor do que 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1,0%, e/ou um teor de sódio menor do que 30%, 25%, 20%, 15%, 10%. Em uma concretização, a composição de LMWH compreende: menos do que 1000 ng/mg, 750 ng/mg, 500

ng/mg, 250 ng/mg de uma enzima heparinase, por exemplo, uma enzima heparinase descrita aqui; menos do que 1,0%, 0,5%, 0,3% peso/peso de metanol; menos do que 1,0%, 0,5%, 0,3%, 0,1% de peso/peso de etanol; menos do que 2,0%, 1,75%, 1,25%, 1,0%, 0,5%, 0,3%, 0,15% de cloreto; menos do que 15%, 10%, 5%, 2,5% de água por peso; menos do que 2000, 1500, 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300 ppm de sulfato livre.

Em uma concretização, a composição de LMWH proporciona liberação aumentada de TFPI comparada a enoxaparina. Em uma concretização, a LMWH proporciona pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 vezes aumento na liberação de TFPI conforme comparada a enoxaparina.

Em uma concretização, a composição de LMWH tem uma meia-vida intravenosa de cerca de 30 minutos a 3 horas, por exemplo, cerca de 1 a 2 horas. Em uma concretização, a composição de LMWH tem uma meia-vida subcutânea de cerca de 30 minutos a 3,0 horas, por exemplo, cerca de 1,5 a 2,5 horas, por exemplo, cerca de 2 horas.

Em uma concretização de qualquer dos primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto, sétimo, oitavo, nono e décimo aspectos, a composição de LMWH tem uma ou mais das seguintes características:

a composição tem substancialmente estruturas terminais de redução não-modificadas (por exemplo, pelo menos 85%, 90%, 95% ou mais das cadeias não têm); pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% das cadeias da composição têm H_{Nac} na extremidade de redução; menos do que 90%, 95%, 98%, 99%, preferivelmente nenhuma das cadeias da composição tem um ΔU sulfatado na extremidade de não-redução; não existe substancialmente região de ligação (por exemplo, menos do que 0,1% de região de ligação) presente na composição; a composição tem mais cadeias com 3-O sulfatos do que as LMWHs comercialmente disponíveis, por exemplo, enoxaparina ou dalteparina; e a razão de $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ para $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ na composição é cerca de 1:1 a 4:1 (por exemplo, 1:1.2:1, 3:1 ou 4:1). Em uma concretização, a composição de LMWH

tem duas, três, quatro, cinco, ou todas destas características.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH tendo as seguintes propriedades:

- um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da;
- uma atividade de anti-IIa de cerca de 50 a 300 IU/mg;
- 5 atividade de anti-IIa que é pelo menos 50% neutralizável com protamina, por exemplo, conforme medida por ACT ou aPTT;

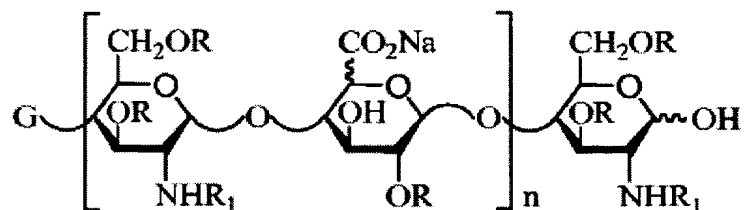
10 $\Delta UH_{\text{Nac,6S}}GH_{\text{NS,3S,6S}}$ é 5 a 15% da composição, preferivelmente $\Delta UH_{\text{Nac,6S}}GH_{\text{NS,3S,6S}}$ na extremidade de não-redução de cerca de 5 a 15% da composição;

um comprimento de cadeia médio de cerca de 9 a 16 dissacárideos;

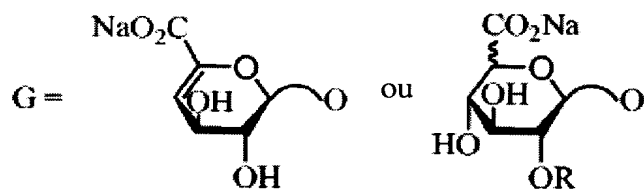
uma razão de anti-Xa para anti-IIa de 3:1, ou menos;

15 a razão de anti-Xa para anti-IIa permanece relativamente constante sobre o curso de uma administração de LMWH, por exemplo, a razão de anti-Xa para anti-IIa varia não mais do que cerca de $\pm 1,5$, ± 1 , $\pm 0,5$, ou $\pm 0,2$, sobre um período de cerca de 30, 60, 120, 180, 240, 300 minutos. Por exemplo, se uma razão inicial de atividade de anti-Xa para atividade de anti-IIa é 2, então a razão medida em um segundo tempo (por exemplo, 30, 60, 20 120, 180, 240, 300 minutos) após a administração inicial preferivelmente será menor do que 3, e, preferivelmente, em ou ao redor de 2.

Em uma concretização preferida, a composição de LMWH tem a seguinte estrutura:



no qual



R é H ou SO₃Na;

R1 é SO₃Na ou COCH₃;

n = 2-50, por exemplo, 2-40; e

a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 9 a 16, ou 8 a 15.

Em uma concretização preferida, a composição de LMWH tem as seguintes propriedades:

atividade de anti-Xa de cerca de 100 a 400 IU/mg;

atividade de anti-Xa que é pelo menos 50% neutralizável, por exemplo, conforme medida por atividade de anti-Xa, ACT ou aPTT;

uma polidispersibilidade de menos do que 1,6;

menos do que 70%, 60%, 50% das cadeias presentes na composição têm um peso molecular maior do que 7500 Da;

menos do que 40% das cadeias presentes na composição têm um peso molecular menor do que 5000 Da;

inclui uma mistura de estruturas de ΔU e I/G nas extremidades de não-redução das cadeias;

têm estruturas terminais de redução substancialmente não-modificadas;

poucas cadeias na composição têm locais de ligação de PF4 do que enoxaparina, dalteparina, ou UFH;

pelo menos 60%, 70%, 80%, 90% das cadeias da composição têm HNAc na extremidade de redução;

cerca de 15% a 35% das cadeias na composição têm um ΔU nas extremidades de não-redução;

menos do que 90%, 95%, 98%, 99%, preferivelmente nenhuma das cadeias da composição têm um ΔU sulfatado na extremidade de não-redução.

Em uma concretização preferida, a composição de LMWH tem as seguintes propriedades:

tem um grau mais alto de sulfatação do que enoxaparina ou dalteparina;

5 tem mais dissacarídeos sulfatados presentes na composição do que enoxaparina ou dalteparina, por exemplo, a composição de LMWH tem cerca de 50 a 65% de dissacarídeos trisulfatados, conforme determinado por mol%;

10 tem um nível mais alto de $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ do que enoxaparina, dalteparina e/ou UFH, por exemplo, $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ está presente a cerca de 5 a 15 mol%.

Em uma concretização preferida, a composição de LMWH tem as seguintes propriedades:

15 tem um teor de cálcio menor do que 3%, e/ou um teor de sódio menor do que 20%;

inclui menos do que 1000 ng/mg de uma enzima heparinase;

tem menos do que 1,0% p/p de metanol;

tem menos do que 1,0% p/p de etanol;

tem menos do que 2,0% p/p de cloreto;

20 tem menos do que 15% de água por peso;

tem menos do que 2000 ppm de sulfato livre.

Em uma concretização preferida, a composição de LMWH tem as seguintes propriedades:

25 proporciona liberação de inibidor de trajetória de fator de tecido (TFPI) aumentada conforme comparada a enoxaparina.

Em uma concretização preferida, a composição de LMWH tem uma meia-vida intravenosa de cerca de 30 minutos a 3 horas.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de produção de uma LMWH. O método inclui:

30 sujeição da UFH a uma, ou a uma série de etapas de precipitações de álcool aquoso (por exemplo, etanol) (pelo menos uma com um sal de sódio (ou um sal outro do que um sal de cálcio)), para extrair fração de

peso molecular inferior (por exemplo, fração de movimento rápido), para proporcionar um primeiro intermediário, no qual o primeiro intermediário preferivelmente tem um comprimento de cadeia médio de 10 a 16 dissacarídeos;

5 digestão do primeiro intermediário usando um agente, por exemplo, uma enzima ou químico, que cliva ligações glicosídicas de ácidos urônicos não-sulfatados, por exemplo, uma enzima aqui descrita, por exemplo, em tampão aquoso, por exemplo, em tampão de sal aquoso, por exemplo, tampão de acetato de sódio, pH de cerca de 5-9, por exemplo, 7-8 a
10 25°C a 52°C, por exemplo, 37°C, para produzir um segundo intermediário, no qual o segundo intermediário tem um comprimento de cadeia médio de 8 a 14 dissacarídeos, por exemplo, 8-12 dissacarídeos;

separação dos componentes de antifator Xa e IIa altos de alto peso molecular a partir do segundo intermediário a partir dos materiais de
15 atividade inferior por uma etapa baseada no tamanho, por exemplo, cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), para produzir um terceiro intermediário no qual o terceiro intermediário preferivelmente tem um comprimento de cadeia médio de 9 a 16 dissacarídeos e, opcionalmente

dissolução do terceiro intermediário em água purificada, filtra-
20 gem, por exemplo, através de um filtro de 0,2 µm, e liofilização a substância de fármaco.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza uma composição de LMWH produzida por um método aqui descrito.

Em outro aspecto, o método inclui um intermediário, ou mistura
25 de reação de qualquer dos métodos para produção ou análise de uma LMWH aqui descrita.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza uma composição farmacêutica que inclui uma composição de LMWH aqui descrita.

Em um aspecto, a composição farmacêutica inclui um transportador farmacêuticamente aceitável.
30

Em um aspecto, a composição farmacêutica está em uma forma adequada para administração sistêmica. Em uma concretização preferida, a

composição farmacêutica é adequada para administração subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intrasinoval, intramuscular, intraperitoneal, intravítrea, epidural, subdural ou intratecal. Em uma concretização, uma composição farmacêutica para administração sistêmica pode ser uma solução isotônica, por exemplo, uma solução isotônica com ou sem conservantes. Exemplos de preservativos incluem, mas não estão limitados a, benzil álcool, manitol e leucina. Uma quantidade de dosagem unitária de uma composição farmacêutica da invenção pode estar disposta dentro de um acondicionamento, ou de um dispositivo adequado para administração. Por exemplo, uma composição adequada para distribuição subcutânea pode estar disposta dentro de uma seringa configurada para distribuição subcutânea, uma composição adequada para distribuição intravenosa pode estar disposta dentro de uma seringa configurada para distribuição intravenosa, ou dentro de outro dispositivo para distribuição intravenosa, por exemplo, um saco ou garrafa de gotejamento intravenoso.

Em uma concretização, a composição farmacêutica está em uma forma adequada para administração invasiva local, por exemplo, revestimento, ou dentro de um dispositivo adequado para implantação. Exemplos de dispositivos adequados incluem, mas não estão limitados a, um stent, e um circuito ex-corpóreo. Em uma concretização, a composição farmacêutica está em uma forma adequada para implantação subcutânea, implantação em um tecido ou órgão (por exemplo, uma artéria coronária, artéria carótida, artéria renal, outras artérias periféricas, veias, rim, coração, córnea, vítreo, e cérebro), ou implantação em um espaço que circunda um tecido ou órgão (por exemplo, cápsula do rim, pericárdio, espaço torácico ou peritoneal).

Em uma concretização, a composição farmacêutica é adequada para administração não-invasiva, por exemplo, administração tópica, transdermal, pulmonar, nasal, oral, canal auditório, retal ou vaginal. Uma quantidade de dosagem unitária de uma composição farmacêutica da invenção pode estar disposta dentro de um acondicionamento, ou de um dispositivo adequado para tal administração.

Em uma concretização, a composição de LMWH é liofilizada. Em

outra concretização, a composição de LMWH é um líquido.

Em uma concretização, a invenção caracteriza um recipiente, por exemplo, seringa ou frasco, contendo a composição farmacêutica. Em uma concretização, a composição de LMWH está presente a cerca de 1500IU, 2000IU, 2500IU, 3000IU, 3500IU, 4000IU, 4500IU, 5000IU, 5500IU, 6000IU de atividade de anti-Xa por mL de transportador farmacêuticamente aceitável.

Em uma concretização, a composição farmacêutica tem uma osmolaridade de cerca de 200 a 400 mOsm/L, por exemplo, cerca de 250 a 350 mOsm/L, cerca de 280 a 330 mOsm/L. Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende adicionalmente cloreto de sódio e água.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de tratamento de um indivíduo incluindo administrar uma LMWH aqui descrita ao indivíduo. O tratamento pode ser terapêutico, por exemplo, um tratamento que diminui, evita ou melhora uma condição indesejada existente ou sintoma desta, ou profilático, por exemplo, um tratamento que retarda, por exemplo, previne, o começo de uma condição indesejada, ou sistema desta. Uma composição de LMWH aqui descrita pode ser usada para tratar distúrbios que são tratáveis com UFH ou com uma LMWH comercial, por exemplo, enoxaparina, daltparina ou tinzaparina. A invenção inclui métodos para tratamento de um indivíduo tendo, ou em risco de ter, uma distúrbio ou condição selecionada a partir do grupo consistindo em: uma distúrbio associada com coagulação, por exemplo, trombose de veia profunda (DVT), ou embolismo pulmonar, trombose ou doença cardiovascular, por exemplo, síndrome coronária aguda (ACS), angina estável ou não-estável, infarto miocárdial, por exemplo, infarto miocárdial de ST segmentado elevado (STEMI), ou infarto miocárdial de ST não-segmentado elevado (NSTEMI), condições vasculares ou fibrilação atrial; dor de cabeça; aterosclerose; uma distúrbio inflamatória, tal como doença autoimune ou distúrbios atópicas, psoríase, artrite, sepsia; coagulopatia intravascular disseminada (DIC); uma alergia ou uma distúrbio respiratória, tais como asma, enfisema, síndrome de angústia respiratória adulta (ARDS), fibrose cística, ou dano de reperfusão do pulmão; estenose

ou restenose; um câncer ou distúrbio metastática; um distúrbio angiogênica; uma distúrbio fibrótica, tais como fibrose de órgão maior, distúrbios fibroproliferativas e cicatrização associada com trauma; osteoporose; Alzheimer, fraturas de osso tais como fraturas de bacia. O indivíduo pode estar suportando, ou ter suportado, um procedimento cirúrgico, por exemplo, transplante de órgão, cirurgia ortopédica, reposição de junta, por exemplo, reposição da bacia ou reposição do joelho, intervenção coronária percutânea (PCI), colocação de stent, angioplastia, ou cirurgia de enxerto de derivação de artéria coronária (CABG). As composições da invenção são administradas a um indivíduo tendo, ou em risco de, desenvolver uma ou mais das distúrbios em uma quantidade efetiva para tratamento da distúrbio ou condição.

Em uma concretização, o método inclui adicionalmente monitoramento da atividade da composição de LMWH no indivíduo usando um ensaio de coagulação, por exemplo, usando ACT e/ou aPTT.

Em uma concretização, o método inclui adicionalmente administrar sulfato de protamina após administração da composição de LMWH para neutralizar alguma ou toda da atividade, por exemplo, atividade de anti-Xa e/ou atividade de IIa da composição de LMWH. Em uma concretização, cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou toda da atividade de anti-IIa da composição de LMWH é neutralizada dentro de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 minutos após administração de protamina. Em uma concretização, cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou toda da atividade de anti-IIa da composição de LMWH é neutralizada, por exemplo, cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou toda da atividade de anti-IIa da composição de LMWH é neutralizada dentro de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 minutos após administração de protamina. Em uma concretização, sulfato de protamina é administrado a uma dose de cerca de 1 mg, 2 mg, 3 mg, 5 mg da composição de LMWH por 100 anti-Xa IU de plasma. A neutralização de atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa pode ser determinada, por exemplo, por ACT e/ou aPTT.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de tratamento (por exemplo, tratamento terapêutico ou profilático) de uma distúrbio, por exemplo, uma distúrbio trombótica, em um indivíduo. O método inclui

administrar uma composição de LMWH aqui descrita, para, desse modo, tratar, preferivelmente prevenir, a distúrbio. Em uma concretização, a distúrbio é uma ou mais de ACS, infarto miocárdial, por exemplo, NSTEMI OU STEMI, angina estável e angina instável. Preferivelmente, a distúrbio tromboótica é trombose arterial, por exemplo, incluindo STEMI. A distúrbio pode estar, por exemplo, associada com intervenção cirúrgica, por exemplo, PCI, colocação de stent, ou angioplastia. Por exemplo, o indivíduo pode ter, ou estar em risco de ter, ou estar se recuperando de, uma intervenção cirúrgica, por exemplo, intervenção de cardiologia (por exemplo, angioplastia, PCI, colocação de stent). Em uma concretização, o indivíduo está em risco (por exemplo, está sendo considerado para) receber intervenção cirúrgica, por exemplo, CABG.

Em uma concretização, a composição de LMWH é administrada ao indivíduo intravenosamente, por exemplo, a uma dose de cerca de 0,03 mg/kg a 0,45 mg/kg, por exemplo, 0,03 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,22 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,27 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,37 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,44 mg/kg. Em concretizações preferidas, a composição de LMWH é administrada intravenosamente a uma dose de cerca de 0,1 a 0,3 mg/kg, por exemplo, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,20 mg/kg, 0,22 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,27 mg/kg ou 0,30 mg/kg. Em outra concretização, a composição de LMWH é administrada ao indivíduo subcutaneamente, por exemplo, a uma dose de cerca de 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,44 mg/kg, 0,47 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,60 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1,0 mg/kg. Em outras concretizações, a composição de LMWH é administrada subcutaneamente a uma dose de cerca de 0,15 mg/kg a 1,0 mg/kg, 0,20 a 0,9 mg/kg, 0,25 a 0,9 mg/kg, 0,30 a 0,50 mg/kg, por exemplo, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,42 mg/kg, 0,44 mg/kg, 0,47 mg/kg ou 0,50 mg/kg.

Em uma concretização, o método inclui adicionalmente monitoramento da atividade da composição de LMWH no indivíduo usando-se um ensaio de coagulação, por exemplo, usando-se ACT e/ou aPTT. Em uma concretização, a atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa é monitorada,

por exemplo, com ACT e/ou aPTT, antes de, ou durante, ou após intervenção cirúrgica, por exemplo, angioplastia, PCI, colocação de stent. Em uma concretização, a atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa é monitorada, por exemplo, com ACT e/ou aPTT, antes de, ou durante, e/ou após administração da composição de LMWH. Em algumas concretizações, a atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa é monitorada por ACT, e a dose de LMWH administrada para alcançar um ACT de cerca de 200 a 350 segundos.

Em uma concretização, o método inclui adicionalmente administrar sulfato de protamina após administração da composição de LMWH para neutralizar alguma ou toda da atividade, por exemplo, atividade de anti-Xa e/ou atividade de IIa da composição de LMWH. Em uma concretização, pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou toda da atividade de anti-IIa da composição de LMWH é neutralizada, por exemplo, pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou toda da atividade de anti-IIa da composição de LMWH é neutralizada dentro de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 minutos após administração de protamina. Em uma concretização, pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou toda da atividade de anti-IIa da composição de LMWH é neutralizada dentro de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 minutos após administração de protamina. Em uma concretização, sulfato de protamina é administrado a uma dose de cerca de 1,5 mg, por exemplo, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 5 mg da composição de LMWH por 100 anti-Xa IU de plasma. A neutralização de atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa pode ser determinada, por exemplo, por ACT e/ou aPTT. Em uma concretização, a atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa pode ser determinada, por exemplo, por ACT e/ou aPTT, antes de, durante, e/ou após administração de sulfato de protamina. Em uma concretização, a atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa é neutralizada antes de, durante ou após intervenção cirúrgica. Por exemplo, em uma concretização, a atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa pode ser neutralizada durante ou após uma intervenção

cirúrgica, tais como angioplastia ou PCI. Em outra concretização, a composição de LMWH é neutralizada antes de intervenção cirúrgica, tal como CABG.

Em uma concretização, o método inclui adicionalmente monitorar o paciente para uma reação negativa, por exemplo, hematoma epidural ou espinal, hemorragia ou sangramento.

Em uma concretização, a composição de LMWH é administrada intravenosamente ou subcutaneamente.

Em uma concretização, a composição de LMWH é administrada em combinação com outro agente terapêutico, por exemplo, um agente anti-coagulante ou antitrombótica, por exemplo, bivalirudin Angiomax, ASA, um inibidor de GPIIb/IIIa (por exemplo, eptifibatide ou abciximab), um inibidor de ADP (por exemplo, Plavix), rPA, TNKase, aspirina, um inibidor de P2Y12, um inibidor de plaqueta, warfarin, e combinações destes.

As composições de LMWH reversíveis (neutralizáveis) e monitoráveis aqui descritas permitem flexibilidade aperfeiçoada no tratamento de pacientes, por exemplo, pacientes admitidos no hospital, e suportando avaliação de possível tratamento cardiovascular, por exemplo, cirurgia. Consequentemente, em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de tratamento (por exemplo, tratamento terapêutico ou profilático) de uma distúrbio, por exemplo, uma distúrbio trombotica ou cardiovascular em um paciente. O método inclui:

opcionalmente administrar uma composição de LMWH reversível e monitorável aqui descrita ao paciente;

classificar o paciente (ou a quem a composição foi ou será administrada) como não em necessidade de intervenção cirúrgica (por exemplo, classificação do paciente como não em necessidade de intervenção cirúrgica antes da liberação do hospital), ou como um candidato para intervenção cirúrgica antes da liberação do hospital;

opcionalmente, se o paciente é classificado como um candidato à intervenção cirúrgica, em seguida realizando-se um ou ambos de monitoramento (por exemplo, conforme descrito aqui, por exemplo, com um ensaio de coagulação, usando-se ACT e/ou aPTT) da composição de LMWH rever-

sível e monitorável, e neutralização (por exemplo, conforme aqui descrito, por exemplo, por administração de sulfato de protamina) da composição de LMWH reversível e monitorável.

Em uma concretização, a composição de LMWH é administrada ao indivíduo intravenosamente, por exemplo, a uma dose de cerca de 0,03 mg/kg a 0,45 mg/kg, por exemplo, 0,03 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,22 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,27 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,37 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,44 mg/kg. Em concretizações preferidas, a composição de LMWH é administrada intravenosamente a uma dose de cerca de 0,1 a 0,3 mg/kg, por exemplo, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,20 mg/kg, 0,22 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,27 mg/kg ou 0,30 mg/kg. Em outra concretização, a composição de LMWH é administrada ao indivíduo subcutaneamente, por exemplo, a uma dose de cerca de 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,44 mg/kg, 0,47 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,60 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg. Em outras concretizações, a composição de LMWH é administrada subcutaneamente a uma dose de cerca de 0,15 mg/kg a 1,0 mg/kg, 0,20 a 0,8 mg/kg, 0,25 a 0,90 mg/kg, 0,30 a 0,50 mg/kg, por exemplo, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,42 mg/kg, 0,44 mg/kg, 0,47 mg/kg ou 0,50 mg/kg.

Em uma concretização preferida, o paciente é classificado como um candidato à intervenção cirúrgica, por exemplo, PCI, colocação de stent, ou angioplastia, e o efeito da composição de LMWH reversível e monitorável é monitorado. Em uma concretização preferida, a intervenção cirúrgica é realizada, e a composição de LMWH reversível e monitorável é monitorada em uma ou mais, ou toda, de antes, durante e após a cirurgia. Em uma concretização, o paciente é monitorado por um ACT de cerca de 200 a 350 antes e/ou durante uma intervenção cirúrgica, tal como PCI.

Em uma concretização preferida, o paciente é classificado como um candidato à intervenção cirúrgica, por exemplo, CABG, e o efeito da composição de LMWH reversível e monitorável é um ou ambos de monitorado e neutralizado. Em uma concretização preferida, a intervenção cirúrgica é realizada, e a composição de LMWH reversível e monitorável monitorada

uma ou mais, ou toda, de antes, durante e após a cirurgia. Em uma concretização, o paciente é monitorado por um ACT de cerca de 400 a 600, por exemplo, 400 a 500 antes da intervenção cirúrgica, tal como CABG.

5 Em uma concretização preferida, o indivíduo está sendo tratado para uma distúrbio trombótica. Em uma concretização, a distúrbio é uma ou mais de ACS, infarto miocárdial, por exemplo, NSTEMI OU STEMI, angina estável ou instável. Preferivelmente, a distúrbio trombótica é trombose arterial, por exemplo, incluindo elevação de ST (STEMI).

10 Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de monitoramento de um indivíduo tratado com uma composição de LMWH monitorável aqui descrita. O método inclui,

opcionalmente, administrar uma composição de LMWH monitorável aqui descrita ao indivíduo; e

15 avaliar aPTT e/ou ACT no indivíduo (que tenha sido administrado a composição de LMWH monitorável).

Em outro aspecto, um aPTT e/ou ACT de linha de base é determinado antes do tratamento do indivíduo com a LMWH. Em uma concretização, o método inclui comparar aPTT e/ou ACT de um indivíduo que tenha recebido a LMWH ao aPTT e/ou ACT de linha de base.

20 Em uma concretização, o indivíduo é monitorado em um ou mais, ou todos, dos seguintes estágios: antes, durante ou após recebimento de uma composição de LMWH. Em uma concretização, o indivíduo é monitorado antes, durante e/ou após intervenção cirúrgica, por exemplo, PCI, colocação de stent, ou angioplastia. Em uma concretização, a composição de LMWH é monitorada para um ACT de cerca de 200 a 350 antes e/ou durante
25 uma intervenção cirúrgica, tal como PCI. Em outra concretização, a composição de LMWH é monitorada para um ACT de cerca de 400 a 600, por exemplo, cerca de 400 a 500, antes do CABG.

30 Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de tratamento de um indivíduo que tenha sido administrado uma composição de LMWH reversível aqui descrita. O método inclui:

opcionalmente, administrar uma composição de LMWH reversí-

vel aqui descrita ao indivíduo; e

neutralizar (por exemplo, conforme aqui descrito, por administração de sulfato de protamina) a composição de LMWH reversível.

Em uma concretização, o indivíduo é monitorado em um ou mais, ou todos dos seguintes estágios: antes de, durante e após administração de sulfato de protamina.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de aconselhar ou proporcionar instruções (por exemplo, instruções escritas, orais ou geradas por computador) para o uso de uma LMWH tendo uma atividade de anti-IIa alta, por exemplo, uma composição de LMWH aqui descrita. O método inclui proporcionar instruções com relação ao uso, por exemplo, com: pacientes tendo função renal anormal ou diabetes, ou trombina ligada a coágulo; pacientes que são candidatos a PCI, colocação de stent, CABG, angioplastia, etc; pacientes de cardiologia intervencional; pacientes em necessidade de neutralização de LMWH previamente administrada, por exemplo, neutralização com sulfato de protamina; pacientes em risco de hematoma epidural ou espinal, hemorragia e/ou sangramento. Em uma concretização, as instruções pertencem à administração da composição de LMWH para ACS, infarto miocárdial, por exemplo, NSTEMI OU STEMI, angina estável e angina instável, por exemplo, administração em uma sub-população de pacientes, tais como pacientes tendo função renal anormal, ou pacientes de idade avançada (por exemplo, acima de 60 anos de idade). Em uma concretização, a instrução pertence à administração da composição de LMWH para distúrbios trombóticos, por exemplo, distúrbios trombóticos associadas com intervenção cirúrgica, por exemplo, PCI, colocação de stent, ou angioplastia.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de aconselhar o uso de uma LMWH aqui descrita, que inclui proporcionar instruções com relação ao monitoramento de uma atividade de anti-Xa e/ou atividade de anti-IIa usando ACT e/ou aPTT.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de fabricação de uma composição de LMWH, por exemplo, uma composição de LMWH aqui descrita. O método inclui uma ou mais das seguintes etapas:

(1) sujeição de uma amostra contendo glicosaminoglican (GAG), por exemplo, UFH, a uma primeira de uma precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, álcool, por exemplo, etanol), um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água), e um sal (por exemplo, um sal de sódio, por exemplo, acetato de sódio, ou sal de cálcio, por exemplo, acetato de cálcio), para proporcionar um primeiro sobrenadante;

(2) sujeição do primeiro sobrenadante a uma segunda de uma precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, um álcool, por exemplo, etanol), e um solvente não-orgânico polar, por exemplo, água), para produzir um precipitado (isto pode ser usado para proporcionar uma fração de movimento rápido conforme discutido em outra parte aqui);

(3) solubilização do precipitado, preferivelmente em água, e clivagem do precipitado com um agente que cliva ligações glicosídicas de ácidos urônicos não-sulfatados, por exemplo, adjacentes a um resíduo de N-acetil glucosamina. Um exemplo é uma enzima heparinase III aqui descrita, preferivelmente MO11, preferivelmente na presença de acetato de sódio, e preferivelmente para completação, por exemplo, conforme indicado por um platô de UV, para proporcionar uma preparação clivada;

(4) precipitação da preparação clivada, por exemplo, com um sal, por exemplo, um sal de sódio, preferivelmente um cloreto de sódio, e um solvente orgânico polar, por exemplo, álcool, por exemplo, metanol, para formar sólidos, tendo sacarídeos com, por exemplo, um comprimento de cadeia médio de 8-14, por exemplo, 8-12 dissacarídeos;

(5) sujeição do material a partir dos sólidos a uma etapa de purificação, por exemplo, uma etapa de purificação cromatográfica, por exemplo, etapa de seleção de tamanho, por exemplo, cromatografia de exclusão, cromatografia de troca de íon, ou filtração, para proporcionar uma preparação com um peso molecular médio mais alto do que na etapa (4). Em uma concretização preferida, a preparação de peso molecular médio mais alto tem um comprimento de cadeia médio de 9 a 16 dissacarídeos, ou um peso molecular médio de 5000 a 9000 Da.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza métodos de produção

de uma composição de LMWH tendo um comprimento de cadeia médio de cerca de 9 a 16 dissacarídeos. O método inclui:

provisão de um precursor de composição de LMWH (por exemplo, uma composição intermediária de um método aqui descrito) tendo um comprimento de cadeia médio de menos do que 9 a 16 dissacarídeos, preferivelmente cerca de 8 a 14 dissacarídeos, por exemplo, 8 a 12 dissacarídeos; e

processamento do precursor de composição de LMWH para obter uma LMWH tendo um comprimento de cadeia médio de cerca de 9 a 16 dissacarídeos.

Preferivelmente, o processamento inclui seleção baseada em tamanho, por exemplo, uma separação dependente do tamanho, por exemplo, por uma ou mais de cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca de íon, ou filtração.

Em uma concretização, o precursor de composição de LMWH é uma preparação tendo um comprimento de cadeia médio de cerca de 8 a 14 dissacarídeos, por exemplo, 8 a 12 dissacarídeos. Em uma concretização preferida, foi ele obtido por um método incluindo precipitação de sal e digestão enzimática de uma preparação de peso molecular mais alto, por exemplo, UFH. Em uma concretização, o sal é um sal de um cátion monovalente ou divalente. Exemplos de cátions monovalente e divalente que podem ser usados incluem, por exemplo, sódio, potássio, rubídio, cézio, bário, cálcio, magnésio, estrôncio, e combinações destes. Em uma concretização, o sal de cátion monovalente e divalente é um acetato de um cátion monovalente ou divalente.

Em uma concretização, a enzima (ou enzimas) usada para digestão cliva em uma ou mais ligações glicosídicas de ácidos urônicos não-sulfatados, por exemplo, adjacentes a um resíduo de N-acetil glucosamina. Exemplos de enzimas que podem ser usadas incluem, por exemplo, heparinase III, mutantes de heparinase III, por exemplo, mutante de heparinase III descrito na Patente dos Estados Unidos Número 5.896.789 (por exemplo, um mutante de heparinase III tendo um ou mais resíduo de histidina selecio-

nado a partir do grupo consistindo em His, His105, His110, His139, His152, His225, His 234, His241, His424, His469 e His539 foi substituído com uma alanina), e sulfato de heparina glicosaminoglican liase III de *Bacterioides thetaiotaomicron*. Em uma concretização preferida, a enzima usada para digestão é uma heparinase III mutada tendo uma alanina no resíduo 225 da sequência de aminoácido substituída com uma alanina.

Em uma concretização preferida, a composição precursora pode ser obtida por:

(1) sujeição de uma amostra contendo glicosaminoglican, por exemplo, UFH, a uma primeira de uma precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, um álcool, por exemplo, etanol), um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água), e um sal (por exemplo, um sal de sódio, por exemplo, acetato de sódio, ou um sal de cálcio, por exemplo, acetato de cálcio), para proporcionar um primeiro sobrenadante;

(2) sujeição do primeiro sobrenadante a uma segunda precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, um álcool, por exemplo, etanol), e um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água), para produzir um precipitado (isto pode ser usado para proporcionar uma fração de movimento rápido conforme discutido em outra parte aqui);

(3) solubilização do precipitado, e clivagem do precipitado solubilizado com uma enzima heparinase III, preferivelmente MO11, preferivelmente na presença de acetato de sódio, e preferivelmente para completação, por exemplo, conforme indicado por um absorção de UV de mais do que 9,8, para proporcionar uma preparação clivada.

Em um aspecto, a invenção caracteriza um método de produção de uma composição de LMWH, por exemplo, uma composição de LMWH aqui descrita. O método inclui:

(1) sujeição de uma amostra contendo glicosaminoglican (GAG), por exemplo, UFH, a uma primeira de uma precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, álcool, por exemplo, etanol), um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água), e um sal de sódio (por exemplo, acetato de sódio), para proporcionar um primeiro sobrenadante;

(2) sujeição do primeiro sobrenadante a uma segunda precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, um álcool, por exemplo, etanol), e um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água), para produzir um precipitado (isto pode ser usado para proporcionar uma fração de movimento rápido conforme discutido em outra parte aqui);

(3) opcionalmente solubilização do precipitado e clivagem do precipitado solubilizado com uma enzima aqui descrita, preferivelmente na presença de acetato de sódio, e preferivelmente para completação como, por exemplo, indicado por absorção de UV de mais do que 9,8, para proporcionar uma preparação clivada; e

(4) opcionalmente processamento da fração para produzir uma preparação de LMWH.

Em uma concretização, a enzima (ou enzimas) usada para digestão cliva em uma ou mais ligações glicosídicas de ácidos urônicos não-sulfatados, por exemplo, adjacentes a um resíduo de N-acetil glucosamina. Exemplos de enzimas que podem ser usadas incluem, por exemplo, heparinase III, mutantes de heparinase III, por exemplo, um mutante de heparinase III descrito na Patente dos Estados Unidos Número 5.896.789 (por exemplo, um mutante de heparinase III tendo um ou mais resíduo de histidina selecionado a partir do grupo consistindo em His, His105, His110, His139, His152, His225, His 234, His241, His424, His469 e His539 foi substituído com uma alanina), e sulfato de heparina glicosaminoglican liase III de *Bacterioides thetaiotaomicron*. Em uma concretização preferida, a enzima usada para digestão é uma heparinase III mutada tendo uma alanina no resíduo 225 da sequência de aminoácido substituída com uma alanina.

Em uma concretização, a fração digerida é o produto final. Em outras concretizações, o método pode incluir uma ou mais etapas de processamento adicionais para obter um produto final. Em uma concretização, o método inclui processamento da fração digerida para obter uma composição de LMWH tendo um comprimento médio de cadeia de 9 a 16 dissacarídeos. Em uma concretização, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca de íon, e/ou filtração, podem ser usadas para obter uma compo-

sição de LMWH tendo um comprimento médio de cadeia de 9 a 16 dissacáridos.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza métodos de avaliação e processamento de um GAG, tal como UFH, para determinar a adequabilidade do GAG para processamento em uma composição de LMWH, por exemplo, uma composição de LMWH aqui descrita. O método inclui determinar a quantidade de N-acetil presente em uma preparação de GAG, comparando a quantidade a um critério pré-selecionado, e tomando uma decisão sobre a preparação de GAG baseado se o critério pré-selecionado é encontrado. Em uma concretização preferida, uma decisão ou etapa é tomada, por exemplo, a preparação de GAG é classificada, aceita ou descartada, processada em uma substância de fármaco ou produto de fármaco, ou um registro produzido ou alterado para refletir a determinação, dependendo se o critério pré-selecionado é encontrado. Em algumas concretizações, quando o critério pré-selecionado é encontrado, uma decisão pode ser feita sobre alterar uma ou mais etapas no fabricação de uma composição de LMWH.

Em uma concretização, o critério pré-selecionado é N-acetil presente na preparação de GAG em uma quantidade de cerca de 11%, ou mais alta, conforme determinado por mol% relativo ao teor de glucosamina total. Uma preparação de GAG tendo teor de N-acetil dentro desta faixa é indicativa de uma preparação de GAG adequada para processamento em uma composição de LMWH, por exemplo, uma composição de LMWH aqui descrita. Em tais concretizações, quando este critério pré-selecionado é encontrado, a preparação de GAG é aceita e processada em intermediários, substância de fármaco, ou produto de fármaco.

Em uma concretização, a quantidade de N-acetil presente na preparação de GAG pode ser determinada usando-se, por exemplo, ressonância magnética nuclear (RMN).

Em concretizações preferidas, os métodos aqui descritos são úteis de um ponto de vista de processo, por exemplo, para monitorar ou assegurar consistência de batelada-para-batelada ou qualidade, ou para avaliar uma amostra com relação a um critério pré-selecionado.

Em um aspecto, a invenção caracteriza um método de avaliar ou processar uma preparação de LMWH intermediária, por exemplo, produzida por um método aqui descrito, para determinar a adequabilidade da preparação intermediária para processamento em uma composição de LMWH. A

5 preparação intermediária de LMWH é uma fração de movimento rápido obtida, por exemplo, por precipitação de sal com sódio ou acetato de sódio, de uma amostra contendo glicosaminoglican (GAG) em um solvente conforme aqui descrito. O método inclui comparar a quantidade de um ou mais de porções estruturais, por exemplo, um ou mais de ácido idurônico sulfatado, he-

10 xosamina N-sulfatada ligada a ácido urônico, epóxido e 6-O hexosamina sulfatada, na preparação de LMWH intermediária para a quantidade da mesma porção estrutural em um material de partida de heparina não-fracionada, e tomando uma decisão sobre a preparação de LMWH intermediária baseada se um critério pré-selecionado entre o material de partida e a preparação de

15 LMWH intermediária é encontrado. Em algumas concretizações, quando o critério pré-selecionado não é encontrado, uma decisão pode ser feita sobre alterar uma ou mais etapas no fabricação de uma composição de LMWH.

Em uma concretização, o critério pré-selecionado é uma diminuição no ácido idurônico sulfatado na preparação intermediária, conforme

20 comparado ao material de partida. Uma preparação intermediária tendo um teor diminuído de ácido idurônico sulfatado é indicativa de uma preparação intermediária adequada para processamento adicional em uma composição de LMWH, por exemplo, uma composição de LMWH aqui descrita. Em tais concretizações, quando este critério pré-selecionado é encontrado, a prepa-

25 ração intermediária é aceita e processada em intermediários adicionais, substância de fármaco, ou produto de fármaco.

Em uma concretização, o critério pré-selecionado é um aumento na hexosamina N-sulfatada ligada a ácido urônico (por exemplo, ácido idurônico e/ou glucorônico), na preparação intermediária, conforme comparado

30 ao material de partida. Uma preparação intermediária tendo uma hexosamina N-sulfatada ligada a ácido urônico é indicativa de uma preparação intermediária adequada para processamento adicional em uma composição de

LMWH, por exemplo, uma composição de LMWH aqui descrita. Em tais concretizações, quando este critério pré-selecionado é encontrado, a preparação intermediária é aceita e processada em intermediários adicionais, substância de fármaco, ou produto de fármaco.

- 5 Em uma concretização, o critério pré-selecionado é uma diminuição no epóxido na preparação intermediária, conforme comparado ao material de partida. Uma preparação intermediária tendo um teor diminuído de epóxido é indicativa de uma preparação intermediária adequada para processamento adicional em uma composição de LMWH, por exemplo, uma
- 10 composição de LMWH aqui descrita. Em tais concretizações, quando este critério pré-selecionado é encontrado, a preparação intermediária é aceita e processada em intermediários adicionais, substância de fármaco, ou produto de fármaco.

- Em uma concretização, o critério pré-selecionado é um aumento
- 15 na hexosamina 6-O sulfatada na preparação intermediária, conforme comparado ao material de partida. Uma preparação intermediária tendo hexosamina 6-O sulfatada é indicativa de uma preparação intermediária adequada para processamento adicional em uma composição de LMWH, por exemplo, uma composição de LMWH aqui descrita. Em tais concretizações, quando
- 20 este critério pré-selecionado é encontrado, a preparação intermediária é aceita e processada em intermediários adicionais, substância de fármaco, ou produto de fármaco.

- Em uma concretização, a quantidade de uma porção estrutural no material de partida e/ou preparação intermediária é determinada usando-
- 25 se um ou mais de ressonância magnética nuclear (RMN), eletroforese capilar (CE), e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

- Em concretizações preferidas, os métodos aqui descritos são úteis de um ponto de vista de processo, por exemplo, para monitorar ou assegurar consistência de batelada-para-batelada ou qualidade, ou para avaliar
- 30 ar uma amostra com relação a um critério pré-selecionado.

Certas características podem produzir uma amostra de UFH, um material de partida mais preferido para produção de uma LMWH das inven-

ções. Consequentemente, em outro aspecto, a invenção proporciona um método de avaliar uma preparação de UFH como um material de partida para produzir uma composição de LMWH aqui descrita.

- O método inclui proporcionar uma avaliação da preparação de
- 5 UFH para um parâmetro relacionado à adequabilidade da amostra de UFH para uso na produção de uma LMWH aqui descrita; e, opcionalmente, proporcionar uma determinação de se um valor (por exemplo, um valor correlacionado à presença, quantidade, distribuição, ou ausência) determinado para o parâmetro se encontra em um critério pré-selecionado, por exemplo, está
- 10 presente, ou está presente dentro de uma faixa pré-selecionada, avaliando, desse modo, a amostra de UFH.

Em uma concretização preferida, o critério é satisfeito, e a amostra de UFH é selecionada e processada na LMWH.

- Em uma concretização preferida, o parâmetro é a presença ou
- 15 quantidade de uma estrutura listada na Tabela 2, preferivelmente uma relacionada à eficiência de uma etapa no método de produção da LMWH, por exemplo, uma estrutura que promove, ou está positivamente correlacionada com clivagem por uma heparinase, por exemplo, $H_{Nac(interno)}$.

- Em uma concretização preferida, o método inclui determinar se a
- 20 quantidade de $H_{Nac(interno)}$ na amostra de UFH tem um relacionamento predeterminado com uma referência, por exemplo, é igual a ou maior do que um valor de referência pré-selecionado.

- Em uma concretização preferida, um valor para o parâmetro em um intermediário usado na produção da LMWH é também determinado e,
- 25 opcionalmente, este valor deve também encontrar um critério predeterminado para selecionar a UFH para uso na produção de LMWH.

Em um aspecto, a invenção proporciona um método de avaliar uma preparação de UFH, como um material de partida, para produzir uma composição de LMWH aqui descrita.

- O método inclui opcionalmente realizar uma operação, por exemplo, uma precipitação, na amostra de UFH para proporcionar um intermediário (preferivelmente as etapas usadas para produzir este intermediário
- 30

e o intermediário são os mesmos conforme as etapas e um intermediário do método usado para produzir a LMWH); provisão de uma avaliação da preparação intermediária para um parâmetro relacionado à adequabilidade da amostra de UFH para uso na produção de uma LMWH aqui descrita; e, op-

5 cionalmente, provisão de uma determinação de se um valor (por exemplo, um valor correlacionado à presença, quantidade, distribuição, ou ausência) determinado para o parâmetro se encontra em um critério pré-selecionado, por exemplo, está presente, ou está presente dentro de uma faixa pré-selecionada, avaliando, desse modo, a preparação de UFH.

10 Em uma concretização preferida, o critério é satisfeito, e a amostra de UFH é selecionada e processada na LMWH.

 Em uma concretização preferida, o parâmetro é a presença ou quantidade de uma estrutura listada na Tabela 2, preferivelmente uma relacionada à eficiência de uma etapa no método de produção da LMWH, por

15 exemplo, uma estrutura que promove, ou está positivamente correlacionada com clivagem por uma heparinase, por exemplo, $H_{Nac(interno)}$.

 Em uma concretização preferida, o método inclui determinar se a quantidade de $H_{Nac(interno)}$ na amostra de intermediário tem um relacionamento predeterminado com uma referência, por exemplo, é igual a ou maior do

20 que um valor de referência pré-selecionado.

 Em uma concretização preferida, um valor para o parâmetro na UFH é também determinado e, opcionalmente, este valor também encontra um critério predeterminado para selecionar a UFH para uso na produção de LMWH.

25 Em concretizações preferidas de qualquer destes métodos, uma decisão ou etapa é tomada, por exemplo, a amostra é classificada, selecionada, aceita ou descartada, liberada ou retida, processada em um produto de fármaco, carregada, movida para um local diferente, formulada, rotulada, acondicionada, liberada no comércio, ou vendida ou oferecida para venda,

30 ou registrada ou alterada para refletir a determinação, dependendo se o critério pré-selecionado é encontrado. Por exemplo, baseado no resultado da determinação, ou se uma ou mais entidades objeto está presente, ou após

comparação a um padrão de referência, a batelada da qual a amostra é tomada pode ser processada, por exemplo, conforme imediatamente descrito.

Em qualquer método, uma concretização preferida inclui analisar a amostra com RMN.

5 Em uma concretização preferida, qualquer método pode incluir provisão de uma comparação do valor determinado para um parâmetro com um valor ou valores de referência, para, desse modo, avaliar a amostra. Em concretizações preferidas, a comparação inclui determinar se o valor de teste tem um relacionamento pré-selecionado com o valor de referência, por
10 exemplo, determinar se ele encontra o valor de referência. O valor não necessita ser um valor numérico, mas, por exemplo, pode ser meramente uma indicação de se a entidade objeto está presente.

 Uma concretização preferida de qualquer método pode incluir determinar se um valor de teste é igual a ou maior do que um valor de referência, se é menor do que ou igual a um valor de referência, ou se cai dentro
15 de uma faixa (ou inclusive ou exclusive de um ou ambos pontos).

 Em concretizações preferidas de qualquer método, o valor de teste, ou uma indicação de se o critério pré-selecionado é encontrado, pode ser memorizado, por exemplo, em um registro de leitura de computador.

20 Em concretizações preferidas de qualquer método, o intermediário é preparado por uma ou mais, ou todas das seguintes etapas:

 (1) sujeição de uma amostra de UFH a uma primeira de uma precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, um álcool, por exemplo, etanol), um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água), e um sal (por exemplo, um sal de sódio, por exemplo, acetato de sódio), para proporcionar um primeiro sobrenadante;

 (2) sujeição do primeiro sobrenadante a uma segunda precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, um álcool, por exemplo, etanol), e um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água),
30 para produzir um precipitado (isto pode ser usado para proporcionar uma fração de movimento rápido conforme discutido em outra parte aqui);

 (3a) solubilização do precipitado, preferivelmente em água;

(3b) clivagem do precipitado solubilizado com uma enzima (ou enzimas) que cliva ligações glicosídicas de ácido urônico não-sulfatado, por exemplo, adjacentes a um resíduo de N-acetil glucosamina, por exemplo, enzima heparinase III, preferivelmente MO11, preferivelmente na presença
5 de acetato de sódio, e, preferivelmente, para completação, por exemplo, conforme indicado por uma absorção de UV de mais do que 9,8, para proporcionar uma preparação clivada.

O intermediário preferido é aquele produzido na etapa (2) ou (3a), embora o método possa usar outros.

10 Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de avaliação de uma preparação aqui descrita. O método inclui: provisão de uma preparação de LMWH aqui descrita; determinação se uma estrutura, atividade ou função aqui descrita está presente em, ou processada pela preparação, avaliando, desse modo, uma preparação de LMWH aqui descrita. Em uma
15 concretização preferida, a determinação inclui determinação se a estrutura, atividade ou função está presente em um nível pré-selecionado, ou em uma faixa pré-selecionada, por exemplo, um nível ou faixa aqui descrita.

Consequentemente, em um aspecto, a invenção proporciona um método de avaliar ou processar uma composição de LMWH aqui descrita. O
20 método inclui: provisão de uma avaliação de um parâmetro relacionado a um pico listado na Tabela 1A. Tais parâmetros podem incluir, ou serem uma função da presença, distribuição relativa, ou quantidade de um pico, e, opcionalmente, provisão de uma determinação de se um valor (por exemplo, um valor correlacionado à presença, quantidade, ou ausência) determinado
25 para o parâmetro se encontra em um critério pré-selecionado, por exemplo, está presente, ou está presente dentro de uma faixa pré-selecionada, avaliando, desse modo, ou processando a mistura.

Em uma concretização preferida, o método inclui analisar, por exemplo, separar uma digestão da amostra por digestão com heparinase I, heparinase II, heparinase II, por eletroforese, por exemplo, eletroforese capi-
30 lar.

Em uma concretização preferida, o método inclui avaliar uma

amostra para determinar se um ou mais dos picos listados na Tabela 10A está presente.

Em uma concretização preferida, o método inclui provisão de uma comparação do valor determinado para um parâmetro com um valor de referência ou valores, para, desse modo, avaliar a amostra. Em concretizações preferidas, a comparação inclui determinar se o valor de teste tem um relacionamento pré-selecionado com o valor de referência, por exemplo, determinando se encontra-se no valor de referência. O valor não necessita ser um valor numérico, mas, por exemplo, pode ser meramente uma indicação de se a entidade objeto está presente.

Em uma concretização preferida, o método inclui determinar se um valor de teste é igual a ou maior do que um valor de referência, se é menor do que ou igual a um valor de referência, ou se cai dentro de uma faixa (ou inclusive ou exclusive de um ou ambos pontos). Por meio de exemplo, a quantidade de um pico listada na Tabela 10A pode ser determinada e, opcionalmente, mostrada para cair dentro de uma faixa pré-selecionada, por exemplo, uma faixa que corresponde a uma faixa da Tabela 10A. Em uma concretização preferida: a quantidade de cada pico é cerca daquela encontrada na Tabela 10A, a quantidade de cada pico está dentro da faixa provida na Tabela 10A; a quantidade de picos 10 e 11 estão com uma faixa provida na Tabela 10A.

Em concretizações preferidas, o valor de teste, ou uma indicação de se o critério pré-selecionado é encontrado, pode ser memorizado, por exemplo, em um registro de leitura de computador.

Em concretizações preferidas, uma decisão ou etapa é tomada, por exemplo, a amostra é classificada, selecionada, aceita ou descartada, liberada ou retida, processada em um produto de fármaco, carregada, movida para um local diferente, formulada, rotulada, acondicionada, liberada no comércio, ou vendida ou oferecida para venda, ou registrada ou alterada para refletir a determinação, dependendo se o critério pré-selecionado é encontrado. Por exemplo, baseado no resultado da determinação, ou se uma ou mais entidades objeto está presente, ou após comparação a um padrão

de referência, a batelada da qual a amostra é tomada pode ser processada, por exemplo, conforme imediatamente descrito.

As estruturas na Tabela 10A podem ser determinadas usando-se CE, e quando necessário, por outros métodos analíticos.

5 Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de avaliar ou processar uma preparação aqui descrita. O método inclui:

 provisão de uma preparação de LMWH que foi digerida com heparinase I, heparinase II, heparinase III, e separada por uma técnica de separação, tal como CE;

10 determinação se um ou mais dos picos listados na Tabela 10A está presente.

 Em uma concretização preferida, o método inclui determinar se um pico listado na Tabela 10A cai dentro de uma faixa pré-selecionada da Tabela 10A. Em uma concretização preferida: a quantidade de cada pico é
15 cerca daquela encontrada na Tabela 10A, a quantidade de cada pico está dentro de uma faixa provida na Tabela 10A; a quantidade de picos 10 e 11 estão com uma faixa provida na Tabela 10A.

 Em outro aspecto, a invenção proporciona um método de avaliar ou processar uma composição de LMWH aqui descrita.

20 O método inclui provisão de uma avaliação de um parâmetro relacionado à estrutura ou estruturas da Tabela 11A. Tais parâmetros podem incluir, ou serem uma função da presença, distribuição relativa, ou quantidade de uma estrutura, e, opcionalmente, provisão de uma determinação de se um valor (por exemplo, um valor correlacionado à presença, quantidade, ou
25 ausência) determinado para o parâmetro se encontra em um critério pré-selecionado, por exemplo, está presente, ou está presente dentro de uma faixa pré-selecionada, avaliando ou processando, desse modo, a mistura.

 Em uma concretização preferida, o método inclui analisar a composição usando 2D-RMN.

30 Em uma concretização preferida, o método inclui avaliar uma amostra para determinar se uma ou mais das estruturas providas na Tabela 11A está presente.

Em uma concretização preferida, o método inclui provisão de uma comparação do valor determinado para um parâmetro com um valor de referência ou valores, para, desse modo, avaliar a amostra. Em concretizações preferidas, a comparação inclui determinar se o valor de teste tem um
5 relacionamento pré-selecionado com o valor de referência, por exemplo, determinando se encontra-se no valor de referência. O valor não necessita ser um valor numérico, mas, por exemplo, pode ser meramente uma indicação de se a estrutura está presente.

Em uma concretização preferida, o método inclui determinar se
10 um valor de teste é igual a ou maior do que um valor de referência, se é menor do que ou igual a um valor de referência, ou se cai dentro de uma faixa (ou inclusive ou exclusive de um ou ambos pontos). Por meio de exemplo, a quantidade de uma estrutura provida na Tabela 11A pode ser determinada e, opcionalmente, mostrada para cair dentro de uma faixa pré-selecionada, por
15 exemplo, uma faixa que corresponde a uma faixa da Tabela 11A. Em uma concretização preferida: a quantidade de cada estrutura é cerca daquela encontrada na Tabela 11A, a quantidade de cada estrutura está dentro da faixa provida na Tabela 11A.

Em concretizações preferidas, o valor de teste, ou uma indicação
20 ção de se o critério pré-selecionado é encontrado, pode ser memorizado, por exemplo, em um registro de leitura de computador.

Em concretizações preferidas, uma decisão ou etapa é tomada, por exemplo, a amostra é classificada, selecionada, aceita ou descartada, liberada ou retida, processada em um produto de fármaco, carregada, movi-
25 da para um local diferente, formulada, rotulada, acondicionada, liberada no comércio, ou vendida ou oferecida para venda, ou registrada ou alterada para refletir a determinação, dependendo se o critério pré-selecionado é encontrado. Por exemplo, baseado no resultado da determinação, ou se uma ou mais estruturas está presente, ou após comparação a um padrão de refe-
30 rência, a batelada da qual a amostra é tomada pode ser processada, por exemplo, conforme imediatamente descrito.

As estruturas na Tabela 11A podem ser determinadas usando

2D RMN, e quando necessário, por outros métodos analíticos.

Em outro aspecto, a invenção caracteriza um método de avaliar ou processar uma preparação de LMWH aqui descrita. O método inclui provisão de uma preparação de LMWH que foi analisada usando 2D RMN; determinar se uma ou mais da estrutura listada na Tabela 11A está presente.

Em uma concretização preferida, o método inclui determinar se uma estrutura listada na Tabela 11A cai dentro de uma faixa pré-selecionada, por exemplo, uma faixa que corresponde a uma faixa 1 da tabela 11A. Em uma concretização preferida: a quantidade de cada estrutura é cerca daquela encontrada na Tabela 11A, a quantidade de cada estrutura está dentro de uma faixa provida na Tabela 11A.

Alguns métodos aqui descritos incluem produção de uma determinação de se uma entidade objeto está presente em um nível pré-selecionado, ou dentro de uma faixa pré-selecionada, e que nível ou faixa é expressa em unidades específicas de medição, por exemplo, mol%, por exemplo, presente em uma faixa de X-Y mol%. Pode-se realizar o método pela determinação da quantidade de entidade objeto em termos de mol% e, em seguida, comparar aquele com uma referência expressa em mol%, neste exemplo, X-Y mol%. Não se necessita, contudo, fazer a medição em termos de mol% e compará-la com valores de referência expressos em mol%. A amostra tem um nível atual de entidade objeto, que pode ser expresso como X-Y quando descrito em unidades de mol%. O nível atual pode ser expresso em outras unidades, por exemplo, peso%. O nível atual é o mesmo, indiferente das unidades nas quais ele é expresso. A especificação de mol% no método é meramente para indicar a prevalência atual da entidade objeto. O nível de entidade objeto pode ser medido em termos de outras unidades, e o valor de referência pode ser expresso em termos de outras unidades, considerando-se que o valor de referência, conforme expresso em termos de unidades alternativas, corresponde à mesma quantidade de entidade objeto conforme o valor de referência expresso em mol%, por exemplo, X-Y mol%, neste exemplo. Desse modo, um método que requer mostrar a entidade objeto está presente em X-Y mol% pode ser realizado mostrando-se que a en-

tidade objeto está presente em uma faixa expressa em uma unidade alternativa de medida, por exemplo, peso%, número de cadeia, ou %AUC, no qual a faixa, conforme descrita na unidade alternativa de medida, corresponde à mesma quantidade de entidade objeto que daria o mol% referido a, neste exemplo, X-Y mol%.

Pode-se estabelecer uma faixa equivalente de funcionalidade para uma unidade alternativa de medida pela aplicação de métodos conhecidos na técnica em conjunto com esta especificação. Por exemplo, podem-se proporcionar amostras na faixa de X-Y mol%, e, em seguida, estabelecer a faixa correspondente em termos de uma unidade alternativa de medida.

Outras características e vantagens da invenção tornar-se-ão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada, e a partir das reivindicações.

Descrição dos Desenhos

Os desenhos são primeiro brevemente descritos.

A figura 1 é um fluxograma representando as quatro etapas de processo de fabricação de M118-REH.

A figura 2A é um gráfico representando o perfil de eletroforese capilar de enoxaparina digerida com heparinase I, heparinase II, heparinase III. A figura 2B é um gráfico representando o perfil de eletroforese capilar de M118-REH digerido com heparinase I, heparinase II e heparinase III.

A figura 3 é um gráfico representando uma comparação dos perfis de UV e de fluorescência gerados por etiquetação pós-coluna para uma digestão de M118-REH analisado por HPLC RP de emparelhamento de Íon. O rastreo superior reflete detecção de UV 232 nm, e o rastreo de fundo reflete detecção de fluorescência a 410 nm. As espécies etiquetadas por setas aparecem principalmente no perfil de fluorescência, e não são observadas no perfil de UV; elas representam sacarídeos de extremidade de não-redução de cadeias de M118-REH que ocorrem a partir da UFH de partida.

A figura 4 é um gráfico representando uma análise bidimensional de RMN HSQC de M118-REH.

A figura 5 é um diagrama representando formação de extremi-

dades de redução e de não-redução.

A figura 6 é um fluxograma do processo de fabricação de M118-REH injetável.

A figura 7 é um gráfico representando neutralização de LMWHs por sulfato de protamina. "M118" (estenografado nesta figura para M118-REH) é representado por um ponto mais claro; enoxaparina sódio é representada por um ponto mais escuro. O gráfico foi plotado com percentagem de atividade de anti-Xa remanescente contra a razão de protamina para atividade de LMWHs.

A figura 8 é um gráfico representando liberação de TFPI de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) por heparinas diferentes a 0,01 mg/ml (cavidades $n = 3$, média $\pm$ STDEM). Existe uma significância estatística entre M118 que é estenografado para M118-REH nesta figura) (segunda barra a partir da esquerda em cada grupo), e controle (primeira barra a partir da esquerda em cada grupo), e grupos de controle ($p < 0,01$) após ambas 24 e 48 horas de incubação.

A figura 9 é um gráfico representando as farmacodinâmicas de M118-REH pela medição de ACT e aPTT após injeção intravenosa no modelo de NHP.

A figura 10 é um gráfico representando comparação de TTO de M118-REH 0,5 (terceira coluna) e 1 mg/kg (sexta coluna) com enoxaparina sódio 2, 3 e 4 mg/kg (segunda, quarta e quinta, respectivamente) intravenosamente injetado em modelo de trombose induzido por cloreto férrico. Todos os grupos de tratamento têm TTO mais longo significante com Controle (primeira coluna). Existe uma diferença estatística significante entre M118-REH (1 mg/kg) e enoxaparina sódio 3 mg/kg ($p < 0,01$).

A figura 11 é um gráfico representando neutralização de atividade de anti-Xa em modelo de rato Sprague-Dawley (M118-REH, enoxaparina sódio e UFH) por sulfato de protamina. O gráfico foi plotado com percentagem de atividade de anti-Xa remanescente versus tempo em razões de 0,5 ou 1 mg: 100 anti-Xa IU de protamina para heparina (ou 0,5 ou 1 mg: 1 mg em caso de UFH).

A figura 12 é um gráfico representando correlação de medição de ACT e atividade de anti-Xa de M118-REH (triângulo e linha), enoxaparina (círculo aberto com linha tracejada), e UFH (quadrado com linha tracejada). Os dados sugerem que o M118-REH em doses especificadas demonstra a
5 melhor correlação de ACT com atividade de anti-Xa quando comparado a enoxaparina ou UFH ($r^2=0,85$).

figura 13. Atividade de Antifator Xa (topo) e Atividade de Antifator IIa versus tempo em um modelo canino de trombose arterial profunda (modelo de Lucchesi). O grupo de controle de veículo mostrado nos gráficos
10 subsequentemente recebeu M118-REH a 150 IU/kg. As barras de erro são $\pm$ SE. UFH, heparina não-fracionada.

figura 14. Correlação de atividades de antifator Xa e IIa em um modelo canino de trombose arterial profunda (modelo de Lucchesi). Os pontos individuais representam dados de um animal simples. Todos os animais
15 em todos os grupos de tratamento são mostrados. Os coeficientes de correlação (r^2) foram 0,890 e 0,465 nos grupos de M118-REH e heparina não-fracionada (UHF), respectivamente.

figura 15. Razão de Antifator Xa:IIa sobre o tempo em um modelo canino de trombose arterial profunda. As barras de erro são $\pm$ SE (metades de topo somente são mostradas para maximizar clareza). UFH, heparina
20 não-fracionada.

figura 16. Atividade de coagulação versus tempo conforme avaliada por ensaios de ACT (*topo*), aPTT (*parte intermediária*), e PT (*fundo*) em um modelo canino de trombose arterial profunda. O grupo de controle de
25 veículo mostrado nos gráficos subsequentemente recebeu M118-REH a 150 IU/kg. As barras de erro são $\pm$ SE. UFH, heparina não-fracionada.

figura 17. Percentagem de animais com artérias femorais ocluídas em um modelo canino de trombose arterial profunda. Os animais foram monitorados por fluxo de Doppler por até 180 minutos pós iniciação corrente.
30 A oclusão foi definida como fluxo de sangue através de artéria prejudicada que foi $\leq 2\%$ de fluxo de linha de base. UFH, heparina não-fracionada.

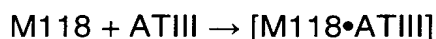
Descrição Detalhada

LMWHs Otimizadas

Em muitos cenários clínicos, preparações de LMWH comercialmente disponíveis são preferidas sobre preparações de UFH porque as LMWHs têm farmacocinéticas mais prognosticáveis, e podem ser administradas subcutaneamente. Contudo, as preparações de LMWH atualmente disponíveis carecem de muitas propriedades desejáveis de UFH, tais como atividade de anti-IIa substancial, reversibilidade (ou neutrabilidade) com sulfato de protamina, e monitorabilidade. Desse modo, existem cenários clínicos onde LMWHs não são uma escolha de tratamento ótima ou prática. A invenção caracteriza preparações de LMWH designadas para terem propriedades que são clinicamente vantajosas, por exemplo, sobre outras preparações de LMWH comercialmente disponíveis, e preparações de UFH. Tais propriedades incluem, por exemplo, um ou mais de: reversibilidade com sulfato de protamina; farmacocinéticas diagnosticáveis, atividade de anti-IIa; razão de atividade de anti-Xa substancialmente constante para atividade de anti-IIa; níveis de atividade monitoráveis por testes padrões, tais como, por exemplo, ACT ou aPTT; biodisponibilidade subcutânea; e ocorrência reduzida de HIT.

Atividade de anti-IIa

As preparações de LMWH são aqui descritas que incluem um número significativo de cadeias de comprimento suficiente (que podem ser descritos, por exemplo, em termos de comprimento de cadeia médio da preparação, e/ou peso molecular médio de peso da preparação) para proporcionar atividade de anti-IIa, por exemplo, atividade de anti-IIa de cerca de 50 a 300 IU/mg, cerca de 70 a 280 IU/mg, cerca de 90 a 250 IU/mg, cerca de 100 a 140 IU/mg, cerca de 150 a cerca de 200 IU/mg, cerca de 130 a 190 IU/mg, cerca de 155 a 195 IU/mg. A atividade de anti-IIa é calculada em Unidades Internacionais de atividade de anti-IIa por miligrama usando os métodos estatísticos para ensaios de linha paralela. Os níveis de atividade de anti-IIa aqui descritos são medidos usando o seguinte princípio:



IIa



IIa(Excesso) + Substrato $\rightarrow$ Peptídeo + pNA(medido espectrofotometricamente).

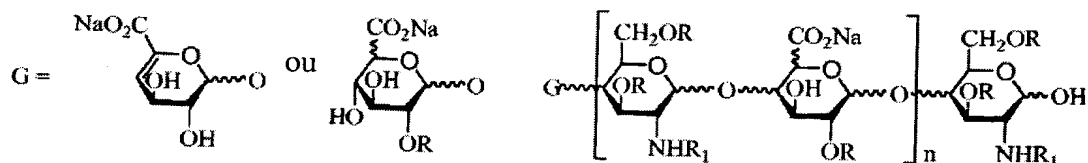
A atividade antifator IIa é determinada pelo efeito de potencialização de amostra no antitrombina (ATIII) na inibição de trombina. O excesso de trombina pode ser indiretamente espectrofotometricamente medido. A atividade de antifator IIa pode ser medida, por exemplo, em um analisador Diagnostica Stago, ou em um sistema de Coagulação ACL Futura™, com reagentes de Chromogenix (substrato S-2238, Thrombin (53nkat/frasco), e Antithrombin), ou em qualquer sistema equivalente. A resposta do analisador é calibrada usando-se o 2º Padrão Internacional de Heparina de Baixo Peso Molecular.

Comprimento de Cadeia/Peso Molecular

Uma determinação de se uma preparação de LMWH inclui cadeias de comprimento de cadeia suficiente pode ser feita, por exemplo, pela determinação do comprimento de cadeia médio das cadeias na preparação de LMWH, e/ou pela determinação do peso molecular médio de peso de cadeias dentro da preparação de LMWH. Quando o comprimento de cadeia médio é determinado, um comprimento de cadeia médio de cerca de 5 a 20, por exemplo, 7 a 18, preferivelmente cerca de 9 a 16, ou 8 a 14 repetições de dissacarídeo, indica que um número significativo de cadeias na preparação de LMWH são de comprimento de cadeia suficiente.

"Comprimento de cadeia médio", conforme aqui usado, se refere ao comprimento de cadeia médio de repetições de ácido urônico/hexosamina dissacarídeo que ocorrem dentro de uma cadeia. A presença de blocos de construção de ácido urônico e/ou não-hexosamina (por exemplo, porções de PEG fixadas) não estão incluídas na determinação do comprimento de cadeia médio. O comprimento de cadeia médio é determinado pela divisão do número de peso molecular médio (Mn) pelo número de peso molecular médio para um dissacarídeo (500 Da). Os métodos de determinar o número de peso molecular médio são descritos abaixo usando-se SEC MALS.

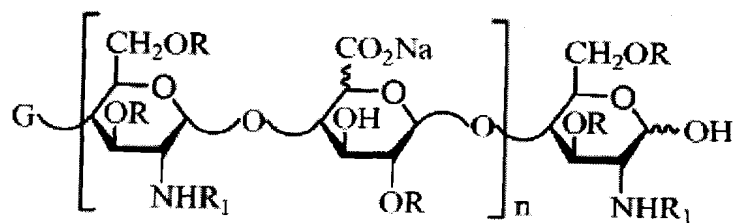
Exemplos de tais preparações de LMWH incluem o seguinte:



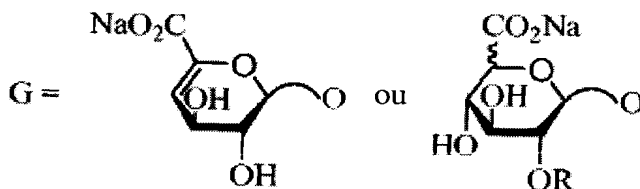
no qual R é H ou SO_3X ;

R_1 é SO_3X ou COCH_3 , e X é um cátion monovalente ou divalente (por exemplo, Na ou Ca);

5 e n médio é cerca de 9 a 16, ou 8 a 15;



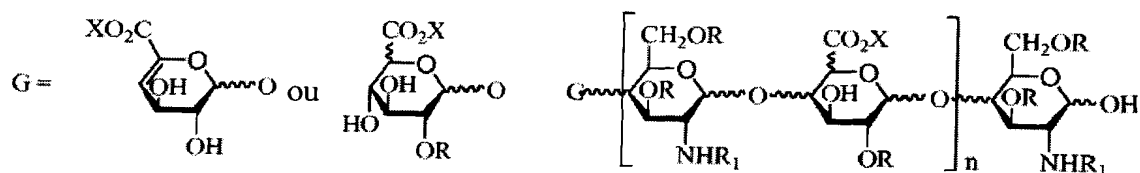
no qual



no qual R é H ou SO_3X ;

R_1 é SO_3X ou COCH_3 , e X é um cátion monovalente ou divalente (por exemplo, Na ou Ca);

10 e n médio é cerca de 9 a 16, ou 8 a 15;



no qual

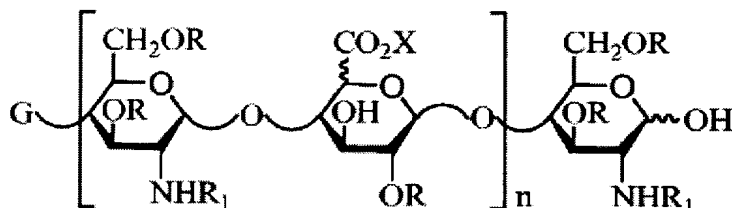
X é um cátion monovalente ou divalente (por exemplo, Na ou Ca);

15

R é H ou SO_3X ,

R_1 é SO_3X ou COCH_3 , e

n médio é cerca de 8 a 12, ou 7 a 11; e



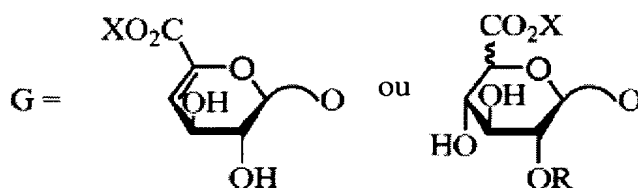
no qual

X é um cátion monovalente ou divalente (por exemplo, Na ou Ca);

R é H ou SO_3X ,

5 R1 é SO_3X ou COCH_3 , e

n médio é cerca de 8 a 12, ou 7 a 11; e



Quando o peso molecular médio de peso de uma preparação é determinado, um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da, cerca de 5000 a 8300 Da, preferivelmente cerca de 5500 a 8000 Da, cerca de 5700 a 7900, ou cerca de 5800 a 6800 Da, indica que um número significativo de cadeias na preparação é de comprimento de cadeia suficiente.

"Peso molecular médio de peso", conforme aqui usado, se refere à média de peso em daltons de cadeias de repetições de ácido urônico/hexosamina dissacarídeo. A presença de blocos de construção de ácido não-urônico e/ou não-hexosamina não está incluída na determinação do peso molecular médio de peso. Desse modo, o peso molecular médio de blocos de construção de ácido não-urônico e não-hexosamina dentro de uma cadeia ou cadeias na preparação, não deve estar incluído na determinação do peso molecular médio de peso. O peso molecular médio de peso (M_w) é calculado a partir da seguinte equação: $M_w = \sum(c_i m_i) / \sum c_i$. A variável c_i é a concentração do polímero na porção i e M_i é o peso molecular do polímero

na porção i. As somas são tomadas sobre um pico cromatográfico, que contém muitas porções de dados. Uma porção de dados pode ser representada como uma linha vertical em um gráfico de picos cromatográficos versus tempo. O pico de eluição pode, portanto, ser dividido em muitas porções. O cálculo do peso molecular médio de peso é dependente da média da soma de todas as porções da concentração e peso molecular. O peso molecular médio de peso pode ser medido, por exemplo, usando-se o software Wyatt Astra, ou qualquer software apropriado. O peso molecular médio de peso aqui descrito é determinado pela cromatografia líquida alta com duas colunas em série, por exemplo, um TSK G3000 SWXL e um G2000 SWXL, acoplado com um detector de difusão de luz de multi-ângulo e um detector refratométrico em série. O eluente usado é um sulfato de sódio 0,2, pH 5,0, e uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min.

Estrutura Terminal de Não-Redução

Em adição ao comprimento de cadeia, cerca de 5 a 15 mol%, 7 a 14 mol%, ou 9 a 12 mol% das cadeias em uma preparação podem ter $\Delta\text{UH}_{\text{Nac,6S}}\text{GH}_{\text{NS,3S,6S}}$ em, ou dentro de cerca de dois, quatro ou seis monossacarídeos a partir da extremidade de não-redução da cadeia. Os métodos que podem ser usados para quantificar esta estrutura incluem, por exemplo, eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), por exemplo, cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RPHPLC). Para quantificar o mol% de $\Delta\text{UH}_{\text{Nac,6S}}\text{GH}_{\text{NS,3S,6S}}$ em uma preparação de LMWH, um fator de resposta (RF) para $\Delta\text{UH}_{\text{Nac,6S}}\text{GH}_{\text{NS,3S,6S}}$ pode ser determinado. A determinação pode também incluir o RF para todas as espécies obtidas, por exemplo, usando-se CE ou HPLC, por exemplo, um método de CE aqui descrito. Para obter o RF para uma espécie ou todas as espécies obtidas por CE, por exemplo, um método de CE aqui descrito, concentrações conhecidas de um padrão para a espécie ou uma ou mais das espécies podem ser injetadas no CE e usadas para determinar um RF para cada. O RF pode, em seguida, ser usado para determinar o mol%. Conforme aqui descrito, a amostra tem um nível atual de uma estrutura, que pode ser expressa, por exemplo, como 5 a 15 quando descrita em unidades de mol%.

O nível atual pode também ser expresso em outras unidades, por exemplo, peso%. O nível atual é o mesmo, indiferente das unidades em que ele é expresso. A especificação de mol% no método é meramente para indicar a prevalência atual da estrutura. O nível de estrutura pode ser medido em termos de outras unidades, e o valor de referência pode ser expresso em termos de outras unidades, considerando-se que o valor de referência conforme expresso em termos de unidades alternativas corresponde à mesma quantidade de estrutura conforme o valor de referência expresso em mol%, 5 a 15 mol% neste exemplo. Desse modo, um método que requer mostrar a estrutura estar presente em 5 a 15 mol% pode ser realizado mostrando-se que a estrutura está presente em uma faixa expressa em uma unidade alternativa de medida, por exemplo, peso%, número de cadeia, ou AUC%, no qual a faixa, conforme descrito na unidade alternativa de medida, corresponde à mesma quantidade da estrutura que daria o mol% referido a, neste exemplo, 5 a 15 mol%.

Uma operação de LMWH aqui descrita pode ter uma mistura de Δ U e ácido idurônico (I)/ácido glucurônico (G), e a extremidade de não-redução das cadeias na preparação. A nomenclatura " Δ U" se refere a ácido urônico insaturado (ácido idurônico (I), ácido glucurônico (G) ou ácido galacturônico) que tem uma ligação dupla introduzida na posição 4-5 como um resultado, por exemplo, da ação de liase de uma heparinase, uma liase HS-GAG, ou outra enzima tendo especificidade de substrato similar. Preferivelmente, cerca de 15% a 35%, 20 a 30% (por exemplo, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%) do número total de cadeias na preparação tem um Δ U na extremidade de não-redução da cadeia. A quantidade de Δ U na extremidade de não-redução de cadeias dentro da amostra pode ser determinada usando-se, por exemplo, 2D-RMN. Em tais métodos, o número total de cadeias tendo uma hexosamina acetilada (H_{NAC}) na extremidade de redução e/ou o número de confirmações de anel aberto na extremidade de redução pode ser usado para determinar o número total de cadeias dentro da preparação. A porcentagem total de cadeias tendo um Δ U e/ou I/G na extremidade de redução pode ser comparada ao número total de cadeias na preparação. Preferivel-

mente, nas preparações de LMWH aqui descritas, menos do que 90%, 95%, 98%, 99%, ou nenhuma das cadeias na preparação, têm um ΔU sulfatado na extremidade de não-redução.

Estruturas de Extremidade de Redução

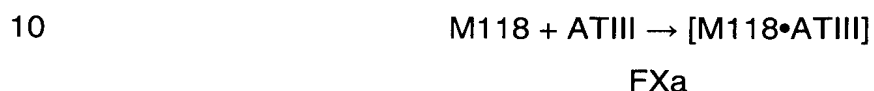
5 Em alguns exemplos, uma preparação de LMWH aqui provida não tem substancialmente estruturas de extremidade de redução modificadas. Em concretizações preferidas, pelo menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou todas as cadeias na preparação de LMWH, têm uma estrutura de extremidade de redução não-modificada.

10 Uma "estrutura de extremidade de redução modificada" se refere a uma estrutura que ocorre na extremidade de redução de cadeias na preparação devido ao processo de isolar ou preparar a preparação de fontes naturais. Por exemplo, muitas preparações de LMWH comercialmente disponíveis são derivadas de heparina não-fracionada, principalmente através de
 15 despolimerização química ou enzimática das cadeias de polissacarídeos. Um processo usado para produzir uma LMWH pode causar uma ou mais modificações estruturais únicas à extremidade de redução de cadeias de polissacarídeos de material de partida de uma fonte natural. Por exemplo, a despolimerização de ácido nitroso de heparina resulta na formação de uma
 20 2,5-anidromanose na extremidade de redução, que pode ser reduzida para formar um álcool, e despolimerização através de esterificação do grupo funcional carboxilato no ácido urônico, seguido por β -eliminação, resulta na formação de estruturas 1,6-anidro na extremidade de redução de algumas cadeias. Desse modo, 2,5-anidromanose e estruturas 1,6-anidro são exem-
 25 plos de estruturas de extremidade reduzidas modificadas que podem ser encontradas em algumas cadeias de LHWs. As cadeias em uma preparação de LMWH providas aqui podem incluir, por exemplo, pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou todas as cadeias tendo uma hexosamina acetilatada na extremidade de redução.

30 Atividade Anti-Xa

A atividade anti-Xa de uma preparação de LMWH desempenha um papel na atividade biológica de preparação de LMWH. Preferivelmente,

uma preparação de LMWH aqui provida tem uma atividade de anti-Xa de cerca de 100 a 400 IU/mg, por exemplo, cerca de 120 a 380 IU/mg, por exemplo, cerca de 150 a 350 IU/mg, por exemplo, cerca de 170 a 330 IU/mg, por exemplo, cerca de 180 a 300 IU/mg, por exemplo, cerca de 150 a 200 IU/mg, 200 a 300 IU/mg. A atividade anti-Xa de uma preparação de LMWH é calculada em Unidades Internacionais de atividade de antifator Xa por miligrama usando-se os métodos estatísticos para ensaios de linha paralela. A atividade de antifator Xa de preparações de LMWH aqui descrita é medida usando-se o seguinte princípio:



$\text{FXa(Excesso)} + \text{Substrato} \rightarrow \text{Peptídeo} + \text{pNA}(\text{medido espectrofotometricamente}).$

A atividade antifator Xa é determinada pelo efeito de potencialização de amostra no antitrombina (ATIII) na inibição de Fator Xa ativado (FXa). O excesso de Fator Xa pode ser indiretamente espectrofotometricamente medido. A atividade de antifator Xa pode ser medida, por exemplo, em um analisador Diagnostica Stago com um kit de Teste de Heparina Stachrom®, ou em um sistema de Coagulação ACL Futura™, com o Lit de Heparina Costest® de Chromogenix, ou em qualquer sistema equivalente. A resposta do analisador pode ser calibrada usando-se o Padrão Internacional de NIBSC para Heparina de Baixo Peso Molecular.

Razão de Anti-Xa/IIa

Em alguns aspectos, as preparações de LMWH aqui providas têm uma razão de atividade anti-Xa para atividade anti-IIa de 3:1, ou menos, por exemplo, 2,1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1. Os métodos de determinação de atividade de antifator Xa e atividade de antifator IIa foram descritos acima. A razão de atividade de antifator Xa para atividade de antifator IIa é calculada pela divisão da atividade de antifator Xa (base seca) pela atividade de antifator IIa (base seca).

Ambas a atividade de anti-Xa e atividade anti-IIa de heparina e

preparações de LMWH envolvem ligação de antitrombina III (ATIII) a uma sequência específica, representada pela estrutura $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$, dentro de cadeias presentes na preparação. A ligação de ATIII a esta sequência media a atividade anti-Xa. Em adição, trombina (fator IIa) liga heparinas em um local próximo ao local de ligação de ATIII. Diferente da atividade anti-Xa que requer somente o local de ligação de ATIII, a atividade anti-IIa requer a presença de um local de ligação de ATIII, bem como uma cadeia de comprimento suficiente distal ao local de ligação de ATIII. A atividade anti-IIa de preparações de LMWH aqui provida pode ser atribuída, pelo menos em parte, à presença de $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$, ou perto da extremidade de não-redução de cadeias dentro das preparações de LMWH, bem como o comprimento de muitas das cadeias presentes na preparação. Esta combinação pode resultar em cadeias dentro da preparação que contribuem a ambas a atividade anti-Xa e atividade anti-IIa. Quando ambas a atividade anti-Xa e atividade anti-IIa são providas pela mesma cadeia ou cadeias, a folga daquela cadeia ou cadeias pode resultar em ambas uma diminuição na atividade anti-Xa e atividade anti-IIa. Como tal, a atividade anti-Xa e a atividade anti-IIa podem permanecer relativamente constante sobre o curso de administração. Portanto, em alguns aspectos, as preparações de LMWH aqui providas têm uma atividade anti-Xa para atividade anti-IIa permanecidas relativamente constantes sobre o curso de uma administração de LMWH, por exemplo, a razão de atividade anti-Xa para atividade anti-IIa varia cerca de $\pm 1,5$, ± 1 , $\pm 0,5$, ou $\pm 0,2$, sobre um período de cerca de 30, 60, 120, 180, 240, 300 minutos. Por exemplo, se uma razão inicial de atividade anti-Xa para atividade anti-IIa é 2, então a razão medida em um tempo em segundo (por exemplo, 30, 60, 120, 180, 240, 300 minutos), após a administração inicial, será preferivelmente 3, e, preferivelmente em ou ao redor de 2.

Neutralização

As preparações de LMWH aqui providas podem ser neutralizadas por sulfato de protamina. Por exemplo, atividade anti-Xa e atividade anti-IIa podem ser neutralizadas por pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% por administração de protamina. Sulfato de prota-

mina é comercialmente disponível, por exemplo, de Eli Lilly and Company. A neutralização de atividade anti-Xa e atividade anti-IIa pode ser medida, por exemplo, por ensaios de coagulação padrões, tais como ACT e aPTT, ambos dos quais são descritos adicionalmente aqui. Sulfato de protamina pode ser administrado intravenosamente, por exemplo, em dose de cerca de 1, 2, 3 mg por 100 anti-Xa IU da preparação de LMWH em plasma. Preferivelmente, a neutralização de protamina de atividade anti-Xa e/ou atividade anti-IIa ocorre dentro de 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 minutos após administração do sulfato de protamina.

10 Polidispersidade

A polidispersidade de preparações de LMWH aqui provida é cerca de 1,6 ou menos, por exemplo, cerca de 1,6 ou 1,5 a 1,1, e números entre.

O termo "polidisperso" ou "polidispersidade" se referem ao peso molecular médio de peso de uma composição (M_w) dividido pelo número de peso molecular médio (M_n). O número de peso molecular médio (M_n) é calculado a partir da seguinte equação: $M_n = \sum c_i (\sum c_i / m_i)$. A c_i variável é a concentração do polissacarídeo na seção i , e M_i é o peso molecular do polissacarídeo na seção i . As somas são tomadas sobre um pico cromatográfico, que contém muitas seções de dados. Uma seção de dados pode ser ilustrada como uma linha vertical em um gráfico de pico cromatográfico versus tempo. O pico de eluição pode, portanto, ser dividido em muitas seções. O número de peso molecular médio é um cálculo dependente do peso molecular e concentração de cada seção de dados. Os métodos de determinar peso molecular médio de peso são descritos aqui, e foram usados para determinar polidispersidade também.

Para muitas das faixas aqui descritas, por exemplo, para uma dada estrutura ou atividade, as faixas podem ser aquelas faixas descritas, bem como outras faixas. Por exemplo, uma faixa construída de um ponto final inferior de uma faixa, por exemplo, para um dado bloco de construção ou atividade, pode ser combinada com o ponto final superior de outra faixa, por exemplo, para o dado bloco de construção ou atividade, para dar uma

faixa.

Uma preparação de LMWH "isolada" ou "purificada" é substancialmente livre de material celular, ou outras proteínas contaminantes a partir da célula ou fonte de tecido do qual a LMWH é derivada, ou substancialmente livre de precursores químicos, ou outros químicos quando quimicamente sintetizada. "Substancialmente livre" significa que uma preparação de LMWH é pelo menos 50% (peso/peso). Em uma concretização preferida, as preparações de LMWH têm menos do que cerca de 30%, 20%, 10% e, mais preferivelmente, 5% (por peso seco), de polissacarídeos de não-heparina, proteínas ou precursores químicos, ou outros químicos, por exemplo, de manufatura. Estes também referidos aqui como "contaminantes". Exemplos de contaminantes que podem estar presentes em uma preparação de LMWH aqui provida incluem, mas não estão limitados a, cálcio, sódio, enzima heparinase (ou outra enzima tendo especificidade de substrato similar), metanol, etanol, cloreto, sulfato, dermatan sulfato, e condrotin sulfato.

Métodos e Atividade de Monitoramento de uma Preparação de LMWH

A atividade de uma preparação de LMWH aqui provida pode ser monitorada por ensaios de anticoagulação padrões. Tais ensaios incluem, por exemplo, ACT e aPTT, ambos dos quais são rotineiramente praticados em hospitais e especificamente ambientes de operação de hospitais.

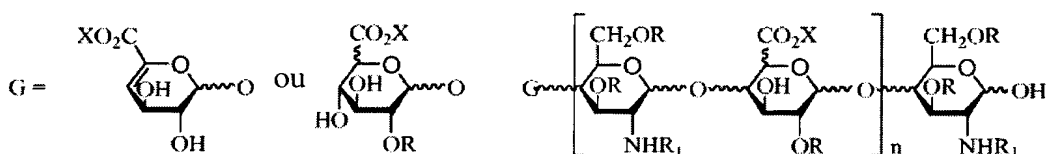
Um ACT é um teste que é usado para monitorar a eficiência da terapia de heparina. O ACT pode ser feito na beira da cama, por exemplo, em pacientes com êmbolo pulmonar, oxigenação de membrana extra corpórea (ECMO) e hemodiálise. O ACT é mais frequentemente usado antes, durante e após intervenção cirúrgica, tal como cirurgia de bypass cardiopulmonar (CPB), PCI e colocação de stent. O valor de referência para o ACT pode variar de entre 70-180 segundos. Contudo, para certos procedimentos, tal como CPB, a faixa desejada pode exceder 400-500 segundos. O ACT utiliza partículas carregadas negativamente para uma determinação de tempo para formação de coágulo. Exemplos de várias partículas que podem ser usadas incluem celite, que tem um comprimento normal de ACT sendo cerca de 100 a 700 segundos; caulim, que tem um comprimento normal de ACT sendo

cerca de 90 a 150 segundos; e partículas de vidro, que têm um comprimento normal de ACT sendo 190 a 300 segundos. Máquinas adequadas para medição de ACT incluem, por exemplo, Hemochron e Medtronic HemoTec.

No teste de aPTT (também referido como "tempo de tromboplastina parcial", ou "PTT"), um ativador de contato é usado para estimular a produção de Fator XIIa pela provisão de uma superfície para a função de kininogen de alto peso molecular, kallikrein e Fator XIIa. Esta ativação de contato é permitida proceder por um período específico de tempo. O cálcio é, em seguida, adicionado para disparar reações adicionais, e o tempo requerido para formação de coágulo é medido. Fosfolipídios são requeridos para formarem complexos, que ativam Fator X e Protrombina. APTT pode ser medido por IL TestTM APTT-SP(líquido). Os valores de referência para um aPTT é cerca de 25 a 35 segundos. Um aPTT prolongado indica que a coagulação está mais longa do que esperado, por exemplo, devido à heparina ou tratamento de LMWH.

Métodos de Produção de Preparações de LMWH

Vários métodos de fabricação de LMWH, por exemplo, uma preparação de LMWH aqui descrita também são contemplados. Por exemplo, tais métodos incluem um método de produção de uma preparação de LMWH tendo um comprimento de cadeia médio de cerca de 8 a 16 ou 9 a 16 dissacarídeos. O método inclui provisão de um precursor de preparação de LMWH tendo um comprimento de cadeia de menos do que 8 a 16 ou 9 a 16 dissacarídeos, e processamento do precursor de preparação de LMWH para obter uma preparação de LMWH tendo um comprimento de cadeia médio de cerca de 8 a 16 ou 9 a 16 dissacarídeos. Preferivelmente, o precursor tem um comprimento de cadeia médio de cerca de 8 a 14, por exemplo, 8 a 12 dissacarídeos. Por exemplo, o precursor de preparação de LMWH pode ter a seguinte estrutura:



no qual,

X é um cátion monovalente ou divalente (por exemplo, Na ou Ca)

R é H ou SO_3X ,

5 R1 é SO_3X ou COCH_3 , e

n = 2-45, por exemplo, 2-35;

e a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 7 a 13, por exemplo, 7 a 11, ou 8 a 12.

Um precursor de preparação de LMWH usado neste método pode ser obtido por um método que inclui precipitação de sal, seguida por (e) digestão enzimática. Um sal de um cátion monovalente ou divalente pode ser usado no método para obtenção do precursor de preparação de LMWH. Exemplos de cátions monovalente e divalente que podem ser usados incluem, por exemplo, sódio, potássio, rubídio, célio, bário, cálcio, magnésio, estrôncio, e combinações destes. O sal pode ser, por exemplo, um acetato de cátion monovalente ou divalente. A digestão enzimática para obter um precursor de LMWH pode incluir o uso de uma ou mais enzimas que clivam em uma ou mais ligações glicosídicas de ácidos urônicos não-sulfatados. Enzimas exemplares incluem heparinase III, mutantes de heparinase III e HSGAG liase III de *Bacterioides thetaiotaomicron*. A heparinase III é descrita, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos Números 5.681.733 e 5.919.693. Os mutantes de heparinase III são descritos na Patente dos Estados Unidos N° 5.896.789. Mutantes de heparinase III preferidos são aqueles tendo uma ou mais histidina em His36, His105, His110, His139, His152, His225, His 234, His424, His469 e His539 substituído com uma alanina.

O precursor de preparação de LMWH pode ser processado por separação dependente do tamanho, tal como, por exemplo, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca de íon, e filtração. Etapas adicionais de processamento podem ser usadas antes ou após a separação dependente do tamanho, por exemplo, para obter produto de fármaco.

O termo "produto de fármaco" se refere a uma preparação de LMWH tendo a pureza requerida para e sendo formulada para uso farma-

cêutico.

O termo "substância de fármaco" se refere a uma preparação de LMWH tendo os constituintes de polissacarídeo para uso farmacêutico, mas não necessariamente em sua formulação final, e/ou compreende um ou mais contaminante de não-produto (por exemplo, um ou mais produto inorgânico, tais como sulfato, cloreto, contaminante de proteína, subproduto de processo, tais como heparinase, cálcio, sódio).

Outros métodos de produção de uma preparação de LMWH conforme aqui provida inclui provisão de uma "fração de movimento rápido" de uma amostra contendo glicosaminoglican (GAG), por exemplo, UFH. A fração de movimento rápido pode ser feita conforme segue:

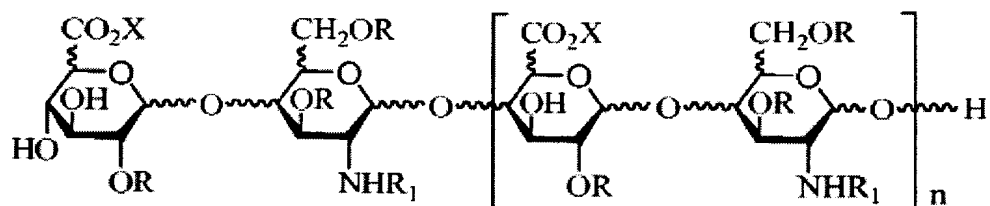
(1) sujeição de uma amostra contendo glicosaminoglican (GAG), por exemplo, UFH, a uma primeira de uma precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, um álcool, por exemplo, etanol), um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água), e um sal (preferivelmente, um sal de sódio, por exemplo, acetato de sódio), para proporcionar um primeiro sobrenadante;

(2) sujeição do primeiro sobrenadante a uma segunda precipitação, por exemplo, com um solvente orgânico polar (por exemplo, um álcool, por exemplo, etanol), e um solvente não-orgânico polar (por exemplo, água), para produzir um precipitado (este precipitado contém a fração de movimento rápido);

(3) e, preferivelmente, solubilização do precipitado.

As frações de amostra contendo (GAG), por exemplo, UFH, produzidas por outros métodos, mas que produzem uma fração substancialmente equivalente, por exemplo, uma tendo um comprimento de cadeia médio de 9-16 dissacarídeos, podem também serem usadas como a fração de movimento rápido.

Em algumas concretizações, a fração de movimento rápido tem a seguinte estrutura:



no qual,

X a Na ou Ca;

R é H ou SO₃Na,

5 R1 é SO₃Na ou COCH₃, e

n = 2-50, por exemplo, 2-40;

e a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 9 a 16, ou 8 a 15.

Esta composição pode ocorrer como um intermediário na produção de uma LMWH, por exemplo, como o produto de precipitação para proporcionar uma fração de movimento rápido (conforme discutido aqui).

A fração de movimento rápido pode ser processada adicionalmente para proporcionar uma LMWH da invenção. O processamento da fração de movimento rápido pode incluir digestão da fração de movimento rápido com um químico ou enzima que cliva uma ou mais ligações glicosídicas de ácido urônico não-sulfatado, por exemplo, uma ou mais ligações glicosídicas de ácido urônico não-sulfatado adjacentes a um resíduo de N-acetil glucosamina, por exemplo, para dar ocorrência a uma preparação com as qualidades e características aqui descritas. As enzimas podem ser avaliadas para especificidade de substrato pelas seguintes etapas: 1) classificação funcional de atividade de enzima contra dois substratos de HSGAG tendo densidades de sulfatação diferentes, por exemplo, heparina e sulfato de heparina, pelo que as enzimas tendo uma preferência para sulfato de heparina sobre heparina são selecionadas; 2) mapeamento do fragmento de substratos clivados da etapa 1 para avaliar a especificidade do substrato; 3) clivagem de uma LMWH, tal como intermediário de etapa 1 M118-REH, ou dalteparina, usando a enzima, seguido por; 4) avaliação de atividade anti-Xa e atividade anti-IIa do substrato clivado usando um ensaio in vitro; e 5) avalia-

ção da distribuição de peso molecular (ou comprimento de cadeia médio) de substrato clivado usando cromatografia de permeação de gel (GPC) e/ou cromatografia de exclusão de tamanho interfaceada com difusão de luz multiângulo (SEC-MALS).

- 5 A etapa 1 avalia uma capacidade da enzima agir como um HS-GAG liase identificada pela capacidade de gerar uma ligação C4-C5 insaturada nas extremidades de não-redução de produtos de clivagem, bem como a preferência de enzimas para substratos não-sulfatados, tal como sulfato de heparina. A atividade de enzima pode ser seguida espectrofotometricamente
- 10 pelo monitoramento de absorvância de UV em 232 nm. Uma absorvância neste comprimento de onda indica formação de ácidos urônicos insaturados nas extremidades de não-redução do produto de clivagem. A atividade de enzima é monitorada ambos cineticamente (taxa inicial de formação de produto), e em termos de formação de produto total seguindo digestão exaustiva
- 15 (cerca de 12 a 15 horas). Enzimas preferidas têm cerca de duas vezes preferência para sulfato de heparina sobre heparina, e mais do que duas vezes (por exemplo, 3 a 5 vezes) diferença na atividade total.

- A segunda etapa avalia a especificidade de clivagem da enzima. Enzimas adequadas para produção das composições de LMWH acima des-
- 20 critas clivam preferencialmente regiões subssulfatadas de heparina ou sulfato de heparina. Se UFH é o substrato usado, esta preferência é demonstrada por uma subdigestão óbvia de substrato (conforme indicado pela presença de oligossacarídeos mais longos) com qualquer dissacarídeo sendo produzido tendo uma baixa densidade de sulfato. Em contraste, quando o substrato
- 25 é sulfato de heparina, a digestão resulta em um número maior de dissacarídeos que indica uma frequência de corte mais alta.

As etapas remanescentes 3-5 podem ser formadas conforme descrito em outra parte aqui.

- Exemplos de enzimas incluem heparinase III, mutantes de heparinase III e HSGAG liase de *Bacterioides thetaiotaomicron*. Em algumas concretizações, a fração de movimento rápido é processada, pelo menos em
- 30 parte, com uma heparinase III mutada tendo uma alanina no resíduo 225 da

sequência de aminoácido de heparinase III, ao invés de uma histidina. Estas enzimas são também referidas aqui como "MO11".

A preparação de LMWH digerida pode ser o produto final, por exemplo, a substância de fármaco ou produto de fármaco, ou pode adicionalmente ser processada para obter o produto final, por exemplo, substância de fármaco ou produto de fármaco. A preparação de LMWH concentrada pode ser adicionalmente processada, por exemplo, por um ou mais de separação dependente do tamanho (por exemplo, por cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca de íon) e filtração. Preferivelmente, a preparação de LMWH concentrada é adicionalmente processada por uma separação dependente do tamanho, e a preparação de LMWH obtida a partir desta etapa tem um comprimento de cadeia médio de cerca de 9 a 16 dissacarídeos.

Métodos de Avaliação ou Processamento de Preparações de LMWH

Eletroforese Capilar

Enzimas

Análise de uma preparação de LMWH, tal como preparação de M118-REH usando CE inclui, por exemplo, digestão da preparação com uma ou mais enzimas de degradação de heparina. A(s) enzima(s) de degradação de heparina pode(m) ser uma ou mais heparinase, heparina liase, HSGAG liase, uma liase descrita como uma GAG liase que pode também degradar heparina, e/ou qualquer polipeptídeo descrito como uma hidrolase, sulfatase/sulfohidrolase, ou glicerol hidrolase/glicosidase. Por exemplo, a preparação de LMWH pode ser digerida com um ou mais de: uma glucoronil hidrolase insaturada (por exemplo, *F. Heparinum* Δ 4,5-glicoronidase, *B. thetaiotaomicron* Δ 4,5-glicoronidase,); uma glucoronil hidrolase (por exemplo, α -iduronidase de mamífero, β -glucoronidase); uma sulfohidrolase (por exemplo, *F. heparinum* 2-O-sulfatase, 6-O-sulfatase, 3-O-sulfatase, *B. thetaiotaomicron* 6-O-sulfatase, uma enzima de desulfatação de mucina, N-acetilglucosamina-6-sulfatase de mamífero, ácido idurônico-2-sulfatase de mamífero); uma N-sulfamidase (por exemplo, *F. heparinum* N-sulfamidase, heparina-N-sulfatase de mamífero); uma arilsulfatase; uma hexosaminidase;

uma glicosil hidrolase (por exemplo, endo-N-acetilglucosaminidase); uma heparinase (por exemplo, *Flavobacterium heparinium* heparinase I, *Flavobacterium heparinium* heparinase II, *Flavobacterium heparinium* heparinase III, *Flavobacterium heparinium* heparinase IV); uma endoglucoronidase (por exemplo, heparanase de mamífero); uma heparina/heparan sulfato liase (por exemplo, *Bacteróides thetaiotaomicron* HSGAG liase I, *Bacteróides thetaiotaomicron* HSGAG liase II, *Bacteróides thetaiotaomicron* HSGAG liase III, *Bacteróides thetaiotaomicron* GAG liase IV; e fragmentos funcionais e variantes destes. Ela pode também incluir um polipeptídeo descrito conforme acima (por exemplo, uma heparinase ou uma heparina/sulfato de heparina liase) derivada de microorganismos outros do que *Flavobacterium heparinium* (a.k.a. *Pedobacter heparinus*) ou *Bacteróides thetaiotaomicron*. Por exemplo, *Haloarcula marismortui*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus suis*, *Enterococcus faecalis*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Spingobacterium* sp., *Brucella abortus* biovar, *Brucella melitensis*, *Solibacter usitatus*, *Acidobacterium capsulatum*, *Microbubifer degradans*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Burkholderia pseudomonascepacia*, *Geobacter metallireducens*, *Prevotella* sp., *Serrata marcescens*, *Cornybacterium* sp., *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Rhodopirellula baltica*, *Pirellula marina*, e/ou *Gemmata abscuriglobus*.

Preferivelmente, pelo menos uma enzima usada na digestão é selecionada porque ela se cliva em ligações específicas dentro da heparina. Por exemplo, a enzima pode ser heparinase I e/ou HSGAG liase I. Em uma concretização, a preparação de LMWH é digerida com *Flavobacterium heparinium* heparinase I. Em outras concretizações, a preparação de heparina é digerida com *Bacteroides thetaiotaomicron* HSGAG liase L.

Outras enzimas podem ser selecionadas para uso na digestão que se decompõe somente com o uso de heparinase I, II e III. Quaisquer das enzimas aqui descritas podem ser substituídas com uma enzima com ativi-

dade funcionalmente equivalente.

Em uma concretização preferida, a digestão está ocorrendo para completação, ou pelo menos suficientemente para proporcionar uma digestão tendo todos os produtos encontrados na Tabela 10A, e preferivelmente, substancialmente livre de material não-digerido.

Antes da digestão, a amostra pode ser liofilizada. Por exemplo, a amostra pode ser secada em um forno a vácuo, por exemplo, a cerca de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 43°C, 46°C, 49°C, 52°C, ou 55°C, por cerca de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24 horas. Por exemplo, a amostra pode ser liofilizada e/ou secada sob uma das seguintes condições: 40°C por 12 horas; 46°C por 8 horas; 49°C por 6 horas; 52°C por 4 horas. Uma amostra pode ser suspensa em água ou um tampão solúvel (por exemplo, 1 mM de acetato de cálcio, 25 mM de acetato de sódio, pH 7,0, e 5% de glicina) a uma concentração de cerca de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ou 500 mg/ml. Uma ou mais enzima de degradação de heparina pode ser adicionada à amostra. Em algumas concretizações, heparinase I ou HSGAG liase I (ou combinações destas enzimas), heparinase II ou HSGAG liase II (ou combinações destas enzimas), e heparinase III ou HSGAG liase III (ou combinações destas enzimas), são adicionadas à amostra. A amostra é digerida a uma temperatura de cerca de 18°C, 25°C, 30°C, 37°C, ou 45°C por cerca de 6, 12, 16, 18, 20 ou 24 horas, por exemplo, a cerca de 25°C por 24 horas; a 30°C por cerca de 18 horas; a cerca de 37°C por 12 horas.

Em seguida a digestão, a enzima ou enzimas são removidas a partir da mistura de amostra, por exemplo, usando uma coluna de Ni^{2+} , uma coluna de exclusão de tamanho, diálise, ultrafiltração, ou similar. A enzima ou enzimas pode ser inativada por aquecimento (por exemplo, a 65°C por 20 minutos), seguindo digestão. A amostra pode ser armazenada, por exemplo, a -85°C, -70°C, -20°C, 4°C, 18°C, ou 25°C por um período de tempo antes da análise.

Espécies separadas pelos métodos aqui descritos podem ser detectadas por numerosos meios, por exemplo, absorvância de ultravioleta (por exemplo, a um comprimento de onda de cerca de 232 nm), difusão de

luz evaporativa, fluorescência, detecção amperométrica pulsada, e espectrometria de massa. Em algumas concretizações, dois ou mais meios de detecção podem ser utilizados na mesma amostra, por exemplo, em série ou em paralelo.

- 5 Digestões de enzima adicionais podem ser usadas para digerir a amostra. Por exemplo, uma combinação de heparinase I ou HSGAG liase I (ou combinações destas enzimas), heparinase II ou HSGAG liase II (ou combinações destas enzimas), heparinase III ou HSGAG liase III (ou combinações destas enzimas), e 2-O sulfatase, $\Delta 4,5$ glucoronidase, e/ou heparinase I ou HSGAG liase I (ou combinações destas enzimas), heparinase II ou HSGAG liase II (ou combinações destas enzimas), ou heparinase III ou HSGAG liase III (ou combinações destas enzimas), pode ser usada para digestão, e, por exemplo, detectada pelos métodos descritos acima.

- 15 Os produtos de digestão são analisados usando-se um instrumento de Eletroforese Capilar Agilent 3D. O capilar é um capilar de sílica fundida exposta à trajetória de luz estendida de 75 μm de diâmetro interno, comprimento efetivo de 72 cm. Tris (50 mM), 10 μM de dextran sulfato a pH 2,5 é usado como tampão de CE. As amostras são injetadas a uma pressão de 3Pa (30 mbar) por 20 segundos. A separação é realizada em polaridade negativa, e o analito é monitorado a 232 nm com 310 nm como o comprimento de onda de referência. Novos capilares são pré-tratados com uma sequência de água, hidróxido de sódio 1N, água, e tampão de separação. Para cada análise de amostra, o capilar é pré-condicionado com tampão por 5 minutos.

- 25 Informação adicional útil para os métodos aqui descritos pode ser encontrada em, por exemplo, Linhardt et al(1998) Biochem. J., 254:781-787; Chuang et al. (2001) J. Chromatogr. A, 932:65-74, e Yates et al., (2004) J. Med. Chem., 47:277-280, e Rhomberg et al. (1988) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95(8):4176-81.

30 Eletroforese Capilar

CE, usando-se, por exemplo, um capilar de sílica fundida não-revestido, pode ser usado para analisar LMWH, por exemplo, preparações

de LMWH aqui descritas. Sob condições de baixo pH, a separação é ditada por mobilidade eletroforética de analito quase exclusivamente. Devido ao fato que todos os sacarídeos relacionados à LMWH têm uma carga negativa de rede devido às porções de carboxilato e sulfato, a separação é conduzida sob polaridade reversa. Em adição, a suplementação do tampão de baixo pH (pH 2,5) com dextran sulfato previne absorção não-específica de material similar a heparina aniônica, capacitando formas de picos simétricas e quantificação precisa.

As espécies na preparação de LMWH podem ser decompostas com uma série de cinco digestões (discutidas em detalhe em qualquer parte aqui); cada digestão é submetida à eletroforese capilar após adição de um naftaleno monosulfonato de padrão interno.

14 componentes individuais (vide, por exemplo, Tabela 10, aqui) são decompostos na CE. A recuperação de massa na metodologia de análise composicional foi avaliada conforme segue. Esta análise ocorreu em dois níveis: (1) recuperação de massa após digestão enzimática, e (2) recuperação de massa após separação com eletroforese capilar.

RMN

Dois espectroscópios de ressonância magnética nuclear dimensional (2D RMN) podem ser usados como um meio de decompor parcialmente e identificar sinais com sobreposição de sinal mínima. Integração dos sinais de 2D RMN, seguida por cálculos simples podem facilitar um análise composicional quantitativa de monossacarídeo de uma mistura de polissacarídeo tal como análise de uma preparação de LMWH tal como aquela aqui provida.

Além disso, 2D RMN pode proporcionar informação nos ambientes de ligação de um constituinte de dissacarídeo, por exemplo, um dissacarídeo H-U, proporcionando análise de ligações de dissacarídeo, incluindo ambas análise qualitativa e quantitativa. Em algumas concretizações, a análise de 2D RMN pode proporcionar informação sobre o estado de epimerização de uma ligação de H-U, por exemplo, proporcionando informação a se o estado de epimerização é um resíduo de ácido idurônico ou um resíduo de

ácido glucurônico (isto é, I ou U).

Em algumas concretizações, um experimento de espectroscopia de correlação de 2D próton-carbono (HSQC) pode proporcionar análise composicional quantitativa em uma ou mais glicosaminoglican. Por exemplo, em algumas concretizações, a análise de 2D RMN pode proporcionar informação sobre o vizinho mais próximo na extremidade de redução de um monossacarídeo. Esta informação pode proporcionar, por exemplo, o contexto de sequência no qual um monossacarídeo particular está presente em uma mistura de polissacarídeo, por exemplo, uma LMWH, tal como uma preparação de LMWH aqui descrita.

Em algumas concretizações, o método de 2D RMN permite discriminar entre resíduos de extremidade interna e de redução. Em particular, a identificação de quantidades mensuráveis de redução de N-acetil glucosamina é peculiar daquela LMWH aqui descrita.

Em algumas concretizações, a análise de 2D RMN pode proporcionar informação sobre a extremidade de não-redução de cadeias de LMWH, isto é, a quantidade de Δ UAp2-OH gerada pela digestão enzimática.

Em algumas concretizações, o 2D RMN pode ser usado para avaliar uma mistura de polissacarídeo para a presença de uma ou mais impurezas, tal como sulfato de dermatan. Por exemplo, a ausência de um sinal no próton RMN a 2,06 ppm pode ser usada para confirmar que sulfato de dermatan não está presente em níveis maiores do que o nível de detecção do instrumento (isto é, em um nível maior do que 1%).

Em uma concretização preferida, a estrutura de sacarídeo é avaliada usando 2D RMN, por exemplo, amostra de uma mistura de polissacarídeo trocada com D₂O, liofilizada durante toda a noite, e redissolvida em D₂O. A amostra é, em seguida, colocada em um tubo de RMN para análise e curso a 303 K com um espectrômetro Bruker Avance de 600 MHz equipado com uma sonda TXI de 5 mm. O espectro de HSQC de gradiente aumentado é registrado com desacoplamento de carbono durante aquisição. Os dados são, em seguida, adquiridos com 16 escaneamentos para cada um dos 256 instrumentos na dimensão ¹³C indireta. O retardo de transferência

de polarização é ajustado para 2.941 ms para uma transferência opcional com acoplamentos escalares IJCH de 155 Hz.

Os dados são geralmente, em seguida, processados, por exemplo, o tamanho da matriz 1K x 256 é zero preenchido para 2K x 1K pela aplicação de uma função de co-seno quadrado antes da transformação de Fourier. Os picos cruzados são integrados, por exemplo, usando-se o software MestreC 4.5, e somente picos positivos são usados para integração. As integrais são normalizadas ao pico H2/C2 de glucosamina N-sulfatada (3.26/60.5 ppm). Os picos são geralmente designados usando-se alterações químicas publicadas e designações experimentais via experimentos COSY e TOCSY.

A percentagem de composição é calculada usando-se os volumes de pico cruzado anomérico, para qual todos os resíduos de ácido urônico têm acoplamentos 1JCH similares, como fazem todos os resíduos de glucosamina. Para picos anoméricos de glucosamina onde sobreposição impede quantificação precisa, sinais de H2/C2 são, ao invés, integrados. A quantidade de todo monossacarídeo é expressa como percentagem do teor de glucosamina ou ácido urônico total. A razão de 6-O-sulfatação versus 6-O-desulfatação é calculada de integração de sinal de H6/C6.

Os dados de percentagem de composição são providos na Tabela 11A.

Informação adicional útil para os métodos aqui encontrados pode ser verificada em, por exemplo, Guerrini et al (2005) Anal. Biochem., 337-35-47.

25 Composições Farmacêuticas

As composições, por exemplo, composições farmacêuticamente aceitáveis, que incluem uma preparação de LMWH aqui descrita, formuladas junto com um transportador farmacêuticamente aceitável, são providas. Conforme aqui usado, "adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis" incluem quaisquer e todos os solventes, meio de dispersão, agentes de retardamento isotônicos e de absorção, e similares, que são fisiologicamente compatíveis. O transportador pode ser adequado para administração intravenosa, intra-

muscular, subcutânea, parenteral, retal, cervical ou epidermal (por exemplo, por injeção ou infusão).

As composições desta invenção podem estar em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquida, semisólida e sólida, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infundíveis), dispersões ou suspensões, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo pretendido de administração e aplicação terapêutica. Composições preferidas típicas estão na forma de soluções injetáveis ou infundíveis. O modo preferido de administração é parenteral (por exemplo, intravenoso, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular). Em uma concretização preferida, a preparação de LMWH é administrada por infusão ou injeção intravenosa. Em outra concretização preferida, a preparação de LMWH é administrada por injeção intramuscular ou subcutânea.

As frases "administração terapêutica" e "parenteralmente administrado", conforme aqui usadas, significam modos de administração outros do que administração enteral ou tópica, usualmente por injeção, e inclui, sem limitação, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intravítrea, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcutilar, intra-articular, subcapsular, subaraquinóide, intracervical, epidural e injeção intasternal e infusão.

As composições terapêuticas devem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenagem. As composições podem ser formuladas como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada à alta concentração. Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto ativo (isto é, LMWH na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme requerido, seguido por esterilização filtrada. Geralmente, dispersões são preparadas por incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são seca-

gem a vácuo e congelamento-secagem, que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução previamente estéril-filtrada desta. A fluidez correta de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lectin, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão, e pelo uso de tensoativos. Absorção prolongada de composições injetáveis pode ser provida pela inclusão na composição de um agente que retarda absorção, por exemplo, vários polímeros, sais de monoestearato, e gelatina.

As preparações de LMWH podem ser administradas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações terapêuticas, a rota/modo preferido de administração é injeção intravenosa ou infusão. Conforme será apreciado por aqueles técnicos no assunto, a rota e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados desejados. Em certas concretizações, o composto ativo pode ser preparado com um transportador que protegerá o composto contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdermais, e sistemas de distribuição microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, podem ser usados, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos aos versados na técnica. Vide, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinsin, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de dose múltipla, por exemplo, com um conservante adicionado. As composições podem tomar tais formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos e aquosos, e podem conter agentes formulatórios, tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

Em certas concretizações, uma preparação de LMWH aqui provida pode ser administrada oralmente, por exemplo, com um diluente interno, ou um transportador comestível assimilável. O composto (e outros ingre-

dientes, se desejado) pode ser também encerrado em uma cápsula de gelatina de invólucro duro ou macio, comprimido em tabletes, ou incorporado diretamente na dieta do indivíduo. Para administração terapêutica oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de

5 tabletes ingeríveis, tabletes bucais, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, wafers, e similares. Para administrar um composto da invenção por outro do que administração parenteral, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrar o composto com, um material para impedir sua inativação.

Núcleos de drágea são providos com revestimentos adequados.

- 10 Para esta proposta, soluções de açúcar concentrado podem ser usadas, que podem opcionalmente conter goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietileno glicol, e/ou dióxido de titânio, soluções de laca, e solventes orgânicos adequados, ou misturas de solvente. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos tabletes ou revestimentos de drágea para
- 15 identificação, ou para caracterizar combinações diferentes de doses de composto ativo. Composições farmacêuticas que podem ser usadas oralmente incluem cápsulas de ajuste produzidas de gelatina, bem como cápsulas vedadas macias produzidas de gelatina, e um plastificante, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de ajuste podem conter os ingredientes ativos
- 20 em mistura com carga tal como lactose, ligantes, tais como amidos, e/ou lubrificantes, tais como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizadores. Em cápsulas macias, os compostos ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos graxos, parafina líquida, ou polietileno glicóis líquidos. Em adição, estabilizadores podem ser adicionados. Microesferas formuladas para administração oral podem também serem usadas. Tais microesferas foram bem definidas na técnica. Todas as formulações para administração oral devem ser em dosagens adequadas para tal administração.
- 25

- Para administração bucal, as composições podem tomar a forma
- 30 de tabletes ou pastilhas formuladas na maneira convencional.

Para administração por inalação, a preparação de LMWH pode ser convenientemente distribuída na forma de uma apresentação de pulveri-

zação de aerossol de acondicionamentos pressurizados, ou um nebulizador, com o uso de um propelente adequado, por exemplo, diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano, dióxido de carbono, ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem po-
5 de ser determinada pela provisão de uma válvula para distribuir uma quantidade medida. Cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina, para uso em um inalador ou insuflador, podem ser formuladas contendo uma mistura de pó do composto, e uma base de pó adequada, tal como lactose ou amido. Em adição, formações de pó seco para terapia de inalação estão dentro do
10 escopo da invenção. Tais formulações de pó seco podem ser preparadas conforme descrito em WO02/32406.

A composição pode também ser formulada em composições re-
tal ou vaginal, tais como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, contendo bases de supositórios convencionais, tais como manteiga de ca-
15 cau, ou outros glicerídeos.

Em adição às composições anteriormente descritas, os compos-
tos podem também ser formulados como uma preparação de depósito. Tais formulações de ação longa podem ser formuladas com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão em um óleo
20 aceitável), ou resinas de troca de íon, ou derivados frugalmente solúveis, por exemplo, como um sal frugalmente solúvel.

As composições farmacêuticas também podem compreender transportadores ou excipientes sólidos ou de fase de gel adequados. Exem-
plos de tais transportadores ou excipientes incluem, mas não estão limitados
25 a, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina, e polímeros, tais como polietileno glicóis.

Exemplos de composições que podem ser usadas para distribui-
ção não-parenteral (por exemplo, distribuição não-invasiva) incluem: quanti-
dades medidas de uma composição a ser administrada de um inalador para
30 distribuição pulmonar; tabletes tendo uma unidade de dosagem prescrita para administração oral; emplastos transdermais para distribuição de uma unidade de dosagem através da pele; e supositórios para distribuir unidade

de dosagem retalmente ou vaginalmente. As composições podem ser incluídas em um recipiente, um acondicionamento, ou dispensador junto com instruções para administração.

5 A preparação de LMWH pode também ser administrada com dispositivos de implantação de curto e longo prazo. As preparações podem ser implantadas subcutaneamente, podem ser implantadas em tecidos ou órgãos (por exemplo, a artéria coronária, artéria carótida, artéria renal, e outras artérias periféricas, veias, rim, córnea do coração, vítreo, cérebro, etc), ou podem ser implantadas em espaços fisiológicos ao redor dos tecidos e
10 órgãos (por exemplo, cápsula do rim, pericárdio, espaço torácico ou peritoneal).

A preparação de LMWH pode também ser usada para revestir vários dispositivos médicos. Por exemplo, a preparação de LMWH pode ser usada para revestir um stent ou circuito extra corpóreo. Tais formulações
15 das preparações de LMWH podem incluir usando-se, por exemplo, gotas de liberação controlada, gel ou microesferas, bem como polímeros, tais como PLGA, celulose, alginato e outros polissacarídeos.

Os regimes de dosagem são ajustados para proporcionar a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo,
20 um bolo simples pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas sobre o tempo, ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada, conforme indicado pelas exigências da solução terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em unidade de dosagem para caso de administração e uniformidade de dosagem. A
25 forma de unidade de dosagem, conforme aqui usada, se refere a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o transportador farmacêutico requerido. A especificação para
30 as formas de unidade de dosagem da invenção são ditadas por e diretamente dependente de (a) as características únicas do composto ativo, e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica

ca de composição de tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

É para ser notado que valores de dosagem podem variar com o tipo e severidade da condição a ser aliviada. É para ser adicionalmente compreendido que para qualquer indivíduo particular, regimes de dosagem específicos devem ser ajustados sobre o tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições.

As composições farmacêuticas da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente efetiva" ou uma "quantidade profilaticamente efetiva" de uma preparação de LMWH. Uma "quantidade terapeuticamente efetiva" se refere a uma quantidade efetiva, em dosagens, e por períodos de tempo necessário, para alcançar um resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente efetiva da preparação de LMWH pode variar de acordo com fatores tais como o estado de doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a preparação de LMWH para induzir uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente efetiva é também uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou danosos da preparação de LMWH são sobre-carregados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "dosagem terapeuticamente efetiva" inibe preferivelmente um parâmetro mensurável, por exemplo, coagulação ou trombose, por exemplo, conforme medido por ACT e aPTT, por pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente por pelo menos cerca de 40%, ainda mais preferivelmente por pelo menos cerca de 60%, e ainda mais preferivelmente por pelo menos cerca de 80% em relação aos indivíduos não-tratados. A capacidade de um composto inibir um parâmetro mensurável, por exemplo, coagulação ou trombose, pode ser avaliada em um sistema de modelo de animal prognosticado de eficiência em humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada pelo exame da capacidade do composto em um ensaio *in vitro*. Doses exemplares para administração intravenosa da preparação de LMWH são cerca de IU/kg a 200 IU/kg, por exemplo, 1 IU/kg; 2 IU/kg; 3 IU/kg; 4 IU/kg; 5 IU/kg; 6 IU/kg; 7 IU/kg; 8 IU/kg; 9 IU/kg; 10 IU/kg; 11 IU/kg; 12 IU/kg; 13

IU/kg; 14 IU/kg; 15 IU/kg; 16 IU/kg; 17 IU/kg; 18 IU/kg; 19 IU/kg; 20 IU/kg; 21 IU/kg; 22 IU/kg; 25 IU/kg; 30 IU/kg; 40 IU/kg; 50 IU/kg; 70 IU/kg; 100 IU/kg; 125 IU/kg; 150 IU/kg; 175 IU/kg; 200 IU/kg. Outras doses exemplares para administração intravenosa da preparação de LMWH são cerca de 0,03 mg/kg a 0,45 mg/kg, por exemplo, 0,03 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,22 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,27 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,33 mg/kg, 0,37 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,44 mg/kg, preferivelmente cerca de 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,44 mg/kg, 0,47 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,60 mg/kg, 0,7 mg/kg, preferivelmente cerca de 0,30 mg/kg a 0,50 mg/kg, por exemplo, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,42 mg/kg, 0,44 mg/kg, 0,47 mg/kg ou 0,50 mg/kg.

Uma "quantidade profilaticamente efetiva" se refere a uma quantidade efetiva, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, desde que a dose profilática é usada em indivíduos antes ou em um estágio anterior de doença, a quantidade profilaticamente efetiva será menor do que a quantidade terapêuticamente efetiva.

Também dentro do escopo da invenção estão kits compreendendo uma preparação de LMWH aqui provida. O kit pode incluir um ou mais outros elementos incluindo: instruções para uso; outros reagentes, por exemplo, um agente terapêutico ou sulfato de protamina; dispositivos ou outros materiais para preparar a preparação de LMWH para administração; transportadores farmacêuticamente aceitáveis; e dispositivos ou outros materiais para administração a um indivíduo. Instruções para uso podem incluir instruções para monitoramento de atividade anti-Xa e/ou atividade anti-IIa usando-se ensaios de coagulação, tais como ACT e aPTT. As instruções podem incluir instruções para aplicação terapêutica incluindo dosagens sugeridas e/ou modos de administração, por exemplo, em um paciente tendo uma distúrbio, por exemplo, uma distúrbio aqui descrita. Outras instruções podem incluir instruções na reversão da atividade anti-Xa e/ou atividade anti-IIa usando-se sulfato de protamina. O kit pode adicionalmente conter pelo

menos um reagente adicional, tal como um agente de diagnóstico ou terapêutico, por exemplo, um agente de diagnóstico ou terapêutico conforme aqui descrito, formulado conforme apropriado, em uma ou mais preparações farmacêuticas separadas.

5 Usos Profiláticos e Terapêuticos

As preparações de LNWH podem ser usadas para tratar um indivíduo. Conforme aqui usado, o termo "tratar" ou "tratamento" é definido como a aplicação ou administração de uma preparação de LMWH a um indivíduo, por exemplo, um paciente, ou aplicação ou administração a um tecido isolado ou célula de um indivíduo, por exemplo, um paciente, que é retornado ao paciente. O indivíduo pode ser um paciente tendo uma distúrbio (por exemplo, uma distúrbio conforme aqui descrita), um sintoma de uma distúrbio, ou uma predisposição a uma distúrbio. O tratamento pode ser para curar, remediar, aliviar, alterar, melhorar, paliar, ou afetar a distúrbio, os sintomas da distúrbio ou a predisposição a distúrbio. Conforme aqui usado, um indivíduo é um vertebrado, tal como um ser humano, primata não-humano, vaca, cavalo, porco, ovelha, cabra, cão, gato, ou roedor. O indivíduo pode ser, por exemplo, um animal experimental, um animal veterinário, ou um indivíduo humano. Um tratamento pode ser terapêutico, por exemplo, um tratamento que cura, remedia, alivia, melhora, palia ou afeta a distúrbio ou um sintoma da distúrbio, por exemplo, diminui, alivia ou melhora uma condição indesejada existente ou sintoma desta, ou profilática, por exemplo, um tratamento que retarda, por exemplo, previne o início de uma condição indesejada ou sintoma desta.

As heparinas e LMWHs têm muitas utilidades terapêuticas. As preparações de LMWH aqui providas podem ser usadas para o tratamento de qualquer tipo de condição na qual terapia de heparina ou LMWH é útil. Desse modo, as preparações e métodos são úteis em uma variedade de métodos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. Por exemplo, é conhecido que heparinas e LMWHs são úteis para prevenir e tratar demência, tais como doença de Alzheimer, distúrbios associadas com coagulação (por exemplo, DTV e PE), distúrbios fibróticas (por exemplo, fibrose de órgão maior, distúrbios fibropro-

liferativas e cicatrização associada com trauma), distúrbios trombóticos (por exemplo, ACS, angina estável ou instável, MI (por exemplo, STEMI e NS-TEMI)), ou doença cardiovascular (aterosclerose), condições vasculares ou fibrilação arterial, alergia ou doenças respiratórias (por exemplo, asma, enfisema, síndrome de angústia respiratória adulta (ARDS), fibrose cística, e dano de reperfusão de pulmão), choque circulatório e distúrbios relacionadas, distúrbios angiogênicos, câncer e distúrbios metastáticos, sepsia, estenose e restenose, e osteoporose. As preparações de LMWH aqui providas podem ser também usadas em indivíduos tendo uma fratura (por exemplo, uma fratura de bacia) ou a um indivíduo antes, durante ou após uma intervenção cirúrgica (por exemplo, transplante de órgão, cirurgia ortopédica, reposição de bacia, reposição de joelho, PCI, reposição de stent, angioplastia e CABG). Cada uma destas distúrbios é bem-conhecida na técnica, e é descrita, por exemplo, em *Harrisons's Principles of Internal Medicine* (McGraw Hill, Inc., New York), que é aqui incorporado por referência. O uso de composições de HLGAG em vários métodos terapêuticos é descrito e resumido em Huang, J. e Shimamura, A., *Coagulation Disorders*, 12, 1251-1281 (1998).

Desse modo, as preparações de LMWH são úteis para tratamento ou prevenção de distúrbios associadas com coagulação. Quando um desequilíbrio na trajetória de coagulação altera a coagulação excessiva, o resultado é o desenvolvimento de tendências trombóticas, que são frequentemente manifestadas como ataques de coração, derrames cerebrais, DVT, ACS, angina estável e instável, e infartos miocárdiais. Uma "doença associada com coagulação", conforme aqui usado, se refere a uma condição caracterizada por inflamação local que pode resultar de uma interrupção ou redução no suprimento de sangue a um tecido que pode ocorrer, por exemplo, como um resultado de bloqueio de um vaso sanguíneo responsável pelo suprimento de sangue ao tecido, tal como é visto em infarto miocárdial ou cerebral, ou doença vascular periférica, ou como um resultado de formação embólica associada com condições, tais como fibrilação arterial, DVT ou PE. As pessoas que suportam cirurgia, anestesia e períodos prolongados de lei-

to, ou outra inatividade, são frequentemente susceptíveis a uma condição conhecida como trombose venosa profunda, ou DVT, que é uma coagulação de sangue venoso nas extremidades inferiores e/ou pélvis. Esta coagulação ocorre devido à ausência de atividade muscular nas extremidades inferiores

5 requeridas para bombear o sangue venoso (estase), dano vascular local, ou um estado hipercoagulável. A condição pode ser ameaçadora à vida se um coágulo de sangue migra para o pulmão, resultando em uma "embolia pulmonar", ou, de outro modo, interfere com a circulação cardiovascular. Um método de tratamento envolve administração de um anti-coagulante.

10 Os métodos são úteis para tratar distúrbios trombóticos e doença cardiovascular. A doença cardiovascular inclui, mas não está limitada a, aterosclerose e fibrilação arterial. Fibrilação arterial é uma forma comum de arritmia geralmente ocorrendo como um resultado de estresse emocional ou em seguida a cirurgia, exercício, ou intoxicação alcoólica aguda. A fibrilação

15 arterial é caracterizada por atividade arterial desorganizada sem ondas P discretas no ECG de superfície. Esta atividade desorganizada pode conduzir a fluxo de sangue impróprio e formação de trombina. Estas trombinas podem embolizar, resultando em isquemia cerebral, e outras distúrbios.

Os distúrbios trombóticos incluem, mas não estão limitados a,

20 ACS, por exemplo, MI, angina estável e instável. O infarto miocárdial é uma doença que às vezes ocorre com uma diminuição abrupta no fluxo de sangue coronário que segue uma oclusão trombótica de uma artéria coronária anteriormente estreitada por aterosclerose. Tal dano pode ser produzido ou facilitado por fatores, tais como cigarros, hipertensão, e acúmulo de lipídeo.

25 A angina é devido à isquemia miocárdial transiente. Esta distúrbio é usualmente associada com peso, pressão, aperto, abafamento, ou sentimento de choque abaixo do esterno. Episódios são usualmente causados por esforço ou emoção, mas podem ocorrer em repouso. STEMI, também referido como "infarto miocárdial de onda Q", se refere a MI com um ecocardiograma a-

30 normal. NSTEMI, ou "infarto miocárdial sem onda Q", não está associado a uma anormalidade de ecocardiograma. A angina estável ocorre em tempos prognosticáveis com uma quantidade específica de esforço ou atividade. A

angina instável pode ocorrer como uma mudança no modelo usual de angina estável. Inclui-se ainda dor no peito que ocorre em repouso, ou com menos e menos esforço, que pode ser mais severa e mais longa, ou que é menos responsiva a nitroglicerina. Angina instável significa que o fluxo sanguíneo
5 adquiriu pior potencialidade por um estreitamento aumentado ou coágulos de sangue pequenos na artéria coronária. A angina instável é um sinal alertando que infarto miocárdial pode ocorrer logo.

A preparação de LMWH pode ser usada para o tratamento de distúrbios trombóticos e cardiovasculares sozinhas ou em combinação com
10 outros agentes terapêuticos para reduzir o risco de uma distúrbio cardiovascular, ou para tratamento da doença cardiovascular. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma preparação de LMWH co-formulada com, e/ou co-administrada com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, por exemplo, um ou mais agentes terapêuticos aqui descritos. Administrada "em
15 combinação", conforme aqui usado, significa que dois (ou mais) tratamentos diferentes são distribuídos ao indivíduo durante o curso da aflição do indivíduo com a distúrbio, por exemplo, os dois ou mais tratamentos são distribuídos após o indivíduo tiver sido diagnosticado com a distúrbio, ou identificado como um risco para a distúrbio e antes da distúrbio tiver sido prevenida, cu-
20 rada ou eliminada. Em algumas concretizações, a distribuição de um tratamento está ainda ocorrendo quando a distribuição do segundo começa, de modo que existe sobreposição. Isto é, às vezes, referido aqui como "distribuição "simultânea" ou "concorrente". Em outras concretizações, a distribuição de um tratamento termina antes da distribuição do outro tratamento come-
25 çar. A distribuição pode ser tal que um efeito do primeiro tratamento distribuído é ainda detectável quando o segundo é distribuído. Outros agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, agentes anti-inflamatórios, agentes antitrombóticos, agentes antiplaqueta, agentes fibrinolíticos, trombolíticos, agentes de redução de lipídeo, inibidores de trombina direta, inibidores
30 de anti-Xa, inibidores de anti-IIa, inibidores de receptor de glicoproteína I-Ib/IIa, e inibidores de trombina direta. Exemplos de agentes que podem ser administrados em combinação com as preparações de LMWH aqui providas

incluem bivalirudin, hirudin, hirugen, Angiomax, agatroban, PPACK, thrombin aptamers, aspirina, inibidores de GPIIb/IIIa (por exemplo, Integrelin), inibidores de P2Y12, tienopiridina, ticlopidina, e clopidogrel.

A monitorabilidade por ensaios de anticoagulação padrões, tais como ACT e aPTT, bem como a reversibilidade das preparações de LMWH aqui providas, aperfeiçoam a flexibilidade no tratamento de pacientes, tais como aqueles pacientes admitidos ao hospital e suportando avaliação para possível cirurgia cardiovascular. Tais benefícios são realçados pelo seguinte cenário. Um paciente vai para o hospital queixando-se de sintomas que podem estar associados com várias distúrbios trombóticas, tais como ACS, incluindo angina estável, angina instável e MI. A monitorabilidade e reversibilidade das preparações de LMWH aqui providas permitem o uso de tais preparações enquanto o paciente está sendo avaliado para cirurgia cardiovascular potencial. Se é determinado que o paciente receberá intervenção cirúrgica, tais como PCI ou reposição de stent, a monitorabilidade das preparações de LMWH, a atividade anti-Xa e a atividade anti-IIa da preparação de LMWH podem ser monitorados durante o procedimento, e, se necessário, uma ou mais doses adicionais da preparação de LMWH podem ser dadas durante ou após o procedimento para manter estas atividades. Se é determinado que o paciente receberá uma intervenção cirúrgica tal como CABG, a atividade anti-Xa e atividade anti-IIa da preparação de LMWH podem ser neutralizadas com sulfato de protamina antes da intervenção cirúrgica. Em adição, a atividade anti-Xa e atividade anti-IIa podem ser monitoradas no paciente para assegurar que a atividade é suficientemente diminuída antes da cirurgia.

As preparações de LMWH aqui providas são também úteis para tratamento de condições vasculares. Condições vasculares incluem, mas não estão limitadas a, distúrbios tais como DVT, doença vascular periférica, isquemia cerebral, incluindo derrame cerebral, e PE. Um ataque isquêmico cerebral ou isquemia cerebral é uma forma de condição isquêmica na qual o suprimento de sangue ao cérebro é bloqueado. Esta interrupção ou redução no suprimento de sangue ao cérebro pode resultar de uma variedade de

causas, incluindo um bloqueio intrínseco ou oclusão do próprio vaso sanguíneo, uma fonte remotamente originada de oclusão, pressão de perfusão diminuída, ou viscosidade de sangue aumentada, resultando em fluxo de sangue cerebral inadequado, ou um vaso de sangue rompido no espaço subaracnóide ou tecido intracerebral. Os métodos são úteis para tratamento de isquemia cerebral. A isquemia cerebral pode resultar em déficits transientes ou permanentes e a seriedade do dano neurológico em um paciente que experimentou isquemia cerebral depende da intensidade e duração do evento isquêmico. Um ataque isquêmico transiente é um em que o fluxo de sangue para o cérebro é interrompido somente brevemente, e causa déficits neurológicos temporários, que frequentemente são claros em menos do que 24 horas. Os sintomas de TIA incluem torpor ou fraqueza de face e membros, perda da capacidade de falar claramente e/ou compreender a fala de outros, uma perda de visão ou obscuridade de visão, e um sentimento de vertigem. Ataques isquêmicos cerebrais permanentes, também denominados derrame cerebral, são causados por uma interrupção ou redução mais longa no fluxo de sangue resultante de ou uma trombina ou embolismo. Um derrame cerebral causa uma perda de neurônios tipicamente resultando em um déficit neurológico que pode melhorar, mas que não dissolve totalmente.

O derrame cerebral tromboembólico é devido à oclusão de um vaso sanguíneo extracranial ou intracranial por um trombo ou êmbolo. Devido a ser frequentemente difícil discernir se um derrame cerebral é causado por uma trombose ou embolismo, o termo "tromboembolismo" é usado para cobrir derrames cerebrais causados por qualquer destes mecanismos.

Os métodos são também dirigidos ao tratamento de derrame cerebral tromboembólico agudo usando-se uma preparação de LMWH aqui provida. Um derrame cerebral agudo é uma síndrome médica envolvendo dano neurológico resultante de um evento isquêmico, que é uma interrupção ou redução no suprimento de sangue ao cérebro.

Uma quantidade efetiva de uma preparação de LMWH sozinha ou em combinação com outro terapêutico para o tratamento de derrame cerebral é aquela quantidade suficiente para reduzir dano de cérebro *in vivo*

resultante de derrame cerebral. Uma redução de dano cerebral é qualquer prevenção de dano ao cérebro que, de outro modo, teria ocorrido em um indivíduo que experimenta um derrame cerebral tromboembólico ausente de tratamento aqui descrito. Vários parâmetros fisiológicos podem ser usados para avaliar a redução de dano cerebral, incluindo tamanho de infarto menor, fluxo de sangue cerebral regional aperfeiçoado, e pressão intracranial diminuída, por exemplo, conforme comparado a parâmetros de paciente de pré-tratamento, pacientes de derrame cerebral não-tratados, ou pacientes com derrame cerebral tratado com agentes trombolíticos apenas.

10 A preparação de LMWH pode ser usada sozinha ou em combinação com um agente terapêutico para tratar uma doença associada com coagulação. Exemplos de terapêuticos úteis no tratamento de doenças associadas com coagulação incluem agentes de anticoagulação, agentes anti-plaquetas, e agentes trombolíticos.

15 Agentes de anticoagulação previnem a coagulação de componentes de sangue e, desse modo, previnem formação de coágulo. Anticoagulantes incluem, mas não estão limitados a, varfarina, Coumadin, dicumarol, fenprocoumon, acenocoumarol, biscoumacetato de etila, e derivados de indandiona. "Inibidores de trombina direta" incluem hirudin, hirugen, Angiomax, agatroban, PPACK, aptameros de trombina. Agentes anti-plaquetas inibem agregação de plaqueta, e são frequentemente usados para prevenir derrame cerebral tromboembólico em pacientes que tenham experimentado um ataque isquêmico transiente, ou derrame cerebral. Agentes trombolíticos lisam coágulos que causam o derrame cerebral tromboembólico. Agentes

20 trombolíticos têm sido usados no tratamento de tromboembolismo venoso agudo e embolia pulmonar, e são conhecidos na técnica (por exemplo, vide Hennekens et al., J Am Coll Cardiol; v. 25 (7 supp), p. 18S-22S (1995); Holmes, et al, J Am Coll Cardiol; v. 25 (7 suppl), p. 10S-17S(1995)).

25 Embolismo pulmonar, conforme aqui usado, se refere a uma distúrbio associada com o aprisionamento de coágulo de sangue no lúmen de uma artéria pulmonar, causando disfunção respiratória severa. Embolia pulmonar frequentemente se origina nas veias das extremidades inferiores on-

30

de coágulos se formam na veia da perna profunda e, em seguida, se deslocam para os pulmões, via a circulação venosa. Desse modo, embolismo pulmonar frequentemente ocorre como uma complicação de trombose venosa profunda nas veias de extremidade inferior. Os sintomas de embolismo pulmonar incluem ataque agudo de brevidade de respiração, dor no peito (piora com respiração), e taxa de coração e taxa respiratória rápidas. Alguns indivíduos podem experimentar hemoptise.

As preparações e métodos são também úteis para tratamento ou prevenção de aterosclerose. A heparina tem se mostrado ser benéfica na prevenção de aterosclerose em vários modelos experimentais. A aterosclerose é uma forma de aterosclerose que é acreditada ser a causa de muitas doenças de artéria coronária, aneurisma aórtico e doença atrial das extremidades inferiores, bem como contribuindo para doença cerebrovascular.

As preparações de LMWH são também úteis antes, durante e após cirurgia e procedimentos de diálise. Pacientes cirúrgicos, especialmente aqueles acima da idade de 40 anos, têm um risco aumentado de desenvolver DVT. Desse modo, o uso das preparações de LMWH aqui providas para prevenção do desenvolvimento de trombose associada com procedimentos cirúrgicos é contemplado. Em adição aos procedimentos cirúrgicos gerais, tais como intervenção percutânea (por exemplo, intervenção coronária percutânea (PCI), stents e outras aproximações similares, reposição de bacia e joelho, cirurgia de by-pass cardíaca-pulmonar, cirurgia de revascularização coronária, cirurgia ortopédica, e cirurgia de reposição de prótese, os métodos são também úteis em indivíduos suportando um procedimento de transplante de tecido ou órgão, ou tratamento de fraturas, tais como fraturas de bacia.

Em adição, as preparações de LMWH aqui providas são úteis para tratamento de doenças respiratórias, tais como fibrose cística, asma, alergia, enfisema, síndrome de angústia respiratória adulta (ARDS), dano de reperfusão de pulmão, e dano de isquemia-reperfusão do pulmão.

A fibrose cística é uma doença progressiva crônica que afeta o sistema respiratório. Uma sequência séria de fibrose cística é infecção de

pulmão por *Pseudomonas aeruginosa*, que por si monta em quase 90% da morbidez e mortalidade na fibrose cística. Terapêuticos para tratamento de fibrose cística incluem antimicrobianos para tratamento da infecção patogênica.

- 5 A asma é uma distúrbio do sistema respiratório caracterizada por inflamação, estreitamento das vias aéreas e reatividade aumentada das vias aéreas a agentes inalados. A asma é frequentemente, embora não exclusivamente, associada com sintomas atópicos e alérgicos. A asma pode também incluir asma induzida por exercício, resposta a broncoestimulantes, hi-
- 10 persensibilidade tipo retardada, encefalomielite auto imune e distúrbios relacionadas. As alergias são geralmente causadas por geração de anticorpo IgE contra alérgenos. O enfisema é uma distensão dos espaços de ar distais ao bronquíolo terminal com destruição do septo alveolar. O enfisema ocorre de dano do pulmão induzido por elastase. A síndrome de angústia respiratória adulta é um termo que envolve muitas lesões de pulmão infiltrativas difusas agudas de ideologias diversas que são acompanhadas por hipoxemia
- 15 atrial severa. Uma das causas mais frequentes de ARDS é sepsia.

- Doenças inflamatórias incluem, mas não estão limitadas a, doenças autoimune e distúrbios atópicas. Outros tipos de doenças inflamatórias que são tratáveis com as preparações de LMWH aqui providas são colite ulcerativa refratária. Doença de Crohn, esclerose múltipla, doença autoimune, colite ulcerativa não-específica, sepsia e cistite intersticial.
- 20

- As preparações de LMWH podem ser usadas para tratar distúrbio fibróticas, tal como fibrose de órgão maior, distúrbios fibroproliferativas, e cicatrização associada com trauma. Fibroses de órgão maior incluem, mas não estão limitados a, doença de pulmão intersticial (ILD), cirrose do fígado, doença do rim (por exemplo, diabetes e doença hipertensiva não-tratada), doença do coração e distúrbios do olho (por exemplo, degeneração macular, retinopatia retinal ou vítrea). Exemplos de distúrbios Fibroproliferativas incluem escleroderma sistêmica e local, quelíoides e cicatrizes hipertróficas, aterosclerose, restenose, fibrosarcoma, e artrite reumatóide. Exemplos de cicatrização associada com trauma incluem cicatrização devido à cirurgia, fibro-
- 25
- 30

se induzida por quimioterapêutico, fibrose induzida por radiação, cicatrização associada com dano ou queimaduras.

Em uma concretização, as preparações de LMWH são usadas para inibir angiogênese. A angiogênese conforme aqui usada é a formação inapropriada de novos vasos sanguíneos. "Angiogênese" frequentemente ocorre em tumores quando células endoteliais secretam um grupo de fatores de crescimento que são mitogênicos para endotélio, causando o alongamento e proliferação de células endoteliais que resultam na geração de novos vasos sanguíneos. Vários dos mitogênicos angiogênicos são peptídeos de ligação de heparina que estão relacionados a fatores de crescimento de célula endotelial. A inibição de angiogênese pode causar regressão de tumor em modelos de animal, sugerindo um uso como um agente anticâncer terapêutico. As distúrbios angiogênicos incluem, mas não estão limitadas a, distúrbios neovasculares do olho, osteoporose, psoríase, artrite, câncer, e distúrbios cardiovasculares.

As preparações de LMWH podem também serem usadas para inibir crescimento celular e metástase. Desse modo, os métodos são úteis para tratamento e/ou prevenção de proliferação de célula de tumor ou metástase em um indivíduo. O câncer pode ser um câncer maligno ou não-maligno. Cânceres ou tumores incluem, mas não estão limitados a, câncer do trato biliar; câncer do cérebro; câncer do seio; câncer cervical; coriocarcinoma; câncer de cólon, câncer endometrial; câncer esofageal; câncer gástrico; câncer intraepitelial; leucemia, linfomas; câncer de fígado; câncer de pulmão (por exemplo, célula pequena e não-pequena); melanoma; neuroblastomas; câncer oral; câncer ovariano; câncer pancreático; câncer de próstata; câncer retal; sarcomas; câncer de pele; câncer testicular; câncer de tireóide; e câncer renal, bem como outros carcinomas e sarcomas.

Um indivíduo em necessidade de tratamento de câncer pode ser um indivíduo que tem alta probabilidade de desenvolver câncer. Estes indivíduos incluem, por exemplo, indivíduos tendo uma anormalidade genética, a presença da qual foi demonstrada ter uma relação correlativa a uma probabilidade mais alta de desenvolver um câncer, e indivíduos expostos a a-

gentes que causam câncer, tais como, tabaco, asbestos, ou outras toxinas químicas, ou um indivíduo que tenha sido anteriormente tratado para câncer e está em remissão aparente.

5 Quando administrada a um paciente suportando tratamento de câncer, a preparação de LMWH pode ser administrada em coquetéis contendo outros agentes anticâncer. A preparação de LMWH pode também ser administrada em coquetéis contendo agentes que tratam os efeitos colaterais de terapia de radiação, tais como antieméticos, protetores de radiação, etc.

10 Os tratamentos aqui providos podem adicionalmente incluir administração de sulfato de protamina para neutralizar a atividade anti-Xa e atividade anti-IIa da preparação de LMWH, por exemplo, uma vez que atividade de anticoagulação ou anti-trombótica não é mais necessária. O sulfato de protamina pode ser administrado, por exemplo, por administração intra-
15 venosa, a uma dose de cerca de 1, 2, 3 mg de sulfato de protamina por 100 IU de atividade anti-Xa. As IUs de atividade anti-Xa podem ser determinadas usando-se, por exemplo, os ensaios de coagulação aqui descritos.

Outras Concretizações

20 A fabricação é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que não devem ser interpretados como limitantes. O conteúdo de todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados no decorrer deste pedido estão aqui incorporados pela referência.

Métodos de Fabricação de M118-MEH

Processo de Fabricação

25 A descrição do processo usado para produzir M118-REH é mostrada na figura 1. Brevemente, na Etapa 1 do processo, Heparina Não-Fracionada comercialmente disponível, USP (UFH), foi submetida a um série gradual de precipitações de etanol aquoso com acetato de cálcio em uma razão de massa para massa de 3:1 de acetato de cálcio para UFH para ex-
30 trair a porção do UFH que é de peso molecular inferior (também referido como a porção que é substancialmente a fração de movimento rápido). O produto resultante do fracionamento da Etapa 1 foi designado Intermediário 1.

A Etapa 2 envolve a digestão do intermediário 1 usando uma enzima heparinase III modificada tendo uma substituição de uma alanina por histidina no resíduo de aminoácido 225 (MO11) no tampão de acetato de sódio aquoso, pH 7,2 a 37°C, para produzir o intermediário 2. MO11 clivado por β -eliminação entre resíduos N-acetilglucosamina e sob ácidos urônicos sulfatados produzindo cadeias tendo um grupo $\Delta 4,5$ ácido urônica na extremidade de não-redução e uma N-acetil glucosamina na extremidade de redução. Quando a digestão estava completa, calor foi retirado e cloreto de sódio foi adicionado para alcançar uma concentração de solução final de aproximadamente 2% p/v.

Na Etapa 3, cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) foi usada para separar os componentes de antifator Xa e IIa altos de Intermediário 2 para fora dos materiais de atividade inferiores. O produto desta etapa foi designado Intermediário 3.

Na Etapa 4, materiais de Intermediário 3 individuais ou combinados foram dissolvidos em água purificada, filtrados através de um filtro de 0,2 μ m, e liofilizados para produzir substância de fármaco M118-REH.

Material de Partida na Fabricação de M118-REH

Especificações de Materiais de Partida

O material de partida para produção de M118-REH, UFH sódio (USP) é origem de mucosa intestinal de suíno. Em adição aos testes de USP, controles adicionais foram postos no lugar. Estes controles estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Ensaios de UFH e Especificações em Adição a DMF

Teste	Especificação
Certificado de Potência de Análise	NLT 160 U/mg em uma base seca
Eletroforese de Gel de Agarose	Relatório de heparina de Movimento Rápido e de Movimento Lento Relatório de sulfato de Dermatan e sulfato de Chondroitin

A Eletroforese de Gel de Agarose (AGE) separa semi-

quantitativamente os vários componentes de materiais baseados em heparina, como sulfato de dermatan e sulfato de condroitina na base de sua mobilidade eletroforética. Uma separação horizontal em 0,5% de gel de agarose foi conduzida em tampão de acetato de bário pH 5,8, seguido por tampão de acetato de 1,3-diaminopropano pH 9. Um tanque de eletroforese especial foi empregado, pelo que as câmaras de eletrodo contendo tampão líquido foram assentadas com um solvente orgânico de baixa densidade imiscível em água (por exemplo, éter de petróleo ou heptano). Este desenho proporciona transferência de calor eficiente entre a placa de gel de agarose e uma bandeja de arrefecimento de metal preenchida com gelo.

Heparinas de baixo peso molecular são tradicionalmente preparadas de UFH de grau USP. Para alcançar uma substância de fármaco de heparina de peso molecular baixo de potência mais alta, o material de partida de UFH para o processo de M118-REH foi restringido àqueles com potências em excesso de 160 IU/mg. Para controlar os níveis de sulfato de dermatan e sulfato de condroitin, estes foram medidos no material de partida de UFH, e controlados na Etapa 1 do processo de fabricação de M118-REH.

Análise Estrutural de Intermediários

As etapas no processo de fabricação de M118-REH são esboçadas acima e mostradas na figura 1. A tecnologia de caracterização para estudo de estrutura de açúcar proporciona uma compreensão dos atributos estruturais que mudam quando UFH é submetido a este processo em cada etapa. Esta informação permite controle e reprodutibilidade a partir do processo, incluindo seleção de material de partida.

A análise dos materiais da Etapa 2 diferentes (ou amostras de Intermediário 1) e as amostras de UFH de partida usadas para prepará-los quando efetuada usando-se análise de 2D-RMN (HSQ), e eletroforese capilar.

Os blocos de construção que constituem o material de partida, bem como o intermediário, foram identificados e quantificados. Alguns dos materiais da Etapa 2 estudados não eram substratos ideais para a próxima etapa (digestão enzimática), e atributos foram identificados, que indicam o

material preferido da etapa 2.

Mostrados na Tabela 2 e Tabela 3 abaixo estão dados de análise de 2D RMN que ilustram as diferenças entre o material de UFH de partida e da etapa 2. Esta análise permite determinação das diferenças totais em atributos estruturais quando indo através da Etapa 1 do processo de fabricação de M118-REH. Baseado em todos os dados obtidos a partir de análises diferentes, certas conclusões sobre o material de partida, intermediários e processo de fabricação, foram feitas.

10 Tabela 2: Análise de 2D RMN de UFH e os materiais da etapa 2 obtidos dos mesmos. Estes materiais representam o material preferido da etapa 2.

Monossacarídeo	UFH Nº 1	Etapa 2		UFH Nº 2	Etapa 2 Nº 3
		Nº 1	Nº 2		
Glucosamina					
H_{NS}-(I_{2S})	63,7	57	57,1	65,6	56,3
H_{NS}-(I)	9	11,1	12,3	7,4	12,3
H_{NS}-(G)	7,7	12,7	11,2	8,9	11,8
H_{NS}-(interno)	12,1	13,9	14,6	11,1	13,3
H_{NS,3S}	6,1	4,4	4,8	7	5,5
H_{6S}	78,2	85,3	85,8	82,5	86,7
Região de Ligação (L.R.)	4,2	3,6	3,8	2,1	1,8
ΔU	0	0	0	0	0
I_{2S}	73	66,8	70,9	75,9	70,2
I-(H_{NS/Ac,6S})	8,1	11,8	9,4	7,2	8,5
I-(H_{NS/Ac})	1,4	2	1,4	0,8	1,1
G-(H_{NS})	8,1	11,2	8,4	8	9,6
G-(H_{NS3S})	2,8	2,8	3,2	2,7	3,7
G-(H_{NAC})	6,5	5,3	6,6	5,3	4,6
Epóxido	0	0	0	0	0,6

O material da etapa 2 tem teor de I_{2S} relativo inferior quando comparado ao material de partida, e isto foi refletido pela diminuição na estrutura H_{NS}-(I_{2S}), conforme mostrado na tabela. Isto foi acompanhado por um

aumento concomitante nas estruturas de $H_{NS}-(I)$ e $H_{NS}-(G)$ conforme esperado. Interessantemente, também existiu um aumento relativo na quantidade de hexosamina 6-O-sulfatada (H_{6S}).

Tabela 3: Análise de 2D RMN de UFH e os materiais da etapa 2 obtidos dos mesmos. Estes materiais representam o material menos preferido da etapa 2.

5

Monossacarídeo	UFH Nº 1	Etapa 2 Nº 1	UFH Nº 2	Etapa 2 Nº 2
Glucosamina		63		
$H_{NS}-(I_{2S})$	68,1	10,7	66,6	61,8
$H_{NS}-(I)$	6,3	12,7	8,6	11,9
$H_{NS}-(G)$	8,5	8,3	9,5	11,1
$H_{NS}-(\text{interno})$	11,2	5,3	9,8	8,1
$H_{NS,3S}$	5,9	89,2	5,4	6,8
H_{6S}	82,2	1,5	84,7	88,4
Região de Ligação (L.R)	2,1		1,8	1,1
ΔU	0	0	0	0
I_{2S}	76,8	71,3	76,1	69,8
$I-(H_{NS/Ac,6S})$	6,7	6,3	6,2	7,1
$I-(H_{NS/Ac})$	0,6	0,8	2	1,6
$G-(H_{NS})$	7,2	10	6,6	10,3
$G-(H_{NS3S})$	1,6	2,3	3,7	3
$G-(H_{NAc})$	4,3	2,4	3,6	2,1
Epóxido	2,8	3,6	1,8	2,4

10 Materiais da etapa 2 "preferidos" são aqueles que são bons substratos para a próxima etapa no processo, isto é, digestão enzimática por MO11, pelo que materiais da etapa 2 "menos preferidos" são substâncias mais pobres. Quando se compara as quantidades relativas do H_{NS} (interno), foi observado que nos materiais da etapa 2 "preferidos", o teor de H_{NAc} aumenta após a etapa 1, pelo que em materiais da etapa 2 "menos preferidos", ele é reduzido (vide Tabela 2 e 3). Outra observação foi que a quantidade relativa da unidade de $G-H_{NAc}$ foi reduzida a uma extensão muito maior na

etapa 2 "menos preferida" conforme comparado ao material da etapa 2 "preferido". Estas observações foram justificadas no contexto de especificidade de substrato de MO11 que preferem agir na ligação adjacente a ácido glucurônico não-sulfatado (isto é, H_{NAC}-G).

- 5 Através da análise, atributos estruturais que mudam durante a primeira etapa (precipitação) do processo de fabricação que vai da UFH para o material da etapa 2 foram idênticos. Desde que o teor de N-acetil no material da etapa 2 pareça ser importante para a etapa de digestão enzimática subsequente, é desejável usar uma UFH de partida com teor de N-acetil
- 10 mais alto que pode permitir melhor produção de material da etapa 2 após precipitação. Portanto, baseado nesta análise, um critério pré-selecionado para UFH de partida foi identificado, que permite melhor controle e avaliação do processo de fabricação de M118-REH.

- 15 Outros ensaios e especificações para intermediários de processo são mostrados na Tabela 4, e descritos em detalhes abaixo.

Tabela 4: Ensaios e Especificações para Intermediários

Intermediário	Ensaio	Especificações
1	Eletroforese de Gel de Agarose: Sulfato de Dermatan e Chondroitin abaixo do limite de detecção	Sulfato de Dermatan e Chondroitin abaixo do limite de detecção
2	Ensaio Cromogênico Automático	
2	SEC-MALS	
3	Ensaio Cromogênico Automático	Antifator Xa NLT 130 IU/mg
	Ensaio Cromogênico Automático	
	SEC-MALS	Massa Molar: 5000-9000 Dálton Polidispersidade (PD): NMT 1,5

O processo de Eletroforese de Gel de Agarose foi descrito aci-

ma.

A atividade de antifator Xa foi medida conforme aqui descrito. A atividade de antifator Xa foi medida, ou em um analisador Diagnostica Stago com o kit Stachrom® Heparin Test, ou em um sistema de Coagulação ACL Futura® com o Kit Coastest® Heparin de Chromogenix. A resposta do analisador foi calibrada usando-se o Padrão Internacional para Heparina de Baixo Peso Molecular, lote 01/608, ou lote atual. A potência de Substância de Fármaco de M118-REH foi calculada em Unidades Internacionais de atividade de antifator Xa por miligrama, usando-se os métodos estatísticos para ensaios de linha paralelos.

A atividade de antifator IIa foi medida conforme aqui descrito, usando-se o seguinte princípio. A atividade de antifator IIa foi medida, ou em um analisador Diagnostica Stago, ou em um sistema de Coagulação ACL Futura®, com reagentes de Chromogenix (substrato S-2238, trombina (53nkat/frasco), e antitrombina). A resposta do analisador foi calibrada usando-se o Segundo Padrão Internacional para Heparina de Baixo Peso Molecular, lote 01/608, ou equivalente. A potência de Substância de Fármaco de M118-REH foi calculada em Unidades Internacionais de atividade de antifator IIa por miligrama, usando-se os métodos estatísticos para ensaios de linha paralelos.

A massa molar média de peso, a polidispersidade e a distribuição de massa molar de Intermediários de M118-REH foram medidas usando-se um sistema de Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) fixado a um detector de Difusão de Luz Multiângulo Wyatt miniDAWN, ou qualquer outro detector LALS adequado, e um refratômetro interferométrico Optilab rEX (RID), ou outro RID adequado de acordo com USP <621>, versão atual. O conjunto de colunas de SEC consiste em colunas acondicionadas com um acondicionamento de alta resolução L20, por exemplo, uma coluna de proteção Tosoh SWXL acoplada com um Tosoh TSKgel G3000SWXL e um Tosoh TSKgel G2000WXL em série. O sistema foi equilibrado a 0,5 mL/min com uma fase móvel de sulfato de sódio a 0,2M cujo pH foi ajustado para 5,0 com ácido sulfúrico. Sódio azida foi adicionada a 0,05% na fase móvel. O inter-

mediário de M118-REH foi dissolvido na fase móvel para obter 10mg/mL de solução antes da injeção. A massa molar média de peso, a polidispersidade e os parâmetros de distribuição foram medidos usando-se software Wyatt Astra, ou qualquer software apropriado. A distribuição foi caracterizada pela percentagem de cadeias com uma massa molar mais baixa do que 5.500 Da (M_{5500}), e a percentagem de cadeias com uma massa molar mais alta do que 8.000 Da (M_{8000}), ou pela percentagem de cadeias com uma massa molar mais baixa do que 5.000 Da (M_{5000}), e a percentagem de cadeias com uma massa molar mais alta do que 7.500 Da (M_{8000}).

Na etapa 2 do processo de M118-REH, o Intermediário 1 foi digerido com enzima MO11. Conforme a enzima digere o substrato de Intermediário 1, é gerado Intermediário 2 contendo resíduos de $\Delta 4,5$ ácido urônico possuindo uma absorvância UV_{232} característica. Para monitorar o progresso da digestão, a solução de reação foi amostrada periodicamente, e a absorvância em 232 nm foi medida. A digestão da etapa 2 foi considerada completa quando a absorvância em 232 nm não tinha mudado mais do que 2 AU em 1 hora.

A Tabela 5 mostra o peso molecular médio de peso e distribuição de várias preparações de LMWH de M118-REH. A Tabela 6 mostra uma comparação de produtos de M118-REH, LMW e UFH.

Tabela 5: Peso molecular, polidispersidade e comprimento de cadeia característico de 5 lotes diferentes de M118-REH

<u>LOTE</u>	<u>MW(Da)</u>	<u>PD</u>	<u>M5500</u>	<u>M8000</u>	<u>N</u>
1	7250	1,1	24,6%	31,9%	13
2	7300	1,1	26,4%	33,0%	13
3	7500	1,1	24,6%	35,0%	13
4	6350	1,1	38,6%	17,7%	12
5	6450	1,1	40,6%	20,7%	12

*MW calculado com dn/dc medido no material M118-REH.

Tabela 6: Comparação de Produtos M118, LMWH e UFH

Atributo	M118-REH ¹	Lovenox ²	UFH ³
Atividade Anti-Xa (IU/mg)	228	100	150
Atividade Anti-IIa (IU/mg)	155	2,5	150
Razão de Anti-Xa/ Anti-IIa	1,5:1	4:1	1:1
Peso Molecular Médio	6350	4.500	12.000
Polidispersidade	1,1	1,3	1,6
Biodisponibilidade subcutânea	Sim	Sim	Não
Reversibilidade w/protamina	Total	Parcial	Total
Monitorável com ACT/APTT	Sim	Não	Sim

^{1,*} Valores para lote usado em formulação de Produto de Fármaco M118-REH; MW médio processado com dn/dc estimado de dados de literatura em UFH

5 ² Inserto de acondicionamento de Lovenox

³ Monografia de heparina USP

Caracterização estrutural de M118-REH: Identificação de características estruturais de M118-REH

10 Uma aproximação para a caracterização de M118-REH foi desenvolvida, que envolve várias técnicas analíticas diferentes que proporcionam conjuntos complementares de dados.

Isto proporciona caracterização de M118-REH, e permite uma compreensão do o que torna o M118-REH único quando comparado a outras LMWHs. Os resumos de descobertas a partir destas técnicas de caracterização ajudam a definir o M118-REH como uma mistura única.

15 Uma caracterização de heparina não-fracionada (UFH) e produtos de LMWH foi completada usando-se uma série de técnicas analíticas que conduzem a identificação de estruturas químicas únicas para uma dada LMWH, estruturas que estão presentes em várias LMWH diferentes, mas em 20 quantidades variantes, e estruturas que são responsáveis pelas propriedades biológicas de heparinas.

A análise de uma mistura de LMWH complexa similar a M118-REH necessita contar não somente a variabilidade estrutural inerente que

ocorre a partir da biosíntese de heparina, mas também as estruturas que ocorrem a partir da clivagem enzimática e processos de fabricação. Isto pode ser determinado pela decomposição de assinaturas naturais, bem como de extremidades de redução e não-redução (se houverem) presentes na
 5 mistura. Ao mesmo tempo, é também necessário ser confirmado que a "ordem" relativa das unidades de dissacarídeos, conforme definido pela molécula de UFH de origem, não é afetada pelo processo de fabricação. Portanto, é necessário proporcionar um contexto de sequência no qual estes blocos de construção modificados ou naturais estão presentes nas cadeias de
 10 M118-REH. Para contar com estes fatores, uma aproximação para a caracterização de M118-REH foi desenvolvida, que envolve usar dados obtidos de técnicas analíticas diferentes que proporcionam conjuntos únicos e complementares de dados.

A análise de composição foi realizada com CE para identificar e
 15 quantificar blocos de construção individuais que compreendem as cadeias de M118-REH. Estes métodos também identificam estrutura de bloco de construção que é responsável pela atividade anti-Xa, referida como "Bloco de Construção Anti-Xa".

Análise de Bloco de Construção/Análise Composicional

20 Análise Composicional por Eletroforese Capilar (CE)

Brevemente, este método envolve a digestão enzimática de M118-REH em seus blocos de construção constituintes, seguido por separação usando-se CE (figuras 2A e 2B).

CE é uma técnica de separação de alta resolução e tem sido
 25 usada extensivamente na análise de UFH e outras glicosaminoglicans. O método atual usa eletroforese de zona capilar em um capilar de sílica fundida não-revestida. Com eletroforese capilar, as muitas espécies altamente sulfatadas migram através do capilar mais rápido, e são detectadas primeiro.

Dados Representativos

30 O perfil de digestão de enzima para M118-REH, conforme observado por CE, é mostrado na figura 2. Notavelmente, blocos de construção não-modificados além daqueles presentes em UFH foram observados em

M118-REH (indicado pelas estruturas 1,6 observadas para enoxaparina). Outra observação interessante foi que a quantidade de espécies 3-O-sulfatadas foi quase dobrada em M118-REH, conforme comparada a enoxaparina (indicado pelo pico AT-III tetra). Isto se correlaciona bem com a atividade anti-Xa mais alta observada para esta mistura, e estava consistente com a metodologia para produção de M118-REH. A extensão de sulfatação total foi também mostrada ser levemente mais alta para M118-REH do que enoxaparina baseado nesta técnica.

Esta técnica foi também usada para determinar a presença e quantidade de cada um dos componentes de sacarídeo de bloco de construção de M118-REH (Tabela 12).

Tabela 7. Sacarídeo de bloco de construção observado em análise de CE de M118-REH

Pico	Estrutura
1	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$
2	$\Delta U_{2S}H_{NS}$
3	$\Delta UH_{NS,6S}$
4	$\Delta U_{2S}H_{Nac,6S}$
5	ΔUH_{NS}
6	$\Delta U_{2S}H_{Nac}$
7	$\Delta UH_{NS,6S}$
8	ΔUH_{NS}
9	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,3S}$
10	$\Delta U_{2S}H_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$
11	$\Delta UH_{NS,6S}I_{2S}$
12	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$
13	$\Delta U_{gal}H_{NS,6S}$
14	$\Delta U_{gal}H_{NS}$

Quantitativamente, nenhum bloco de construção 1,6-anidro (observado em enoxaparina), ou estrutura 2,5-anidro (vista em daltaparina) foram observadas no perfil de M118-REH. Algumas observações interessantes ocorreram a partir da análise quantitativa destas estruturas. Quando compa-

rando a % de mol relativa de pico ($\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$) entre enoxaparina e M118-REH, uma quantidade mais alta do pico estava presente em M118-REH (Tabela 6), confirmando que o processo de fabricação de M118-REH enriquecido para as sequências de anticoagulante ativo em heparina. A
 5 quantidade de trissacarídeo ($\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}$) foi relativamente baixa em M118-REH comparada a enoxaparina. Isto é uma reflexão do processo para manufatura. O processo químico usado para produzir enoxaparina resulta em "cascas" a partir da extremidade de redução de oligossacarídeos, au-
 mentando, desse modo, o número de cadeias de número ímpar. Este não é
 10 o caso para M118-REH e, desse modo, o nível de trissacarídeo foi uma consequência direta de o que foi observado na UFH de partida. Esta análise indica que a metodologia de CE foi sensível bastante para captar atualmente estas mudanças que são indicativas de processos diferentes usados para fabricação de LMWHs e, desse modo, pode ser muito discriminatória.

15 Tabela 8: Comparação quantitativa de estruturas selecionadas: M118-REH e enoxaparina

Estrutura	M118	Enoxaparina
$\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$	8,6	4,7
$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}$	0,6	1,9

Análise Composicional por 2D RMN

A espectroscopia de RMN foi bem sucedidamente usada para detecção e quantificação de sinais associados com características estrutu-
 20 rais maiores ou menores em polissacarídeos. A espectroscopia de RMN é também uma das únicas técnicas que permitem uma determinação efetiva dos componentes de ácido idurônico e glucurônico na mistura. Espectroscopia bidimensional (2D)RMN foram usadas como um meio de decompor e identificar sinais distintos que correspondem a uma certa população de resí-
 25 duos de monossacarídeos. Esta aproximação capacita uma, ou não somente quantifica os constituintes de monossacarídeo básicos da mistura, mas para também avaliar seus ambientes de ligação em uma maneira quantitativa.

Dois RMN bidimensionais proporciona uma técnica complementar à análise composicional de M118-REH por CE. 2D RMN proporciona in-

formação em dissacarídeos H-U ligados, proporcionando, desse modo, análise complementar de ligações de dissacarídeo. Metodologia recente usando-se experimentos de espectroscopia de correlação 2D próton-carbono(HSQC) tem demonstrado a capacidade de obter esta análise composicional quantitativa nas glicosaminoglicans.

Os espectros da região anomérica de M118-REH, conforme medido usando-se espectroscopia de correlação 2D próton-carbono(HSQC), são apresentados na figura 4. Os picos cruzados na região anomérica são mostrados na figura.

Uma análise da região anomérica de M118-REH proporcionou alguma informação muito interessante com relação ao o que torna o M118-REH único comparado a outras LMWHs. Primeiro, a região anomérica é muito mais simples quando comparada a outras LMWHs, similar a enoxaparina. Segundo, quando se analisa a redução de resíduos terminais das cadeias, foi observado que uma maioria das cadeias termina em N-acetilglucosamina, e somente uma quantidade menor das cadeias termina em N-sulfoglucosamina. Isto ocorre como um resultado da especificidade da enzima usada para preparar M118-REH. Terceiro, os dados de RMN indicam que ~30% das cadeias têm um resíduo Δ U na extremidade de não-redução, que é, novamente, um resultado da especificidade da enzima. Quarto, nenhum G-H_{Nac} dissacarídeo foi observado em M118-REH. Finalmente, nenhuma região de ligação de sacarídeo foi observada no espectro de RMN. A percentagem de composição de monossacarídeos em M118-REH e seus ambientes de ligação são reportados na Tabela 7. A análise de RMN também capacita à determinação da razão de ácido idurônico/ácido glucurônico para M118-REH.

Tabela 9. Percentagem de composição de resíduos de glucosamina e ácido urônico em M-118 (resultados de dois experimentos)

	M118-REH
Glucosamina	
H _{NS} -(I _{2s})	57,6/57,0
H _{NS} -(I)	9,8/12,0

H_{NS}-(G)	11,0/11,1
H_{NS}(interno)	6,1/3,1
H_{NS,3S}	7,3/7,2
H_{NSred}	1,6/1,5
H_{NAC}αredox	4,6/5,1
H_{NAC}βredox	2,0/3,0
H_{6S}	90,4/90,5
L.R	0/<0,1
Uronatos	
ΔU	1,9/2,4
I_{2S}	68,7/70,2
I-(H_{NS/Ac,6S})	9,9/9,5
I-(H_{NS/Ac})	1,4/0,9
G-(H_{NS})	8,7/7,7
G-(H_{NS/3S})	5,9/4,8
G-(H_{NS})	0/0
Ga1A	2,7
Epox	0,8

Conclusões

Os seguintes foram identificados como atributos estruturais de M118-REH:

- Enriquecimento de cadeias de sacarídeo contendo 3-O-sulfato (tetrassacarídeo de ligação de AT-III) baseado no % mol relativo conforme comparado as LMWHs e material de partida de UFH existentes;
- Geração de uma estrutura de extremidade de redução predominante (H_{Nac});
- A única estrutura de extremidade de redução modificada observada é Δ U;
- Manutenção da estrutura de suporte principal de dissacarídeo natural de UFH com introdução limitada de mudanças relacionadas a processo em outras LMWHs;
- Remoção de componentes de UFH a partir da mistura que não

requeriu ligação de anti-Xa ou anti-IIa (trombina), criando, desse modo, uma heparina mais definida;

- A especificidade do processo de despolimerização de M118-REH retém o comprimento de cadeia requerido e separação proximal dos locais de ligação de modo a reter atividade anti-IIa.

Um atributo chave de todos os produtos de LMWH é que cadeias de polissacarídeo mais longas são clivadas em fragmentos menores, via uma variedade de métodos de despolimerização, conforme representado na figura 5. Este evento de clivagem, que pode ser causado ou por reações químicas ou por reações enzimáticas, resulta em assinaturas características em ambas extremidades de redução e de não-redução da molécula. Os grupos terminais característicos presentes é M118-REH, conforme descrito abaixo.

Estrutura na Extremidade de Não-Redução

A especificidade da clivagem enzimática que resultou na formação de uma nova extremidade de não-redução (abreviada como ΔU), capacita o posicionamento do local de ligação de AT-III dentro da cadeia de polissacarídeo.

Estrutura na Extremidade de Redução

As estruturas de glucosamina nas novas extremidades de redução nas cadeias de M118-REH foram refletivas da especificidade da enzima usada no processo. Como um resultado, a maioria das estruturas de extremidade de redução em M118-REH eram resíduos de hexosamina N-acetilada (H_{Nac}).

Diferenças Estruturais Entre M118-REH e Heparina Não-Fracionada

1) M118-REH tem uma %mol mais alta da sequência de sacarídeo de ligação de antitrombina, conforme comparada à heparina não-fracionada de partida (UFH).

2) M118-REH tem quantidade desprezível de região de ligação conforme comparada a UFH de partida.

3) M118-REH tem uma certa percentagem no ácido $\Delta 4,5$ glucurônico na extremidade de não-redução de cadeias, pelo que UFH não con-

tém este resíduo modificado na extremidade de não-redução.

Em resumo, M118-REH é um produto de heparina tendo atributos físicos e funcionais únicos.

Muitos dos atributos estruturais discutidos acima foram uma consequência direta das propriedades da enzima usada para preparar M118-REH. Estes incluem a estrutura de extremidade de redução predominante (H_{Nac}), a única estrutura de extremidade de não-redução modificada (ΔU), bem como a remoção de região de ligação. Também, visto que a enzima preferencialmente cliva os domínios inferiores ou não-sulfatados na mistura de heparina, ela não afeta a sequência de ligação de AT-III, que, como um resultado, é enriquecida em M118-REH.

O protocolo de caracterização acima definido foi usado para analisar 4 bateladas de M118-REH. Esta análise confirma a consistência na manufatura de o que é definido como M118-REH.

15 Tabela 10. Análise de CE de várias bateladas de M118-REH

Pico	Estrutura	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4
1	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$	57,1	59,5	57,0	57,4
2	$\Delta U_{2S}H_{NS}$	6,0	5,6	5,4	6,1
3	$\Delta UH_{NS,6S}$	13,2	12,3	12,2	12,7
4	$\Delta U_{2S}H_{Nac,6S}$	1,8	1,6	1,7	1,8
5	ΔUH_{NS}	0,6	0,7	0,6	0,7
6	$\Delta U_{2S}H_{Nac}$	0,5	0,5	0,4	0,4
7	$\Delta UH_{Nac,6S}$	4,5	3,7	3,7	4,3
8	ΔUH_{Nac}	1,8	1,3	1,5	1,8
9	$\Delta U_{Nac,6S}GH_{NS,3S}$	1,3	1,0	1,2	1,2
10	$\Delta U_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$	10,4	9,4	8,9	8,6
11	$\Delta U_{2S}GH_{NS,6S}I_{2S}$	0,3	0,3	0,7	0,6
12	$\Delta U_{2S}GH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$	0,5	0,7	1,0	0,9
13	$\Delta U_{gal}H_{NS,6S}$	1,7	2,9	4,4	3,0
14	$\Delta U_{gal}H_{NS}$	0,2	0,5	0,9	0,4

Tabela 10A. Faixas Preferidas para picos

Pico	Estrutura	A
1	$\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$	58±5
2	$\Delta U_{2S}H_{NS}$	6±2,5
3	$\Delta UH_{NS,6S}$	13±3
4	$\Delta U_{2S}H_{Nac,6S}$	1,5±1,5
5	ΔUH_{NS}	0,6±1,0
6	$\Delta U_{2S}H_{Nac}$	0,5±1,0
7	$\Delta UH_{Nac,6S}$	4±2
8	ΔUH_{Nac}	1,5±2,0
9	$\Delta U_{Nac,6S}GH_{NS,3S}$	1,2±1,5
10	$\Delta U_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$	9,5±4
11	$\Delta U_{2S}GH_{NS,6S}I_{2S}$	0,5±1,0
12	$\Delta U_{2S}GH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$	0,7±2,0
13	$\Delta U_{gal}H_{NS,6S}$	3,0±3,0
14	$\Delta U_{gal}H_{NS}$	0,6±1,5

Tabela 11. Percentagem de composição de resíduos de M118-REH glucosamina e ácido urônico

Monossacarídeo	1	2	3	4
Glucosamina				
$H_{NS}-(I_{2S})$	54,3	57,0	61,8	57,6
$H_{NS}-(I)$	12,5	12,0	11,0	9,8
$H_{NS}-(G)$	10,8	11,1	9,5	11,0
$H_{Nac}(\text{interno})$	3,4	3,1	4,2	6,1
$H_{NS,3S}$	8,7	7,2	7,0	7,3
H_{NSred}	0,8	1,5	0,4	1,6
$H_{Nac\alpha red}$	6,0	5,1	4,1	4,6
$H_{Nac\beta red}$	3,6	3,0	2,0	2,0
H_{6S}	90,0	90,5	91,3	90,4
Região de Ligação	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Uronatos				
ΔU	2,7	2,4	2,1	1,9

I₂S	69,8	70,2	70,6	68,7
I-(H_{NS/Ac,6S})	11,8	9,5	9,2	9,9
I-(H_{NS/Ac})	1,4	0,9	1,2	1,4
G-(H_{NS})	8,9	7,7	8,4	8,7
G-(H_{NS/3S})	5,4	4,8	4,1	5,9
G-(H_{NAC})	0	0	0	0
Ácido galacturônico	0	2,1	2,4	2,7
Epóxido	0	2,4	2,0	0,8

Tabela 11A. Faixas Preferidas para estruturas

Monossacarídeos	A
Glucosamina	
H_{NS}-(I₂S)	57,7±7
H_{NS}-(I)	11,3±5
H_{NS}-(G)	10,6±5
H_{NS}(interno)	4,2±5
H_{NS,3S}	7,6±5
H_{NS}red	1,1±5
H_{NAC}αred	5,0±5
H_{NAC}βred	2,7±5
H_{6S}	90,6±6
L.R	<0,1-0,0
Uronatos	
ΔU	2,3±5
I₂S	69,8±6
I-(H_{NS/Ac,6S})	10,1±6
I-(H_{NS/Ac})	1,2±5
G-(H_{NS})	8,4±5
G-(H_{NS/3S})	5,1±5
G-(H_{NAC})	0 + 2
Ácido galacturônico	1,8±5
Epóxido	1,3±5

Descrição e Composição de Produto de Fármaco de Injeção M118-REH

O produto de fármaco de injeção de M118-REH é uma solução clara, incolor, levemente amarela em um uso simples de 3 mL, frasco de vidro Tipo 1, vedado com um cessador de clorobutila e sobre-vedado com uma dobra de alumínio. Cada frasco contém nominalmente 5000 IU de atividade de antifator Xa em 2 mL.

A composição quantitativa de injeção de M118-REH é dada na Tabela 11. A composição é dada para o volume rotulado de 2 mL. Os frascos foram encheidos com 2,15 mL, consistente com o volume em excesso recomendado de USP.

Tabela 12. Composição de injeção de M118-REH

Componente	Quantidade por unidade (Frasco)	Função	Padrão de Qualidade
Substância de Fármaco M118- REH	5000 IU de atividade de anti-Xa ¹	Ingrediente Farmacêutico Ativo	N/A
Cloreto de Sódio	Ajuste da Osmolaridade no processo ²	Agente de Osmolaridade	USP
Água para Injeção	q.s. a 2 mL	Solvente	USP

¹ A quantidade de substância de fármaco é calculada baseada na atividade de antifator Xa (em uma base seca) e a Perda na Secagem. Assumindo-se a atividade de antifator Xa de 200 IU/mg, a quantidade de substância de fármaco de M118-REH é 25 mg por frasco.

² A quantidade de Cloreto de Sódio requerida para alcançar uma osmolaridade de 280-330 mOsm/L é aproximadamente 8 mg/mL, ou 16 mg por frasco.

Nenhum diluente foi requerido para uso com injeção de M118-REH.

Componentes de Injeção de M118-REH

A injeção de M118-REH foi fabricada por dissolvimento de Substância de Fármaco de M118-REH em Água para Injeção. A Substância de Fármaco de M118-REH é muito solúvel em solução aquosa, e a distribuição de tamanho de partícula de fármaco, portanto, não tinha efeito no desempe-

nho do produto de fármaco.

Cloreto de Sódio, USP foi o único excipiente usado na injeção de M118-REH (a uma concentração de aproximadamente 8 mg/mL). Cloreto de sódio foi selecionado como um agente de ajuste de osmolaridade para evitar desconforto de local de injeção, e hemólise após administração.

Desenvolvimento do Processo de Fabricação de Injeção de M118-REH

O processo de fabricação de Injeção de M118-REH consiste de dissolvimento da substância de fármaco M118-REH em Água para Injeção, USP, e ajuste da osmolaridade com Cloreto de sódio, USP. A solução formulada foi filtrada através de dois filtros de 0,2 µm em série e assepticamente preenchida em frascos. Produtos de heparina sódio são submetidos à degradação em temperaturas muito altas e, portanto, não podem ser terminalmente esterilizados. O diagrama de fluxo do processo para Injeção de M118-REH é apresentado na figura 6 (descrito abaixo).

A figura 6 mostra um diagrama de fluxo de processo para Injeção de M118-REH. A quantidade de substância de fármaco de M118-REH a ser adicionada a cada batelada foi calculada baseada no Ensaio (atividade de antifator Xa) e Perda nos valores de Secagem a partir do Certificado de Análise de acordo com o seguinte cálculo:

$$2500\text{IU/mL/Ensaio (IU/mg)} \times 100(100 - \text{Perda na Secagem \%}) \times \text{Tamanho da batelada (mL)} \div 1000 \text{ mg/g} = \text{Quantidade de Substância de Fármaco a adicionar (g)}$$

Água para Injeção equivalente a aproximadamente 75% do peso de batelada final foi adicionada ao vaso de formulação, e a mistura foi iniciada. A quantidade calculada de substância de fármaco de M118-REH foi vagarosamente adicionada ao vaso, e misturada até que todo sólido fosse dissolvido. Uma quantidade inicial de Cloreto de Sódio USP foi adicionada, e a solução foi misturada até que todo sólido fosse dissolvido. Água para Injeção foi adicionada ao peso de batelada final, e a solução foi misturada por uns 5-15 minutos adicionais. A osmolaridade foi medida, e Cloreto de Sódio USP adicional foi adicionado, se requerido, para alcançar uma osmolaridade de 280-330 mOsm/L.

Dois filtros pré-esterilizados Millipak 20 PVDF (fluoreto de polivinilideno) de 0,22 µm em série foram usados para esterilizar o produto de fármaco de massa de M118-REH. O produto foi filtrado em um reservatório de enchimento, e, no final da filtração, os filtros foram testados para integridade.

Propriedades biológicas e farmacológicas de M118-REH

M118-REH é o produto de uma digestão enzimática que resulta em uma heparina de baixo peso molecular despolimerizada. A porção despolimerizada é enriquecida para anticoagulação ativa e frações antitrombóticas, que podem ser uma consequência da digestão específica local por uma liase glucosaminoglican específica. O local específico e despolimerização de orientação, via a enzima, capacitou M118-REH a ser uma molécula altamente eficiente na proteção de dano de artéria. Além disso, M118-REH tem o atributo de ser reversível e facilmente monitorado por ensaios de coagulação de leito lateral.

Estudos de M118-REH têm sido feitos para revelar as propriedades farmacológicas e biológicas de M118-REH, e através deste processo, seus modos de ações têm sido explorados ambos in vitro e in vivo. O mecanismo de função de anti-coagulação e anti-trombótico foi investigado. O Relacionamento preliminar de Estrutura e Atividade (SAR) foi determinado nestes estudos. Estes estudos e seus resultados são descritos conforme em seguida, que são análises iniciais para geração do perfil de atividades biofarmacológicas de M118-REH.

Análise In vitro de atividade de coagulação:

A atividade de anti-Xa in vitro de M118-REH varia de 180-300 IU/mg, baseado nos segundos padrões internacionais de heparina de baixo peso molecular. A preparação de M118-REH mais alta em atividades de anti-Xa/IIa in vitro é proporcional a suas frações como $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ contendo porção de 3-O-sulfatação.

A atividade de anti-IIa in vitro de M118-REH varia de 100-250 IU/mg, baseado nos segundos padrões internacionais de heparina de baixo peso molecular.

M118-REH pode prolongar o aPTT in vitro de 40 segundos a 80 segundos a 2,4 µg/ml, e mudança de aPTT é proposicional à atividade de anti-Xa e anti-IIa.

Neutralização in vitro por sulfato de protamina e medida por atividade anti-

5 Xa:

A protamina pode reverter totalmente à atividade de anti-Xa de M118-REH a razão de 1 mg:100 anti-Xa IU em plasma humano. Isto pode ser comparado a outras preparações de LMWH. Por exemplo, protamina pode apenas neutralizar 60% da atividade de anti-Xa de enoxaparina a razão de 3 mg:100 anti-Xa IU em plasma humano. Estes resultados são mostrados na figura 7.

Inibidor de trajetória de fator de tecido de liberação de células endoteliais de veia umbilical humana in vitro (HUEVCs) (TFPI):

HUEVCs de ATCC foram crescidas em 2% de meio modificado de FBS F12K sem ECGS. M118-REH, Lovenox, e UFH foram preparados no mesmo meio com a concentração final de 0,01 mg/ml e 0,005 mg/ml. Três cavidades de células para cada grupo foram incubadas sob 37°C, 5% de CO₂, e 95% de O₂ por 24 e 48 horas. O sobrenadante foi retirado para teste de liberação de TFPI usando-se kit ELISA de ADI.

20 M118-REH a 0,005 mg/ml e 0,01 mg/ml aumentou significativamente a liberação de TFPI de HUEVCs a 24 e 48 horas e, conforme mostrado na figura 8. M118-REH resultou em mais liberação de TFPI de HUEVCs em meio de célula do que heparina. Lovenox não causou uma liberação de TFPI significativamente mais alta quando comparada com o controle.

25 Farmacocinéticas de M118-REH in vivo:

Em modelos de roedores, tais como ratos Sprague-Dawley e camundongos B16M16, M118-REH tinha meia vida de eliminação mais longa do que UFH, e comparável àquela da enoxaparina após injeção intravenosa. M118-REH é rapidamente absorvido após injeção subcutânea com T_{máx} variada de 1 hora a 3 horas.

No modelo de coelho, tal como coelho branco da Nova Zelândia, injeção subcutânea de M118-REH produziu biodisponibilidade mais alta em

- termos de ambas atividade anti-Xa e anti-IIa do que de UFH, a biodisponibilidade variada de 50% a 100% comparada com injeção intravenosa. As farmacocinéticas de M118-REH são comparáveis àquelas de enoxaparina com meia vida de eliminação variada de 3-5 horas, e o mecanismo maior de eliminação é através de excreção renal.

Tabela 13. Parâmetros farmacocinéticos de M118-REH, enoxaparina e UFH após injeção intravenosa em um modelo de coelho e rato.

		M118-REH	Enoxaparina	UFH
T1/2 (hora)	Atividade Anti-Xa	0,87±0,25	1,93±0,45	0,54±0,03
	Atividade anti-IIa	0,85±0,05	1,78±0,63	0,89±0,05
Coelho i.v.	1,5 mg/kg			
T1/2 (hora)	1 mg/kg	0,39±0,06	0,41±0,07	0,35±0,06
Rato i.v.	0,5 mg/kg	0,29±0,12	N/A	0,19±0,04
Anti-Xa				

- Em NHP, tal como macaco Citomólogo, a meia vida de eliminação de M118-REH variou de 20 minutos a 50 minutos. A razão de anti-Xa/IIa após injeção intravenosa foi mantida consistente durante o curso de PK que variou de 0,5 a 2, e M118-REH foi distribuído no sistema de circulação e eliminado através de rota renal baseada na análise de parâmetros farmacocinéticos. A Tabela 14 representa farmacocinéticas de M118-REH em modelo de NHP.

Tabela 14. Farmacocinéticas de M118-REH em NHP

Material de Teste	Grupo		Dose (IU/kg)	Rsq	t1/2 (hora)	Cmax (IU/mL)	AU-CINF_obs (hora*IU /ml)	Vz-obs (mL/kg)	Cl_obs (mL/hora/kg)
Anti-Xa	1	Média	150,0	0,98	0,50	4,07	4,07	27,26	37,24
		SD	0,9	0,02	0,04	0,15	0,54	5,57	4,65
Anti-IIa	2	Média	150	1,0	0,68	2,733	3,45	43,17	43,92
		SD	0,0	0,01	0,05	0,38	0,45	3,66	5,38

As farmacocinéticas de M118-REH representam a primeira ordem de eliminação.

A concentração de TFPI in vivo permaneceu em altos níveis a-

cima de 24 horas após dosagem de M118-REH. ACT e aPTT ambos se correlacionam muito bem com a atividade anti-Xa.

Estudo farmacodinâmico de M118-REH in vivo:

Em modelos de roedores, tais como ratos Sprague-Dawley, M118-REH e UFH foram intravenosamente injetados em 1 ou 2 mg/kg, via veia jugular, enquanto enoxaparina foi dosada a 0,5 ou 1 mg/kg. ACT (tempo de coagulação ativado) foi medido com Hemochron Jr. Neste modelo, o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de coagulação ativada apresentaram resposta de dose para dosagens de escala de M118-REH. ACT aumentou 1,5-3 vezes após distribuição de M118-REH a 0,5 mg/kg, enquanto 2-4 vezes a 1 mg/kg após injeção intravenosa. O perfil farmacodinâmico foi similar àquele das farmacocinéticas em termos de medição de anti-Xa/IIa; a meia vida de eliminação varia de 0,15 a 0,5 hora.

Em um modelo de coelho, tal como coelho branco da Nova Zelândia, aPTT e ACT foram medidos após distribuição de M118-REH intravenosamente. aPTT e ACT aumentaram proporcional a dose de R118-REH. As razões de anti-Xa/IIa foram consistentes após ambas administrações intravenosas e subcutâneas a 1,5 mg/kg. Em contraste àqueles de M18-REH, as razões de Xa/IIa de ambos enoxaparina e UFH após administração intravenosa flutuaram significativamente durante o curso.

Conforme mostrado na figura 9, em modelos de NHP, tal como macaco Cinomólogo, os resultados mostraram que aPTT e ACT aumentaram significativamente 2-4 vezes e 1,5-3 vezes após injeção intravenosa de M-118-REH a 150 anti-Xa IU/kg.

Injeção de bolo intravenosa de M118-REH aumentou a liberação de TFPI na corrente sanguínea por 2-20 vezes, e tais efeitos duraram mais do que 24 horas.

Os efeitos de injeção de bolo intravenosa de R118-REH, seguidos por infusão contínua, foram também estudados em um modelo canino de trombose arterial profunda induzida por dano eletrolítico severo. Mais detalhes com relação a este estudo são providos abaixo no Exemplo intitulado "Modelo de dano de artéria femoral induzido por eletrolítico de Beagle".

Estudo de eficiência de M118-REH em modelos pré-clínicos

Dano de artéria carótida induzido por cloreto férrico

Estudos de comparação de M118-REH e enoxaparina produziram inibição dependente da dose de trombose oclusiva. M118-REH em uma dose de 0,5 mg/kg prolongou significativamente ($p < 0,05$) o tempo para oclusão (TTO) comparado a salina ($28,5 \pm 7,1$ minutos versus $11,1 \pm 0,9$ minutos, respectivamente). Vinte e cinco por cento (2/8) da artéria carótida com dano injetada com 0,5mg/kg de M118-REH permaneceu evidente pelo período de observação total de 60 minutos. Em contraste, todas as artérias carótidas com dano (9/9) ocluíram em ratos injetados com salina dentro de um período de observação de 60 minutos. A administração de 1 mg/kg de M118-REH aumentou adicionalmente TTO ($55,3 \pm 3,6$ minutos) com 83% (10/12) dos vasos evidentes no final do período de observação de 60 minutos. Ratos administrados com 2, 3 ou 4 mg/kg de enoxaparina todos tinham TTO significativamente mais longos do que animais injetados com salina ($19,1 \pm 1,4$, $36,0 \pm 5,6$ e $40,2 \pm 6,3$ minutos, respectivamente). Todas (7/7) das artérias carótidas ocluíram dentro de período de tempo de 60 minutos na dose de 2 mg/kg, enquanto 62% (7/13) e 55% (6/11) de vasos ocluíram em ratos administrados com 3 e 4 mg/kg de enoxaparina, respectivamente. M118-REH (1 mg/kg) produziu o grau maior de proteção de trombose, apesar de atividade anti-Xa inferior do que aquela nas doses de 3 e 4 mg/kg de enoxaparina. Os resultados são representados na figura 10 e Tabela 15.

Tabela 15. Análise Estatística dos Dados de Eficiência (t-teste de Student)

	Controle	M118-REH 0,5 mg/kg	M118-REH 1 mg/kg	Enoxaparina sódio 2 mg/kg	Enoxaparina sódio 3 mg/kg	Enoxaparina sódio 4 mg/kg
Média (mín)	11,3	29,2**	55,3 Nº **	23,2**	36,0**	41,8**
Desvio Padrão	2,3	16,8	12,6	8,3	20,3	20,6

* $p < 0,05$ comparado ao grupo de controle; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo de

controle; $N^{\circ} p < 0,01$ comparado a enoxaparina sódio 3 mg/kg.

Modelo de dano de artéria femoral induzido por eletrolítico de Beagle

Os efeitos antitrombóticos e anticoagulantes de M118-REH foram estudados em um modelo canino de trombose arterial profunda induzida por dano eletrolítico severo.

Procedimentos Cirúrgicos

Animais foram pré-medicados com sulfato de atropina intramuscular (IM) (0,02 mg/kg) e acepromazina 1M (0,2mg/kg, $\leq$ mg/kg por animal) pelo menos 10-15 minutos antes da indução de anestesia com IV propofol (4-8 mg/kg). Os animais foram entubados e mantidos em anestesia via isoflurano inalante, para efeito, através de um respirador de volume regulado.

Uma incisão longitudinal foi feita na superfície médio-ventral do pescoço para ganhar acesso aos tecidos que sobrepõem as artérias carótidas. Uma artéria carótida e ambas veias jugulares (uma para realimentação) foram subsequentemente expostas por aproximadamente 2 cm por dissecação moderada e suportadas por retenção de ligaduras nas extremidades proximal e distal. Duas outras incisões foram feitas que se iniciaram no abdome e prolongadas distalmente ao longo do pectineus por uma distância que cobre 66%-75% de cada fêmur. A fáscia foi aberta em cada incisão, e a artéria femoral subjacente foi exposta por uma distância de aproximadamente 2-3 cm.

Instrumentação de Animal

Vinte e quatro cães beagle foram instrumentados com eletrodos intravasculares através das paredes de artéria femoral esquerda e direita, e posicionados em contato direto com a membrana interna do vaso sanguíneo. Cada eletrodo foi conectado a uma fonte de energia de amperagem constante, com o catodo colocado em um local subcutâneo distante. Um dispositivo estenótico foi posicionado imediatamente distal ao eletrodo, uma sonda de fluxo Doppler pervascular foi posicionada proximal ao eletrodo, e um cateter foi inserido na artéria carótida, todos dos quais foram conectados a uma Plataforma Fisiológica Gould Ponemah (Linton Instrumentation, Norfolk, UK) para monitoramento contínuo de pressão sanguínea arterial, fluxo sanguí-

neo, e taxa do coração. Um segundo cateter foi inserido na veia jugular para coleta de amostra de sangue. Finalmente, uma linha intravenosa foi inserida em uma veia periférica para infusões de tratamento de estudo, e fios condutores foram colocados para eletrocardiografia (medida em Fio Condutor II).

5 *Modelo de Dano Eletrolítico de Artéria Femoral*

Após instrumentação, cada animal recebeu uma infusão IV contínua de veículo (0,9% de salina estéril) por 90 minutos. Quinze minutos após a infusão iniciada, corrente elétrica (300 μ A) foi aplicada à artéria femoral direita (controle) através do eletrodo intravascular, e administrada continuamente até formação de trombose total, definida como uma redução no fluxo Doppler para $\leq 2\%$ de valores de linha de base, ou até o final do período de observação em 180 minutos após iniciação de dano eletrolítico se o vaso permaneceu evidente. Em seguida a isto, o vaso foi ligado proximalmente e distalmente ao local de dano eletrolítico, o segmento foi colhido, e qualquer trombo, se presente, foi pesado.

Neste modelo, trombos intravasculares ricos em plaquetas se formam em proximidade a uma estenose arterial distal. Consequentemente, o dispositivo estenótico foi ajustado para limitar hiperemia reativa induzida por hipoxia para $\leq 80\%$ da resposta de linha de base a oclusão física (hiperemia reativa de linha de base foi determinada em cada artéria femoral imediatamente antes ao veículo, ou infusões de tratamento ativo). Para assegurar que propriedades hemodinâmicas no local de fluxo de sangue normal aproximado de dano através da veia femoral, pressão arterial média e taxa de coração foram alcançadas a aproximadamente 70 mm de Hg e 100 batidas por minuto, respectivamente, via controle anestésico de isofurano.

Após completar o experimento precedente para avaliar os parâmetros trombóticos de linha de base em cada animal na artéria femoral direita, procedimentos idênticos foram efetuados na artéria femoral esquerda (ativa-tratada) na presença de infusões de M118-REH ou UFH. Os animais foram colocados em 4 grupos de tratamento ($n = 6$). Três grupos receberam bolos IV de M118-REH a 37,5, 75 e 150 anti-Xa IU/kg, respectivamente, seguido por infusões contínuas de M118-REH a 1,0 anti-Xa IU/kg/minuto por

90 minutos. O quarto grupo recebeu uma massa IV de UFH a 75 U/kg, seguido por uma infusão contínua de UFHa 1,0 U/kg/minuto por 90 minutos. Dano eletrolítico contínuo foi iniciado 15 minutos após tratamento de massa, e análises subsequentes foram efetuadas identicamente ao grupo de veículo.

Ensaio para tempo de hemorragia cutânea (CBT) e coleta de sangue foram efetuados em pontos de tempo especificados de protocolo (vide abaixo). Parâmetros fisiológicos monitorados através de todo o procedimento incluíam taxa de pulso, taxa de respiração, pressão sanguínea direta, temperatura retal, volume tidal, níveis de dióxido de carbono terminal-tidal, e saturação de O₂.

Determinações de Hematologia e Coagulação

Para determinação de hematologia e coagulação, amostras de sangue totais (aproximadamente 100 µL) foram coletadas a 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 e 180 minutos para determinação de ACT. ACT foi avaliado em um Sistema de Assinatura + Microcoagulação HEMO-CHRON® Jr. (ITC, Edison, NJ, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Duas alíquotas (aproximadamente 1,3 mL cada) de sangue total foram coletadas a 15 minutos, 60 minutos, e ou 180 minutos, ou o tempo de oclusão, se aplicável, para ensaios de hematologia e coagulação adicional. Parâmetros hematológicos (WBC, RBC, HGB, CHT, MCV, MCH, MCHC, PLT, RTC, ARTC e WBC diferenciais) foram ensaiados usando-se um Sistema de Hematologia Advia 120 (Bayer Diagnostics Norden, Lyngby, Dinamarca) seguindo as instruções do fabricante. Ensaios de coagulação (tempo de protrombina [PT], tempo de tromboplastina parcial ativada [aPTT], e níveis de fibrinogênio [FBI] foram conduzidos usando-se um Analisador de Coagulação MLA Electra 1400C (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) seguindo instruções do fabricante.

Para determinar níveis de antifator Xa e antifator IIa, amostras de sangue citratadas totais coletadas a 0,15 e 60 minutos após iniciação de tratamento foram centrifugadas a 3,000 g por aproximadamente 10 minutos em centrífuga refrigerada. Plasma foi coletado, congelado a -20°C, e arma-

zenado a -80°C até que pronto para teste por ensaio cromogênico. Kit de Heparina Anti-Xa Stachrome (Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, França), e um conjunto de reagente consistindo em substrato S2238, trombina bovina, e antitrombina III humana (Chromogenix, Milano, Itália) foram usados para ensaios de antifator Xa e antifator IIa. Todos os ensaios cromogênicos foram quantificados em um analisador STA-R (Diagnostic Stago) seguindo Momenta Pharmaceuticals, Inc., SOP para medições de atividade de antifator Xa e antifator IIa. CBT foi determinado a 15 minutos, 60 minutos, e ou 180 minutos, ou a oclusão de tempo, se aplicável. Avaliações de CBT foram efetuadas em um membro anterior pelo Método de Mielke usando-se SOP de facilidade de teste.

Estatísticas

Os valores foram reportados como desvio padrão $\pm$ médio (SD) a menos que, de outro modo, notado. Meios foram comparados usando-se o teste-t Student assumindo-se variância igual em grupos de tratamento diferentes. A incidência de oclusão foi comparada entre grupos de tratamento pelo cálculo da razão ímpar relativa ao controle, e usando-se um teste z para acionar o valor P. Níveis significantes para todos os testes foram ajustados em 0,05.

20 Atividade de Plasma de Antifator Xa e Antifator IIa

Várias doses de M118-REH foram comparadas a uma dose padrão de UFH (75 U/kg). M118-REH exibiu inibição dependente da dose de ambos Fator Xa e IIa, com a dose mais alta de M18-REH (150 IU/kg) demonstrando atividade similar de antifator Xa relativa a UFH (figura 13 e Tabela 16). A atividade de antifator IIa aumentou proporcionalmente com a atividade de antifator Xa para ambos M118-REH e UFH, embora o coeficiente de correlação fosse maior para M118-REH ($r^2 = 0,890$) do que UFH ($r^2 = 0,465$) (figura 14). Finalmente, a razão de atividade de antifator Xa para atividade de plasma de antifator IIa com o tempo foi geralmente mais constante com M118-REH do que UFH, consistente com o metabolismo variável conhecido das moléculas de UFH grandes e polidispersas (figura 15).

Tabela 16. Sumário de Pontos Finais Hematológicos Selecionados

Tratamento	ACT (segundo)*	Antifator Xa (IU±SD)	Antifator IIa (IU±SD)
Controle	69±6	0,0±0,0	0,0±0,0
M118-REH (37,5 IU/kg)†	101±7‡	1,20±0,16	0,64±0,12
M118-REH (75 IU/kg)†	108±13‡	1,66±0,37	0,71±0,20
M118-REH (150 IU/kg)†	141±28§	2,31±0,13	1,06±0,09
UFH (75 IU/kg)†	163±55	2,89±1,31	0,95±0,19

ACT, tempo de coagulação ativada; IU, unidade internacional; SD, desvio padrão; UFH, heparina não-fracionada

*Registrado a 60 minutos após iniciação de infusão de artigo de teste; †Dose de massa; ‡P<0,05, M118-REH vs. UFH, §P<0,01, M118-REH vs. controle; ||P<0,01, UHF vs. controle.

Ensaio de Coagulação

Em seguida, a atividade anticoagulante de M118-REH foi comparada a uma dose padrão de UFH. A inibição dependente da dose de M118-REH de coagulação foi observada dentro de 15 minutos em todos os ensaios de coagulação, e foi mantida durante o curso do período de observação de 60 minutos (figura 16). Em 60 minutos, tempos de coagulação significativamente mais longos no ensaio de ACT foram observados após tratamento de UFH do que M118-REH em 37,5 ou 75IU/kg de anti-Xa (Tabela 16). A diferença entre UFH e M118-REH no ensaio de CT foi não-significante quando M118-REH foi administrado em 150 IU/kg de anti-Xa (Tabela 16). Experimentos de controle demonstraram que diferenças entre grupos de tratamento nos ensaios de coagulação não eram atribuíveis a alterações nas concentrações do substrato de fibrinogênio (dados não mostrados).

Efeitos Antibióticos

Baseado na observação que M118-REH em uma dose de 150 IU/kg de anti-Xa tinha propriedades anticoagulantes similares a heparina a uma dose padrão de 75 U/kg, a eficiência antrritrômica de M118-REH de M118-REH a 150 IU/kg de anti-Xa, bem como em doses inferiores, foi comparada a UFH no modelo canino de trombose arterial profunda. Durante in-

5 fusão de veículo, oclusão total da artéria de controle ocorreu em 24/24 [100%] de animais dentro do período de observação de 180 minutos (figura 17). No grupo de tratamento de UFH, 5/6 (83,3%) de animais alcançaram a diminuição de modelo definido em fluxo Doppler. Por comparação, oclusões
10 totais ocorreram em 3/6 (50%), 2/6 (33,3%) e 1/6 (16,7%) de animais recebendo doses de bolo de M118-REH de 37,5, 75 e 150 anti-Xa IU/kg, respectivamente, consistentes com um relacionamento de resposta de dose. As diferenças de tratamento entre artérias tratadas com M118-REH e com veículo para taxas de oclusão foram estatisticamente significantes em todas as
15 doses de bolo de M118-REH ($P < 0,05$). A diferença entre M118-REH em uma dose de bolo de 150 anti-Xa IU/kg e UFH foi significativa ($P < 0,05$). Desse modo, M118-REH em 150 anti-Xa IU/kg mostrou eficiência superior para UFH a 75U/kg, apesar do fato que as atividades anticoagulante de M118-REH e UFH foram comparáveis nestas doses. M118-REH nas doses testadas mais baixas (37,5 e 75 IU/kg de anti-Xa), que foram associadas com
20 atividades anticoagulantes inferiores, tinham efeitos antitrombóticos que foram mais geralmente similares a UFH.

Tempos médios para oclusão foram 59 ± 25 , 132 ± 42 , 165 ± 23 , 161 ± 41 , e 165 ± 36 minutos em animais tratados com veículo, UFH, M118-
25 REH (37,5 IU/kg de anti-Xa), M118-REH (75 IU/kg de anti-Xa), e M118-REH (150 IU/kg de anti-Xa), respectivamente. Deve ser notado que tempos de oclusão médios nas artérias tratadas ativas foram sub-estimados de seus valores verdadeiros, visto que muitas artérias, particularmente nos grupos de tratamento de M118-REH, não ocluem totalmente pelo ponto final pré-especificado de 180 minutos (tais artérias foram arbitrariamente marcadas a um tempo de oclusão de 180 minutos para a análise). Os pesos médios de
30 trombo foram $24,0 \pm 9,15$ mg nas artérias tratadas com veículo, $19,4 \pm 9,47$ mg nas artérias tratadas com UFH, e $24,5 \pm 12,17$ mg, $19,8 \pm 6,24$ mg, e $12,8 \pm 5,99$ mg nos artigos tratados com M118-REH a 37,5, 75 e 150 IU/kg de anti-Xa, respectivamente. As diferenças entre grupos tratados para tempo médio para oclusão e peso médio de trombo não alcançaram significância estatística.

Tempos de Hemorragia Cutânea

CBT variou de $15,5 \pm 15,5$ a $160 \pm 52,5$ segundos durante administração de veículo nos pontos de tempo de protocolo especificados em todos os grupos (Tabela 17). O tratamento de UFH e M118-REH resultou em aumentos mínimos no CBT, e os efeitos foram altamente variáveis. A média de grupo variou de $135 \pm 90,5$ a $275 \pm 306,8$ segundos após tratamento de UFH, e $110 \pm 36,3$ a $190 \pm 86,3$ segundos após administração de M118-REH em todos os pontos de tempo.

Tabela 17. Tempos de Hemorragia Cutânea

Tratamento	CBT de Linha Base (vide $\pm$ SD)	Artéria Femoral	CBT (vide $\pm$ SD)		
			15 minutos	60 minutos	180 minutos
UFH (75 U/kg)	$100 \pm 31,0$	Controle	$125 \pm 29,5$	$138 \pm 45,5$	$100 \pm 36,5$
		Tratado	$135 \pm 90,5$	$145 \pm 35,1$	$275 \pm 306,8$
M118-REH (37,5 IU/kg)	$95 \pm 35,1$	Controle	$80 \pm 15,5$	$130 \pm 36,5$	$115 \pm 58,2$
		Tratado	$145 \pm 64,1$	$125 \pm 48,1$	$110 \pm 36,3$
M118-REH (75 IU/kg)	$140 \pm 24,5$	Controle	$130 \pm 36,5$	$130 \pm 17,5$	$160 \pm 52,5$
		Tratado	$160 \pm 45,2$	$190 \pm 86,3$	$160 \pm 31,0$
M118-REH (150 IU/kg)	$110 \pm 41,0$	Controle	$115 \pm 51,7$	$110 \pm 36,3$	$115 \pm 48,1$
		Tratado	$150 \pm 50,2$	$125 \pm 64,1$	$135 \pm 94,4$

UFH, heparina não-fracionada, SD, desvio padrão, IU, unidades internacionais, U, unidades.

Parâmetros Hemodinâmicos

Nenhuma mudança clinicamente significativa foi observada em parâmetros cardiovasculares ou químicos clínicos durante o curso dos experimentos. Através da população de estudos, diferenças entre respostas hiperêmicas pós-estenótica nas artérias tratadas com veículo ou ativas foram ≤ 13 mL/minuto em todos os animais. O objetivo de limitar resposta hiperêmica induzida por hipoxia a $\leq 80\%$ da resposta bovina a oclusão física foi encontrada em todas, mas 2 artérias: 1 na qual a resposta foi 81% (M118-REH [75 IU/kg de anti-Xa]; artéria de controle); e 1 na qual a resposta foi 88% (M118-

REH [75 IU/kg de anti-Xa]; artéria de tratamento ativo). A pressão arterial média e taxa de coração durante o curso do procedimento em todos os grupos de tratamento foram 68-78 mm de Hg e 96-111 bpm, respectivamente, perto de 70mm de Hg e 100 bpm de alvos especificados no protocolo. A diferença máxima nas pressões arteriais médias entre artérias tratadas com veí-
 5 culos e ativas em qualquer dado animal foi 6 mm de Hg por minuto, respectivamente (valores *P* para diferenças foram não-significantes).

Sumário

M118-REH em 150 IU/kg de anti-Xa mostrou estatisticamente
 10 eficiência antitrombótica superior a uma dose padrão de UFH (75 U/kg), apesar do fato que M118-REH e UFH mostraram atividade comparável em ensaios de ACT, aPTT e PT nestas concentrações. Desse modo, a incidência de oclusão induzida por trombose total da artéria femoral foi significan-
 15 temente mais baixa no M118-REH tratado do que animais tratados com UFH (1/6 [16,7%] versus 5/6 [83,3%], respectivamente; $P < 0,05$).

Os efeitos antitrombóticos observados nos grupos de tratamento de M118-REH foram alcançados sem evidência de complicações. Nenhum exemplo de hemorragia espontânea foi documentado, e somente aumento mínimo no CBT foi observado em todas as concentrações de M118-REH e
 20 pontos de tempo experimentais. Adicionalmente, não existem mortalidades inesperadas ou mudanças clinicamente significativas nos parâmetros cardiovasculares e químicos clínicos.

Duas características dos dados de coagulação foram notáveis. Primeiro, M118-REH foi mensurável em um modo dependente da dose por ensaios de ACT de ponto de cuidado. Sua resposta de ACT estava bem cor-
 25 relacionada a atividade de antifator Xa comparada com UHF. Esta característica pode simplificar a administração de LMWHs em ajustes intervencionais e cirúrgicas. Segundo, M118-REH exibiu não somente atividade de antifator Xa, mas também atividade de antifator IIa significativa, uma característi-
 30 ca que distingue adicionalmente M118-REH de opções atualmente disponíveis (J. Hirsh *et al*, "Heparina e heparina de baixo peso molecular: mecanismos de ação, farmacocinéticas, dosagem, monitoramento, e segurança",

- Chest. 2000; 119:64S-94S). Enoxaparina, por exemplo, é caracterizada por uma razão de atividade de antifator Xa para atividade de IIa de 17,2; por comparação, a razão análoga para UFH é 3,3(U. Cornelli and J. Fareed. "Farmacocinéticas humanas de heparinas de baixo peso molecular", Semin Thromb Hemost. 1999; 25 Suppl 3:57-61). Neste estudo, M118-REH tinha uma razão de antifator Xa para atividade de IIa que foi aproximadamente 2-2,5 (figura 15), demonstrando atividade de antifator Xa aumentada relativa a outras LMWHs. A razão foi geralmente mais consistente sobre o tempo do que UFH, conforme prognosticado pelo metabolismo variável conhecido das moléculas de UFH grandes e polidispersas.

Tabela 18: Tabela de Sumário de Pontos Finais Trombóticos e Hematológicos Selecionados

Tratamento	Oclusão(%)	Peso de Trombo (mg)	TTO (min) ^a	ACT (seg) ^b	Antifator Xa ^b	Antifator IIa ^b
Controle (RFA)	24/24 (100%)	24,0±9,2	59±25	69±6 ^c	0,00±0,00	0,00±0,00
UFH (Grp 1)	5/6(83%)	19,4±9,5	132±42 ^e	163±55 ^e	2,89±1,31	0,95±0,19
M118 (Grp 4)	3/6(50%) ^c	24,5±12,2	165±23 ^e	101±7 ^d	1,20±0,16	0,64±0,12
M118 (Grp 2)	2/6(33%) ^c	19,8±6,2	161±41 ^e	108±13 ^d	1,66±0,37	0,71±0,20
M118 (Grupo 3)	1/6(17%) ^{cd}	12,8±6,0 ^e	165±36 ^e	131±16	2,31±0,13	1,06±0,09

TTO = Tempo para oclusão; ACT = Tempo de coagulação ativada; RFA = Artéria femoral direita;

- 15 UFH = heparina não-fracionada; Grp = Grupo.

^a TTO > 180 minutos foi ajustado em 180 minutos.

^b Valor registrado a 60 minutos após iniciação de infusão de artigo de teste.

^c $P < 0,05$ vs. controle.

^d $P < 0,05$ vs. UFH.

- 20 ^e $P < 0,01$ vs. controle.

Neutralização in vivo

- Estudos in vivo foram realizados empregando-se ratos Sprague-Dawley e coelhos da Nova Zelândia. M118-REH, enoxaparina ou duas heparinas não-fracionadas (UFH) foram administradas intravenosamente em doses diferentes em $t = 0$. A neutralização dos efeitos farmacológicos de cada

um destes tratamentos foi avaliada por injeção de veia terminal de sulfato de protamina 5 minutos após t0 em razões de 0,5 a 1 mg para 100 IU de anti-Xa (ou 100 Unidades USP, ou 1 mg no caso de UHF). Amostras de sangue foram obtidas e testadas para atividade de anti-Xa e anti-IIa na linha de base (imediatamente antes da injeção de protamina) 5, 30 e 60 minutos pós-administração de sulfato de protamina.

Neutralização completa e rápida de atividade anti-Xa de M118-REH por sulfato de protamina in vivo foi alcançada em razões de 0,5 mg: 100 IU de anti-Xa (>98%) em ratos, e 1 mg:100 IU de anti-Xa (mais do que 99% em ratos e 95% em coelhos) em 5 minutos pós-distribuição de sulfato de protamina intravenoso. Não existem "religação" de atividade anti-Xa observada dentro de 1 hora pós-administração de sulfato de protamina.

Neutralização de atividade anti-Xa foi comparável entre M118-REH e UFH em razões de 0,5 mg e 1 mg para 100 UI de anti-Xa (ou 100 USP ou 1 mg de UFH). Mais do que 40% e 20% da atividade anti-Xa permaneceu 5 minutos após injeção de sulfato de protamina em ratos dosados com enoxaparina em razões de 0,5 e 1 mg:100 IU de anti-Xa, respectivamente. Aproximadamente 38% da atividade de anti-Xa permaneceu em coelhos administrados com enoxaparina em 1 mg: 100 IU de anti-Xa de sulfato de protamina. Mais do que 90% da atividade de anti-IIa seguindo cada uma das heparinas foi neutralizada em razões de 0,5 e 1 mg a 100 IU de anti-Xa. A grandeza de reversão de atividade anti-IIa por sulfato de protamina foi equivalente entre os três tratamentos, isto é, M118-REH, enoxaparina ou UFH. Os resultados são representados na Figura 11.

Em macacos Cinomólogos, sulfato de protamina (PS) inverteu ambos atividade anti-Xa e atividade anti-IIa de M118-REH em uma extensão similar em um modo dependente de dose. M118-REH foi administrado intravenosamente em macacos cinomólogos conscientes, em alguns casos seguido por administração de PS. Amostras de sangue foram obtidas e avaliadas para concentração de M118-REH conforme medida por atividade anti-Xa e atividade anti-IIa, e perfil de coagulação. Hematologia, tempos de hemorragia cutânea e sinais de toxicidade clínica foram monitorados por 24 horas.

Atividade de M118-REH foi detectável imediatamente seguindo iv administração a uma dose de 150 IU/kg de anti-Xa. Cinética de eliminação de primeira ordem para M118-REH foi observada com $t_{1/2}$ de $0,50 \pm 0,04$ hora (anti-Xa) e $0,68 \pm 0,05$ hora (anti-IIa). Além disso, PS rapidamente reverteu atividade de anti-Xa e atividade de anti-IIa de M118-REH em maneira dependente da dose. A maioria de atividade de anti-Xa ($93,6 \pm 1,2\%$) e atividade de anti-IIa ($90,14 \pm 1,2\%$) foi rapidamente por Ps em uma razão de 1,5 mg de PS por 100 IU de atividade anti-Xa, a dose mais alta estudada. Medições de ACT e aPTT proximamente se relacionaram com a atividade de anti-Xa ($r^2=0,95$ e $0,99$, respectivamente). M118-REH aumentou ACT 2-3 vezes, e foi invertido para valores de linha de base dentro de 5 minutos seguindo administração intravenosa de PS. Nenhum sinal de toxicidade clínica ou hemorragia adversa foi observado.

A administração de M118-REH causa um efeito anticoagulante consistente e rápido que pode ser rapidamente invertido por injeção de PS. Anticoagulação de M118-REH é facilmente medida e monitorada por ACT e aPTT. A reversibilidade e monitorabilidade de M118-REH são únicas comparadas com outras LMWHs comercialmente disponíveis.

Os resultados de estudos de neutralização de M118-REH e modelo de NHP são apresentados nas Tabelas 19-21 abaixo.

Tabela 19. Neutralização de M118-REH no Modelo NHP-Muitos aPTT e ACT Voltam ao Normal Após Dosagem.

		UFH [^]	M118-REH [^]	M118-REH [^]	M118-REH [^]
		1 mg:100IU	1 mg:100	1,5 mg:100	2 mg:100
			Anti-Xa IU	Anti-Xa IU	Anti-Xa IU
	Linha de Base	99,5 $\pm$ 9,2	85,3 $\pm$ 4,2	93,0 $\pm$ 5,1	97,0 $\pm$ 4,2
ACT	Pós-M118-REH	168,5 $\pm$ 14,9	174,3 $\pm$ 12,3	193,0 $\pm$ 9,7	139,0 $\pm$ 21,2
	5' Pós-	97,5 $\pm$ 14,9	103,0 $\pm$ 4,4	99,2 $\pm$ 7,5	89,5 $\pm$ 0,7

	Protamina		(NS)	(NS)	(NS)
	Linha de Base	31,95±0,1	23,4±2,7	20,4±0,9	26,1±0,8
aPTT	Pós-M118-REH	46,9±31,9†	177,9±59,0*	162,6±85,5*	48,1±1,8
	5' Pós-Protamina	24,2±0,4	32,5±4,4	29,6±6,0 (NS)	25,9±1,6 (NS)

NS: nenhuma diferença significativa comparada a UFH

*aPTT>212 seg em algumas amostras; †1/2 mais baixo do a linha de base após dosagem de UFH

^M118-REH dosado a 150 IU/kgi.v. ^M118-REH dosado a 75 IU/kg, UFH dosado a 75 IU/kg

Tabela 20. Neutralização de M118-REH no Modelo NHP-Atividades de Anti-Xa-IIa Significantes Permaneceram

		UFH 1 mg:100IU	M118-REH 1 mg:100 Anti-Xa IU	M118-REH 1,5 mg:100 Anti-Xa IU	M118-REH 2 mg:100 Anti-Xa IU
	Linha de Base	0,3±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0	n/a
Anti-Xa	Pós-M118-REH	2,0±0,3	3,6±0,4	6,1±0,8	1,2±0,1
	5' Pós-Protamina	0,1±0,1	0,5±0,0	0,4±0,1	0,2±0,1
	Linha de Base	0,4±0,4	0,0±0,1	0,0±0,0	n/a
Anti0-IIa	Pós-M118-REH	1,9±0,4	2,1±0,3	3,0±1,2	1,6±0,0
	5' Pós-Protamina	0,1±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	0,4±0,2

Tabela 21. Neutralização de M118-REH no Modelo NHP-Percentagem de Redução para Parâmetros Diferentes Após Protamina

	UFH [^] 1 mg:100IU	M118 [^] REH [^] 1 mg:100 Anti-Xa IU	M118 [^] REH [^] 1,5 mg:100 Anti-Xa IU	M118 [^] REH [^] 2 mg:100 Anti-Xa IU
ACT	41,5±14,0	40,8±2,2	47,7±1,2	34,9±9,4
aPTT	32,4±46,9	80,6±5,4	74,8±16,2	46,0±16,9
AntiXa	97,3±3,8	85,2±2,0	93,6±1,2	84,0±9,1*
Anti-IIa	97,2±3,9	83,4±4,2	90,1±1,2	75,1±10,1*

†equação: (pós-M118-REH – pós-protamina)*100/pós-M118-REH

*ensaio instável

5 Estudo de monitoramento de leito lateral in vivo em modelos pré-clínicos:

M118-REH, enoxaparina e heparina não-fracionada foram administrados intravenosamente em doses diferentes em ratos e coelhos. Amostras de sangue foram obtidas para medição de ACT e teste de anti-Xa. Hemachron Junior e ACT mais cubeta foram usados para medição de anti-Xa, enquanto anti-Xa foi medido com Coag-A-Mate MTX II. A correlação entre anti-Xa e ACT foi comparada entre estas três heparinas. Em coelhos Brancos da Nova Zelândia, 1 mg/kg de M118-REH e UFH foram injetados, via veia marginal da orelha. Amostras de sangue foram coletadas a 5', 15', 30', 1, 2, 3, 4 horas após distribuição de heparina. Em ratos Sprague-Dawley, M118-REH e UFH foram dosados a 0,5 a 1 mg/kg, enquanto enoxaparina dosada a 1 mg/kg e 2 mg/kg. Estas doses alcançaram elevação significativa de anti-Xa e ACT ambos em ratos e coelhos. Para M118-REH, o fator de correlação (r^2) de anti-Xa para ACT foi 0,79 em coelhos e 0,85 em ratos. Os fatores de correlação (r^2) entre anti-Xa e ACT foram 0,31 em coelhos e 0,79 em ratos, enquanto para enoxaparina, foi somente 0,66 em ratos. Os resultados são mostrados na Figura 12.

Em modelos de NPH, após injeção intravenosa, M118-REH apresentou primeira ordem de eliminação com meia vida como $0,50 \pm 0,04$ ou $0,68 \pm 0,05$ hora por medição de anti-Xa e anti-IIa, respectivamente. Volumes de distribuição (Vd) são $32,01 \pm 2,21$ (anti-Xa) ou $48,58 \pm 0,95$ mL/kg

(anti-IIa), respectivamente. As folgas (CI) são $37,24 \pm 4,65$ (anti-Xa) e $43,92 \pm 5,38$ (anti-IIa) mL/kg. Os resultados de ACT e aPTT estão proximamente relacionados a atividade de anti-Xa (razão de correlação $r = 0,95$ e $0,99$, respectivamente).

5 Teste de hemorragia in vivo:

Heparina de baixo peso molecular é gerada por despolimerização de heparina não-fracionada com processos químicos e enzimáticos diferentes. As medições de tempo de hemorragia foram frequentemente empregadas no desenvolvimento de novos antitrombóticos como uma indicação para risco de hemorragia. Este objetivo deste estudo foi investigar o risco de hemorragia por medição de tempo de hemorragia padrão para M118-REH, e comparar o risco a que atribui por tratamentos comparáveis, tais como enoxaparina e heparina não-fracionada.

M118-REH, enoxaparina e heparina não-fracionada foram administrados intravenosamente como uma dose de massa simples de 0,5 mg/kg, via veia de orelha marginal em coelhos. Medições de tempo de hemorragia (BT) foram feitas na orelha na linha de base e 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após administração de artigo de teste. M118-REH causou um aumento de 3-4 vezes no BT em 5 minutos a 60 minutos de pós-administração ($p < 0,05$). Uma resposta similar em BT foi observada por tratamento com enoxaparina e UFH. Os tempos de hemorragia retornaram para dentro da faixa normal por 120 minutos, e permaneceram perto dos valores de linha de base para os pontos de tempo remanescentes. Nenhuma outra descoberta clínica adversa foi observada em qualquer dos grupos de tratamento na dose testada.

Conforme mostrado na Tabela 22, nos modelos de NHP, M118-REH causou prolongamento de tempo de hemorragia de Curtis (CBT) após injeção intravenosa, não existe diferença estatisticamente significativa da linha de base ($p < 0,05$).

Tabela 22: CBT de M118-REH após injeção intravenosa a 150 anti-Xa IU/kg no modelo NHP.

Ponto de tempo (hora)	0	0,25	1	1,5
Tempo de hemorragia (minutos)	1,3±0,6	2,5±0,7 NS	2,5±1,0 NS	2,5±1,3 NS

Em beagles, UFH produziu CBT mais longos do que M118-REH após injeção de massa e infusão contínua.

5 Sistema de coagulação in vivo:

Interação de Plaqueta

Em modelos de NHP, não existe observação na influência na agregação de plaqueta disparada por ADP após administração intravenosa de massa de M118-REH.

10 *Intervenção de trajetória fibronolítica:*

Em modelos de NHP, conforme mostrado na Tabela 18 abaixo, após injeção de massa intravenosa de M118-REH, o nível de fibrinogênio foi consistente, e não existe diferença significativa estatística da linha de base.

Tabela 23. Tempo de Fibrinogen e Protrombina (PT) após injeção intravenosa de M118-REH a 150 anti-Xa IU/kg no modelo NHP.

15

	Fibrinogen	Tempo de Protrombina (segundo)
Linha de base	174,3±35,0	11,4±0,5
5'	168,3±28,0	16,0±0,9**
30'	166,0±30,5	13,8±0,9*
60'	172,0±29,7	14,1±1,1*
90'	170,0±27,9	12,8±2,2
360'	163,7±29,5	11,4±0,9
360'	164,3±27,0	10,8±0,3
1440'	176,0±2,0	10,7±0,3

Estudos de Dose Ascendente Múltipla

Em estudos IV de dose repetida no rato, aumento na exposição

a M118 pareceu ser proporcional ao aumento na dosagem no estudo nos Dias 0 e 13. Em ratos machos, exposição a M118 em termos de atividade de anti-Xa total aumentou do Dia 0 para o Dia 13, mas permaneceu similar em termos de atividade de anti-Xa total. Em ratos fêmeas, exposição a M118 aumentou do Dia 0 para o Dia 13. As fêmeas pareceram ter exposição mais alta a M118 do que ratos machos no Dia 0, mas no Dia 13 exposições a M118 foram similares entre gêneros. Em estudos IV de dose repetida no cão, exposição sistêmica como dosagem aumentou acima de 5 a 50 mg/kg/faixa de dia. Contudo, exposição a M118 geralmente não aumentou proporcionalmente com aumento de M118. Não existe evidência de acúmulo acima do período de 14 dias. Meias vidas para atividade de anti-Xa e anti-IIa em plasma de cão variou de 1,0 a 3,2 horas com nenhuma tendência particular relacionada a dosagem ou gênero. As meias vidas tendem a serem mais curtas no Dia 13 do que no Dia 0. Não existe tendência consistente relacionada a dosagem de M118 com relação a folga sistêmica aparente, ou ao volume aparente de distribuição de atividades de anti-Xa e anti-IIa.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de LMWH tendo
um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da,
e
5 tendo uma atividade de anti-IIa de cerca de 70 a 280.
2. Composição de LMWH, de acordo com a reivindicação 1, tendo uma atividade de anti-IIa de cerca de 100 a 250 IU/mg.
3. Composição de LMWH tendo
um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da,
10 e
tendo uma atividade de anti-IIa que é pelo menos 70% neutralizável com protamina conforme medida por ACT ou aPTT.
4. Composição de LMWH, de acordo com a reivindicação 3, no qual a atividade de anti-IIa é neutralizada por pelo menos 70% dentro de
15 cerca de 30 minutos após administração de protamina.
5. Composição de LMWH tendo um
um peso molecular médio de peso de cerca de 5000 a 9000 Da,
e
20 tendo $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ a 5 a 15% da composição.
6. Composição de LMWH tendo um
comprimento de cadeia médio de cerca de 9 a 16 dissacarídeos,
e
tendo $\Delta UH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$ a 5 a 15% da composição.
7. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3 e 5, no qual o peso molecular médio de peso é cerca de
25 5500 a 8500 Da.
8. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5 e 6, compreendendo adicionalmente uma atividade de anti-Xa de cerca de 100 a 400 IU/mg.
9. Composição de LMWH, de acordo com a reivindicação 8, tendo uma atividade de anti-Xa de cerca de 150 a 300 IU/mg.
30
10. Composição de LMWH, de acordo com a reivindicação 8, no

qual a atividade de anti-Xa é pelo menos 70% neutralizável conforme medida por ACT ou aPTT.

11. Composição de LMWH, de acordo com a reivindicação 10, no qual a atividade de anti-Xa é neutralizada por pelo menos 70% dentro de 30 minutos após administração de protamina.

12. Composição de LMWH, de acordo com a reivindicação 11, no qual a atividade de anti-Xa pode ser neutralizada por pelo menos 70% dentro de 30 minutos após administração de protamina a uma dose de cerca de 1 a 2 mg da composição de LMWH por 100 anti-Xa IU de plasma.

13. Composição de LMWH tendo um peso molecular médio de peso de 5000 a 9000, e compreendendo uma razão de anti-Xa para anti-IIa de 2:1, ou menos.

14. Composição de LMWA, de acordo com a reivindicação 13, no qual o peso molecular médio de peso é cerca de 5500 a 8500 Da.

15. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 e 12, na qual a atividade da composição pode ser monitorada por α PTT e ACT.

16. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 e 12, no qual a composição compreende uma mistura de estruturas de Δ U e I/G nas extremidades de não-redução das cadeias.

17. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 e 12, no qual cerca de 15% a 35% do número total de cadeias na composição um Δ U na extremidade de não-redução.

18. Composição de LMWH, de acordo com a reivindicação 17, no qual 80% ou mais do número total de cadeias na composição tem um Δ U não-sulfatado na extremidade de não-redução.

19. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 e 12, menos do que 5% do número total de cadeias na composição tem uma estrutura terminal de redução modificada.

20. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 e 12, no qual pelo menos 60% ou mais do número total de cadeias na composição compreende HNAc na extremidade de redu-

ção.

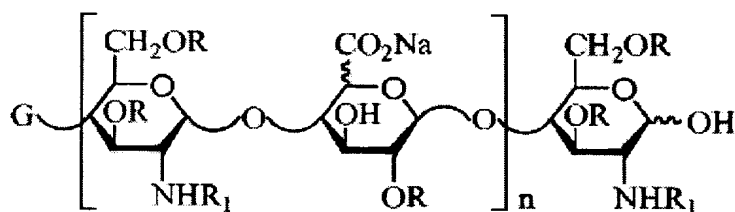
21. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 12, tendo um ou mais dos seguintes: um teor de cálcio menor do que 3%; um teor de sódio menor do que 30%; enzima heparinase a menos do que 1000 ng/mg; metanol a menos do que 1,0% peso/peso; etanol menor do que 1,0% peso/peso; menos do que 2,0% de cloreto; menos do que 10% de água por peso; e menos do que 2000 ppm de sulfato livre.

22. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 12, no qual a LMWH proporciona pelo menos um aumento de 2 vezes na liberação de TFPI conforme comparado a enoxaparina.

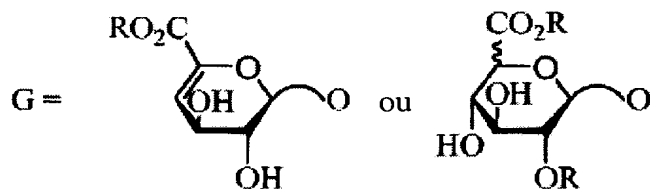
23. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 12, tendo uma meia-vida intravenosa de cerca de 30 minutos a 3 horas.

24. Composição de LMWH, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 12, tendo uma meia-vida subcutânea de cerca de 1,5 a 2,5 horas.

25. Composição de LMWH, tendo a seguinte estrutura:



no qual



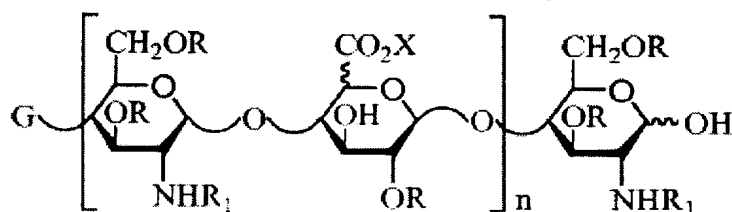
R é H ou SO₃Na;

R₁ é SO₃Na ou COCH₃;

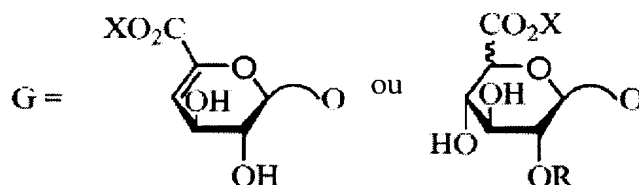
$n = 2-50$; e

a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 9-16 ou 8-15.

26. Composição de LMWH tendo a seguinte estrutura:



5 no qual



X é Na ou Ca, R é H ou SO_3Na ;

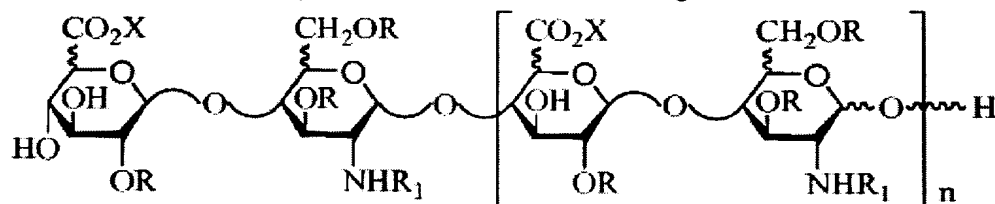
R_1 é SO_3Na ou COCH_3 ;

$n = 2-45$; e

a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 7-13 ou 8-12.

10

27. Composição de LMWH, tendo a seguinte estrutura:



no qual X é Na ou Ca, R é H ou SO_3Na ;

R_1 é SO_3Na ou COCH_3 ;

$n = 2-50$; e

a composição preferivelmente tem um valor médio para n de 9-16 ou 8-15.

15

28. Composição de LMWH compreendendo uma ou mais das seguintes características:

a composição tem estruturas terminais de redução substancialmente não modificadas, pelo menos 60% das cadeias da composição tem H_{NAC} na extremidade de redução; menos do que 90% das cadeias da com-

posição tem um ΔU sulfatado na extremidade de não-redução; não existe substancialmente região de ligação presente na composição; a composição tem mais cadeias com 3-O sulfatos do que enoxaparina ou dalteparina; e a razão de $\Delta U_{2S}H_{NaC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ na composição é cerca de 4:1, ou menos.

5 29. Composição de LMWH, de acordo com a reivindicação 28, no qual a composição tem todas das características.

30. Composição farmacêutica compreendendo uma composição de LMWH de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3 e 5, 6, 12 ou 25, e veículo farmaceuticamente aceitável.

10 31. Método de tratamento de um indivíduo tendo ou em risco de ter uma distúrbio trombótica, compreendendo administrar uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 e 5, 6, 12 ou 25 a um indivíduo, para, desse modo, tratar a distúrbio.

15 32. Método, de acordo com a reivindicação 31, no qual a distúrbio é síndrome coronária aguda (ACS).

33. Método, de acordo com a reivindicação 31, no qual a distúrbio é infarto miocárdial.

20 34. Método, de acordo com a reivindicação 33, no qual a distúrbio é infarto miocárdial de ST elevado ou infarto miocárdial de ST não-elevado.

35. Método, de acordo com a reivindicação 31, no qual a distúrbio é associada com intervenção cirúrgica.

25 36. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual a intervenção cirúrgica é selecionada a partir do grupo consistindo em angioplastia, intervenções coronárias percutâneas (PCI) e colocação de stent.

37. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual o indivíduo pode ter, estar em risco, ou tendo, ou estar se recuperando de uma intervenção cirúrgica.

30 38. Método, de acordo com a reivindicação 37, no qual o indivíduo está em risco de enxerto de derivação de artéria coronária (CABG).

39. Método, de acordo com a reivindicação 31, no qual a distúrbio é angina estável ou instável.

40. Método, de acordo com a reivindicação 31, compreendendo adicionalmente a atividade da composição de LMWH usando ensaio de coagulação.

5 41. Método, de acordo com a reivindicação 40, no qual o ensaio de coagulação é tempo de coágulo ativado (ACT) ou tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT).

42. Método, de acordo com a reivindicação 31, compreendendo adicionalmente administrar sulfato de protamina após a administração da composição de LMWH para neutralizar alguma ou toda a atividade de anti-Xa ou atividade de anti-IIa da composição de LMWH.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, no qual a composição de LMWH é neutralizada antes do CABG.

44. Método para manter um valor de ACT alvo pela administração de injeções de bolus múltiplos da composição de LMWH como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 25 a um indivíduo em necessidade de manutenção do valor de ACT alvo.

45. Método de tratamento de uma distúrbio trombótica em um paciente, compreendendo:

20 administrar uma composição de LMWH como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 25 ao paciente;

classificação do paciente como não em necessidade de intervenção cirúrgica, ou como um candidato à intervenção cirúrgica antes da liberação do hospital; e

25 opcionalmente, se o paciente é classificado como um candidato à intervenção cirúrgica, em seguida realiza-se um ou ambos de monitoramento da composição de LMWH e neutralização da composição de LMWH.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, no qual o paciente é classificado como um candidato à intervenção cirúrgica, e o método compreende adicionalmente monitorar a atividade da composição de LMWH em uma ou mais, ou toda, ou antes, durante ou após a cirurgia.

47. Método, de acordo com a reivindicação 45, no qual o paciente é classificado como um candidato a CABG, e o método compreende adi-

cionalmente um ou ambos de monitoramento da atividade da composição de LMWH, e neutralização de alguma ou toda da atividade de anti-Xa, da atividade de anti-IIa, ou ambas, antes do CABG.

5 48. Método de monitoramento de um indivíduo tratado com uma composição de LMWH como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 25, compreendendo:

10 avaliação do tempo de coágulo ativado (ACT), ou tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT) em um indivíduo que tenha sido administrada um composição de LMWH como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 6 ou 25.

49. Método de tratamento de um indivíduo que tenha sido administrada uma composição de LMWH como definido em qualquer uma das reivindicação 1, 3, 5, 6 ou 25, compreendendo:

15 administrar sulfato de protamina ao indivíduo para neutralizar alguma ou toda da atividade de anti-Xa, atividade de anti-IIa, ou ambas de uma composição de LMWH no indivíduo.

50. Método de fabricação de uma composição de LMWH, compreendendo:

20 (1) sujeição de uma amostra de heparina não-fracionada (UFH) a uma primeira de uma precipitação com um solvente orgânico polar, um solvente não-orgânico polar, e um sal, para proporcionar um primeiro sobrenadante;

25 (2) sujeição do primeiro sobrenadante a uma segunda de uma precipitação com um solvente orgânico polar, e um solvente não-orgânico polar, para produzir um precipitado;

(3) solubilização do precipitado e clivagem do precipitado com uma enzima que cliva em ligações ácidas urônicas não-sulfatadas;

30 (4) precipitação da preparação clivada com um sal e um solvente orgânico polar para formar sólido tendo um comprimento de cadeia médio de 8-14 dissacarídeos;

(5) sujeição do material a partir do sólido a uma etapa de seleção de tamanho para proporcionar uma preparação com um comprimento de

cadeia médio de 9 a 16 dissacarídeos para, desse modo, produzir a composição de LMWH.

51. Método de produção de uma composição de LMWH tendo um comprimento de cadeia médio de cerca de 9 a 16 dissacarídeos, compreendendo

provisão de um precursor de composição de LMWH tendo um comprimento de cadeia médio de 8-14 dissacarídeos; e

processamento do precursor de composição de LMWH tendo um comprimento de cadeia médio de cerca de 9 a 16 dissacarídeos.

52. Método de produção de uma composição de LMWH, compreendendo:

(1) sujeição de uma amostra de heparina não-fracionada (UFH) a uma primeira de uma precipitação com um solvente orgânico polar, um solvente não-orgânico polar, e um sal de sódio, para proporcionar um primeiro sobrenadante; e

(2) sujeição do primeiro sobrenadante a uma segunda precipitação com um solvente orgânico polar, e um solvente não-orgânico polar, para produzir um precipitado;

para, desse modo, produzir a composição de LMWH.

53. Método de avaliar uma preparação de heparina não-fracionada (UFH) para determinar a adequabilidade da preparação de UFH para processamento em uma composição de LMWH, compreendendo:

determinação da quantidade de um ou mais de N-acetila e epóxido presentes em uma preparação de UFH;

comparação da quantidade a um critério pré-selecionado, e tomada de uma decisão sobre a preparação de UFH baseado se o critério pré-selecionado é encontrado;

para, desse modo, avaliar ou processar a preparação de UFH.

54. Método de avaliar ou processar uma preparação de LMWH intermediária para determinar a adequabilidade da preparação intermediária para processamento em uma composição de LMWH, compreendendo:

comparação da quantidade de um ou mais de ácido idurônico

sulfatado, hexosamina N-sulfatada ligada a ácido urônico, epóxido e 6-O hexosamina sulfatada, na preparação de LMWH intermediária para a quantidade da mesma porção estrutural em um material de partida de heparina não-fracionada (UFH); e

5 tomada de uma decisão sobre a preparação de LMWH intermediária baseado se um critério pré-selecionado entre o material de partida e a preparação de LMWH intermediária é encontrado;

para, desse modo, avaliar ou processar a preparação de LMWH intermediária.

10 55. Método de avaliar ou processar uma preparação de LMWH, compreendendo:

proporcionar uma composição de LMWH; e

determinar se uma estrutura da Tabela 10A está presente em uma faixa provida na Tabela 10A, para, desse modo, avaliar uma preparação de LMWH.

15

56. Método de avaliar ou processar uma preparação de LMWH, compreendendo:

proporcionar uma composição de LMWH; e

determinar se uma estrutura da Tabela 11A está presente em uma faixa provida na Tabela 11A, para, desse modo, avaliar uma preparação de LMWH.

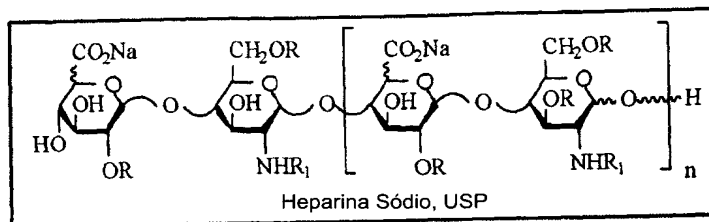
20

57. Método de avaliar uma preparação de LMWH, compreendendo:

analisar uma composição de LMWH por 2D RMN; e

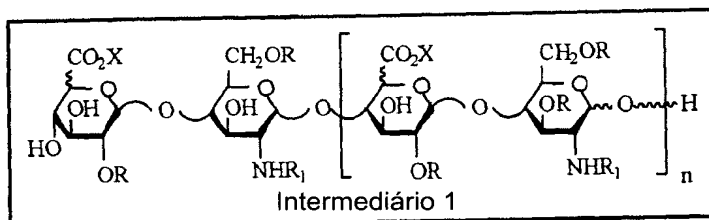
25

determinar se um ou mais dos picos listados na Tabela 11A está presente em uma faixa descrita na Tabela 11A, para, desse modo, avaliar a preparação de LMWH.



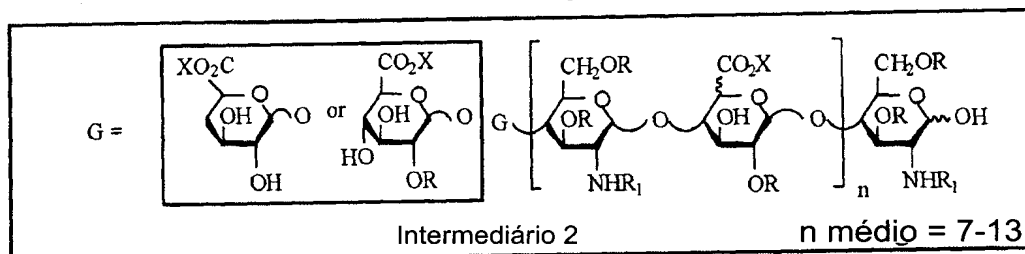
n médio = 19-35

Etapa 1

 $\text{Ca}(\text{OAc})_2 \downarrow$ Etanol Aquoso

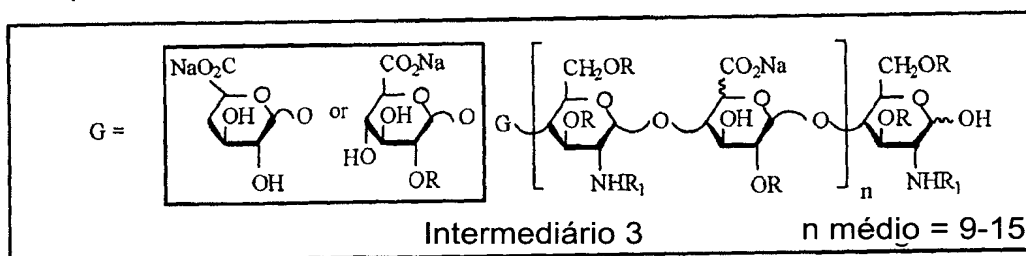
n médio = 19-15

Etapa 2

MO11 $\downarrow$ 25 mM NaOAc
37°C, pH = 7.2

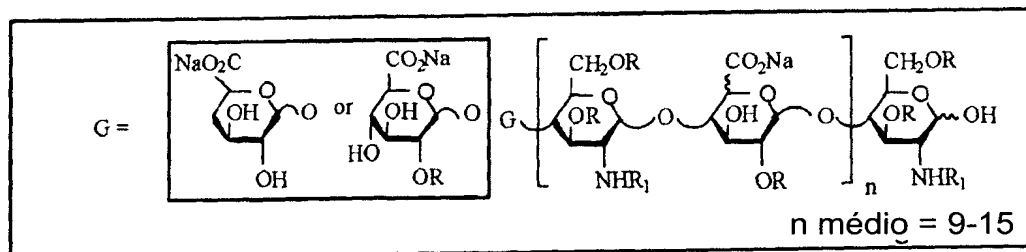
n médio = 7-13

Etapa 3

SEC $\downarrow$ Tampão Na_2PO_4 

n médio = 9-15

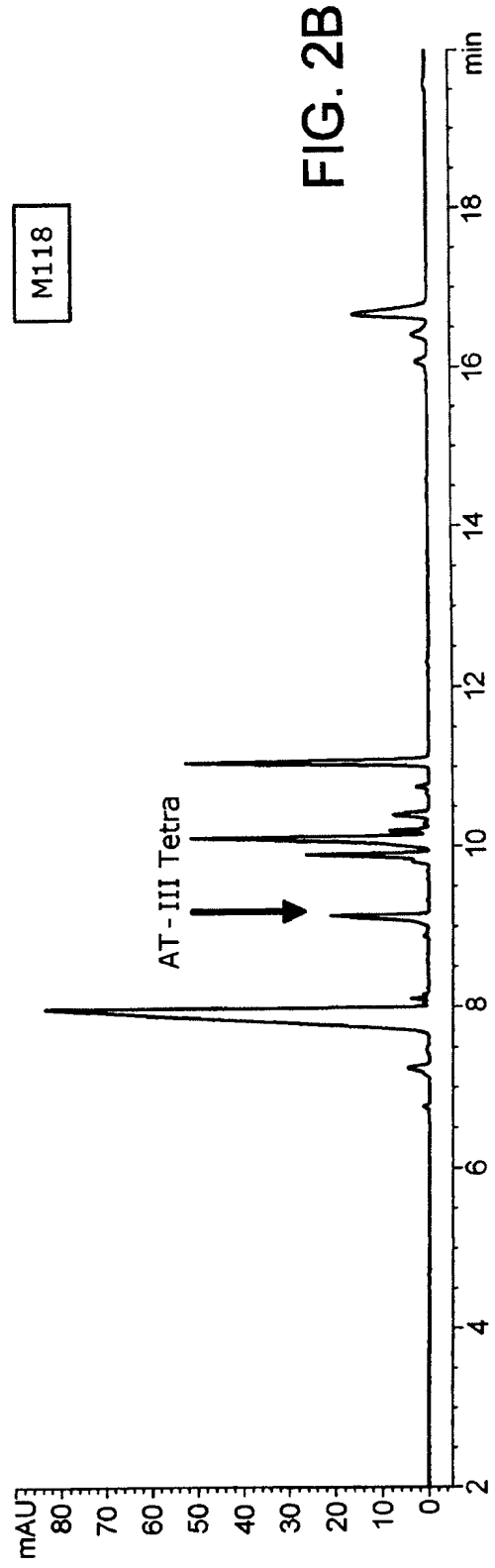
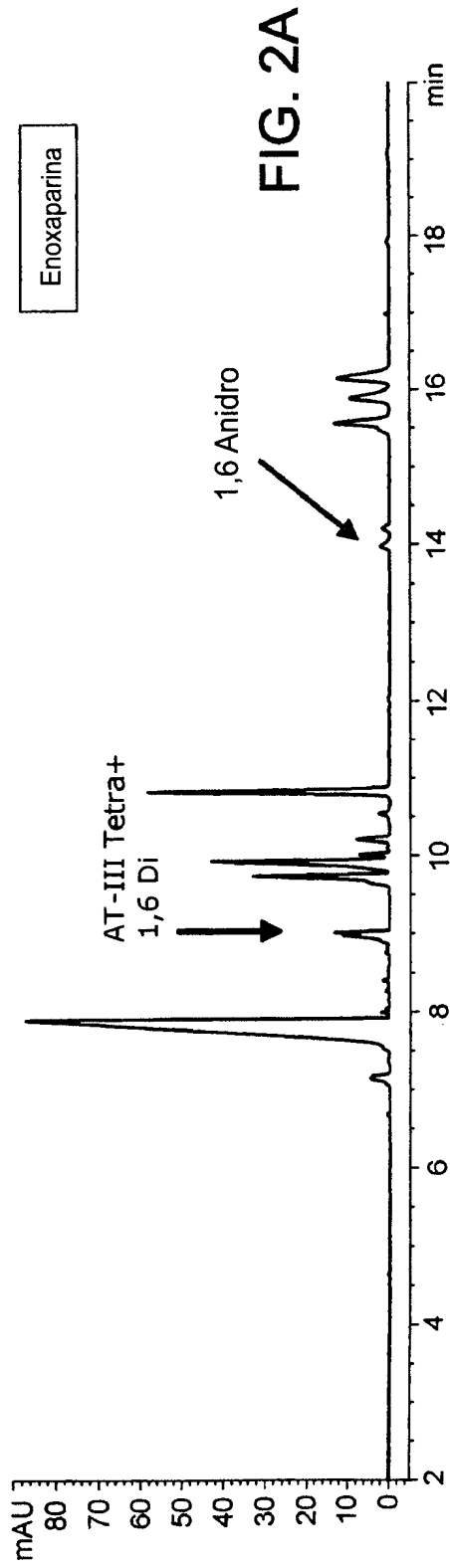
Etapa 4

0.2 μm filtração $\downarrow$ água purificada

R = H or SO_3Na
 R1 = SO_3Na or COCH_3

X = Na, Ca

FIG. 1



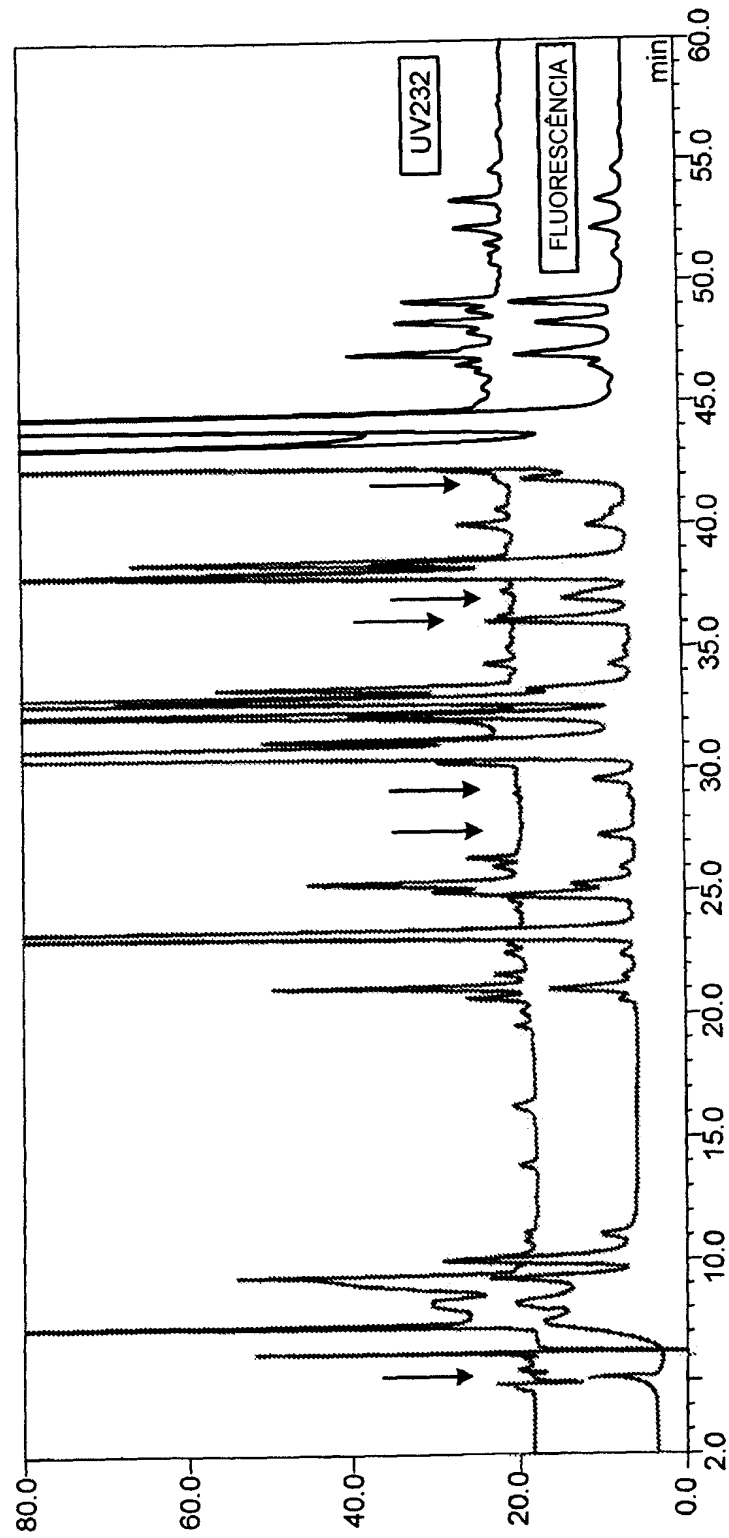


FIG. 3

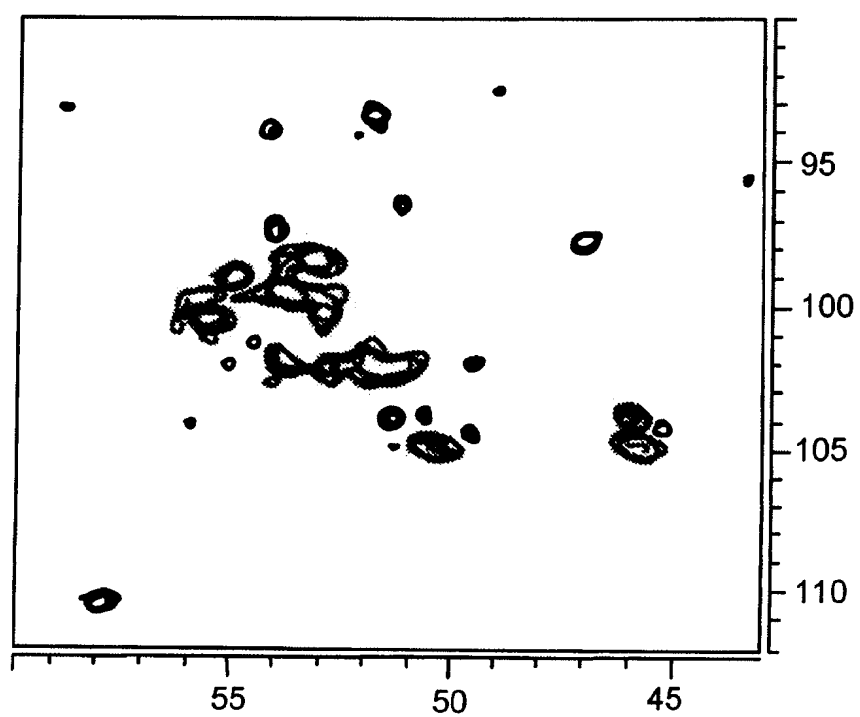


FIG. 4

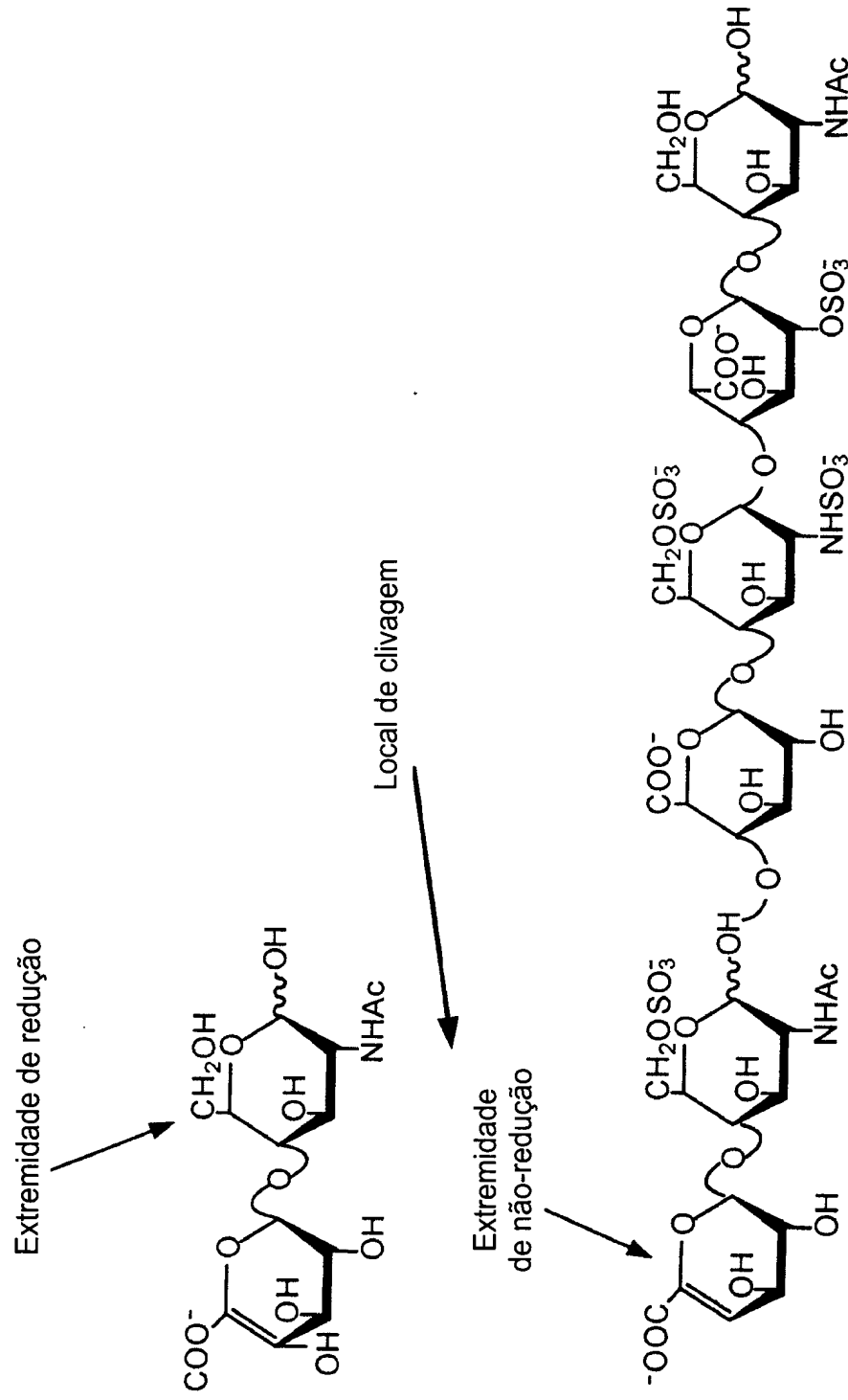


FIG. 5

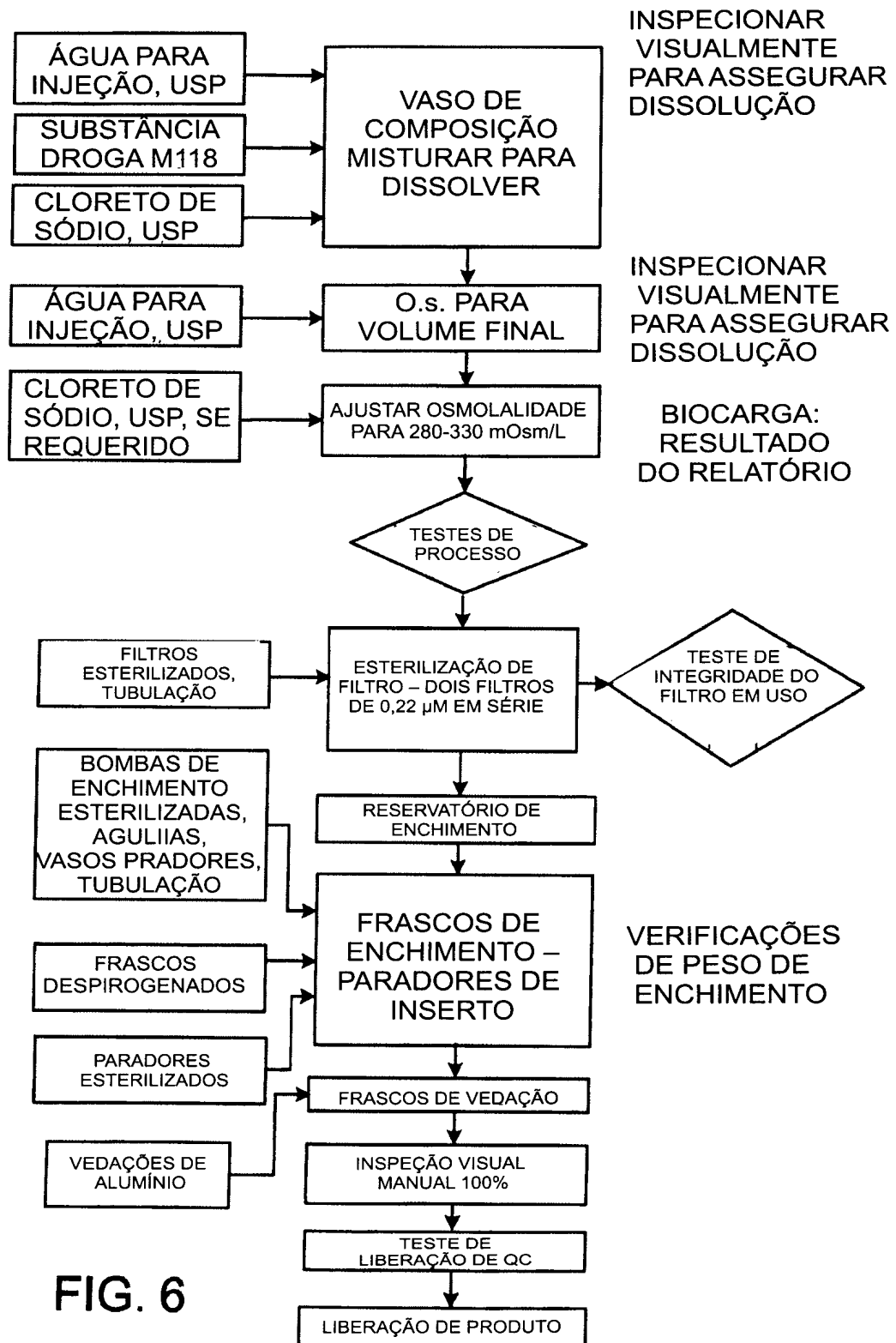


FIG. 6

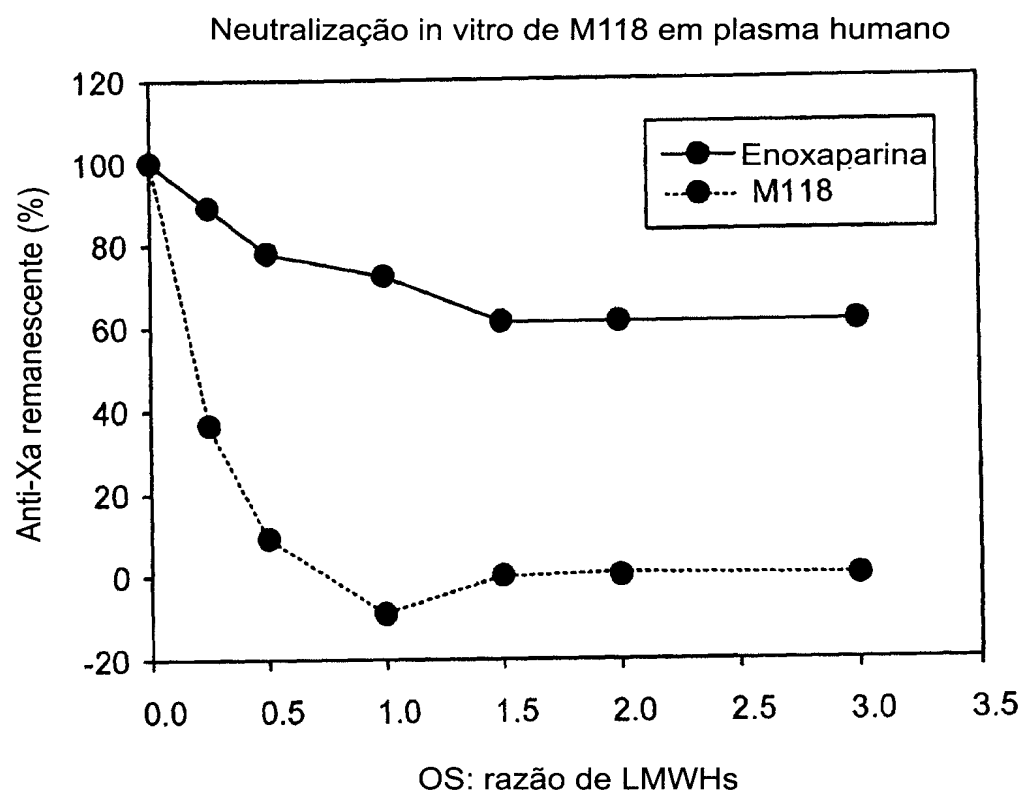
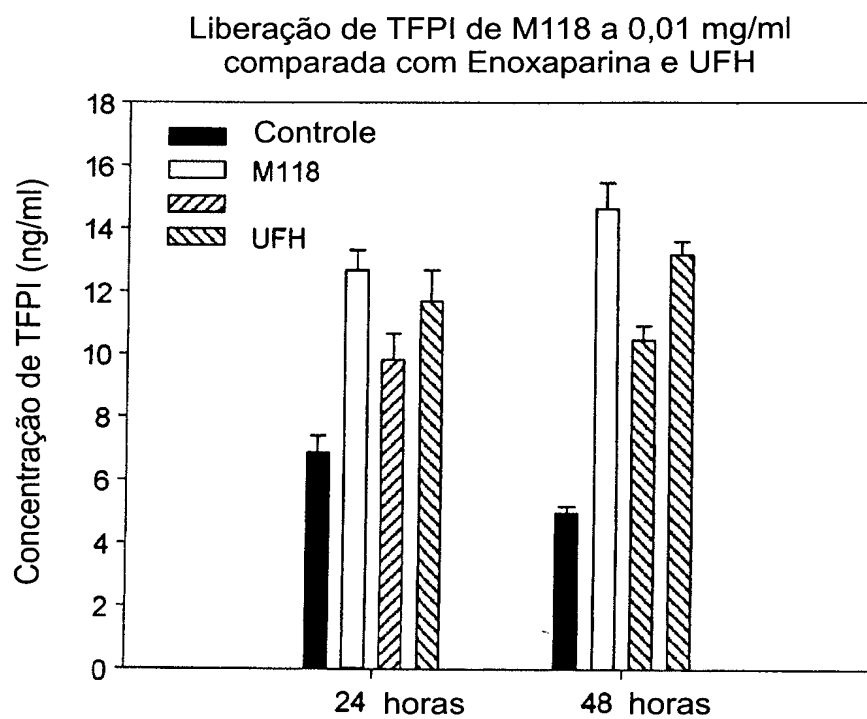


FIG. 7

**FIG. 8**

9/17

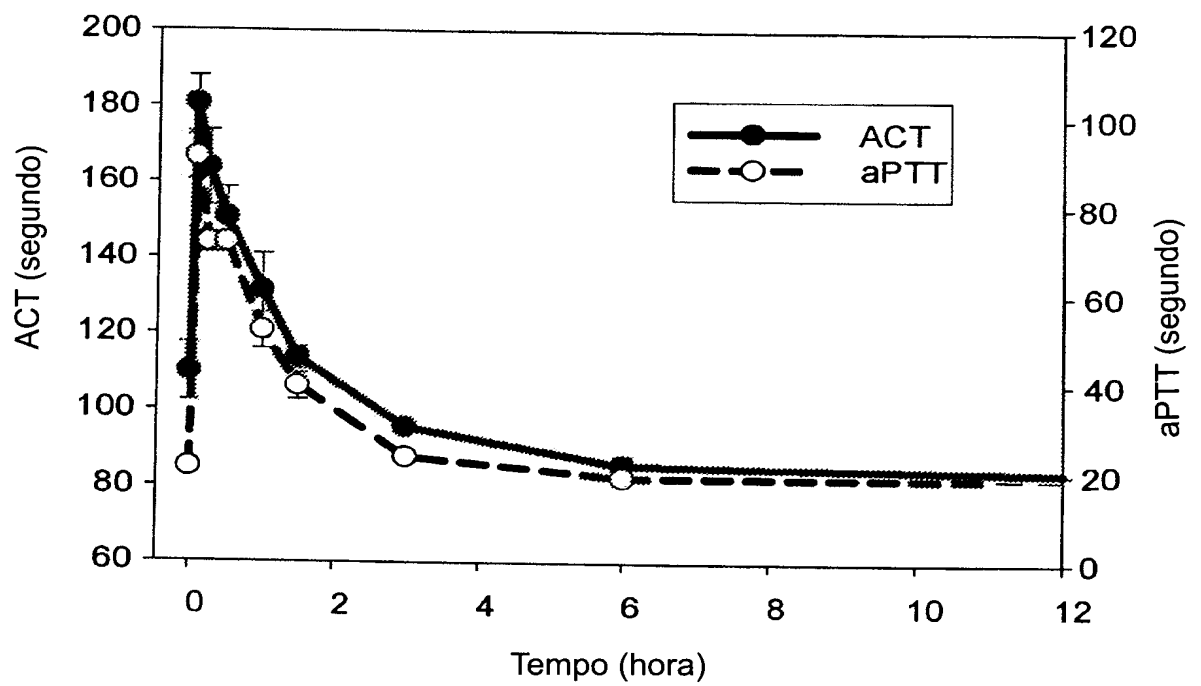


FIG. 9

10/17

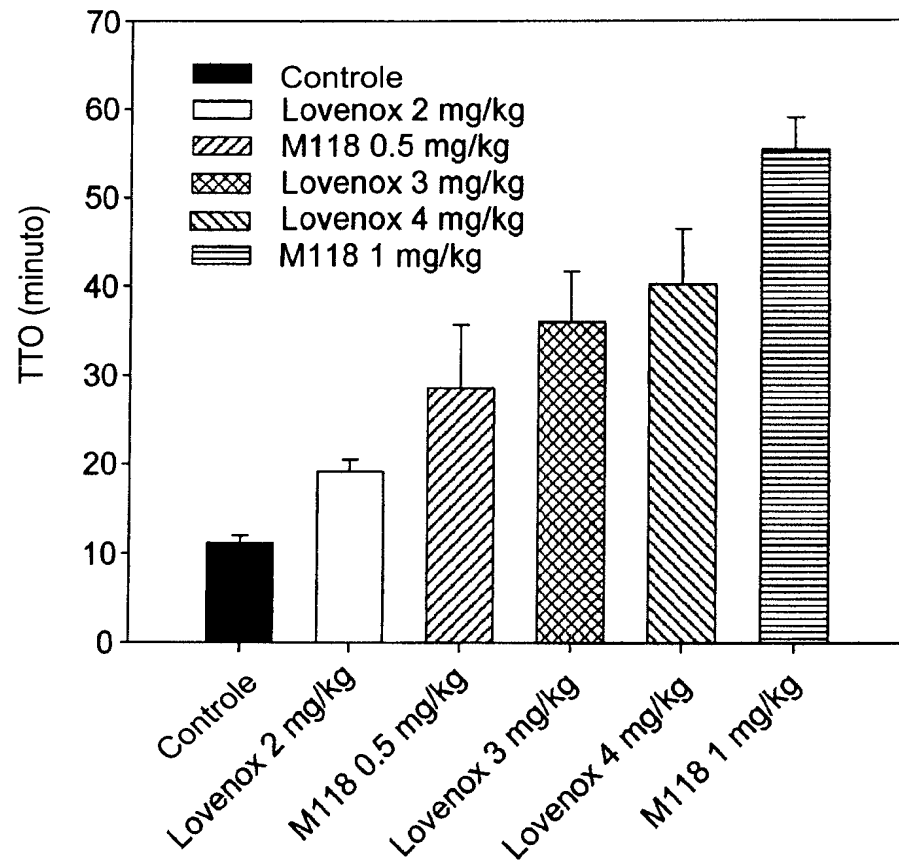


FIG. 10

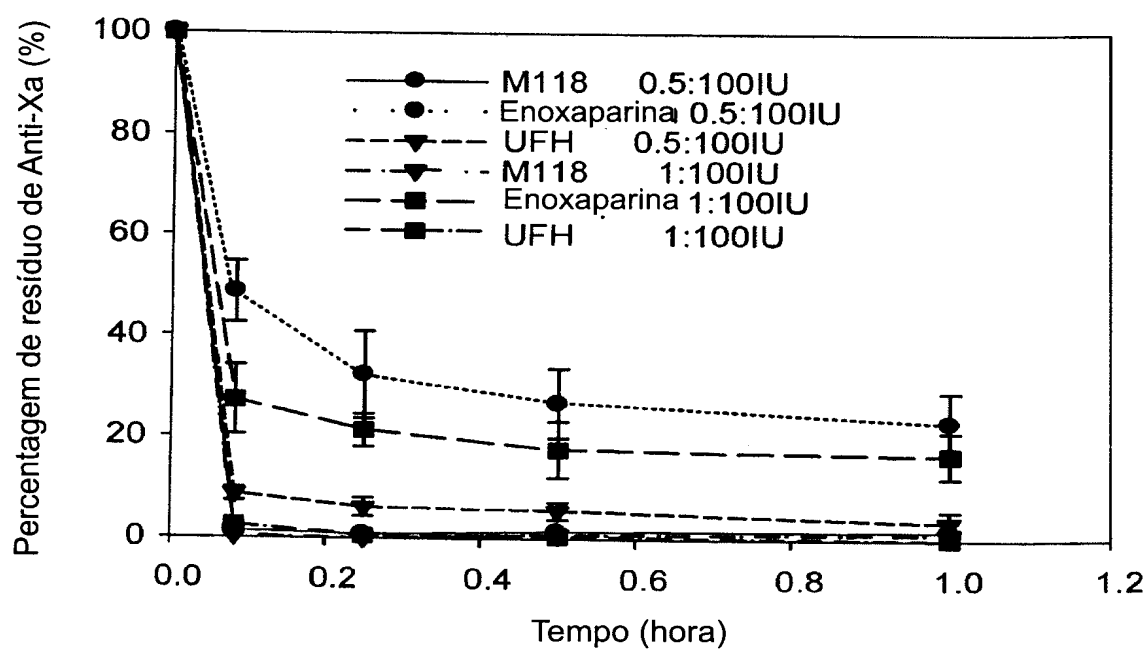


FIG. 11

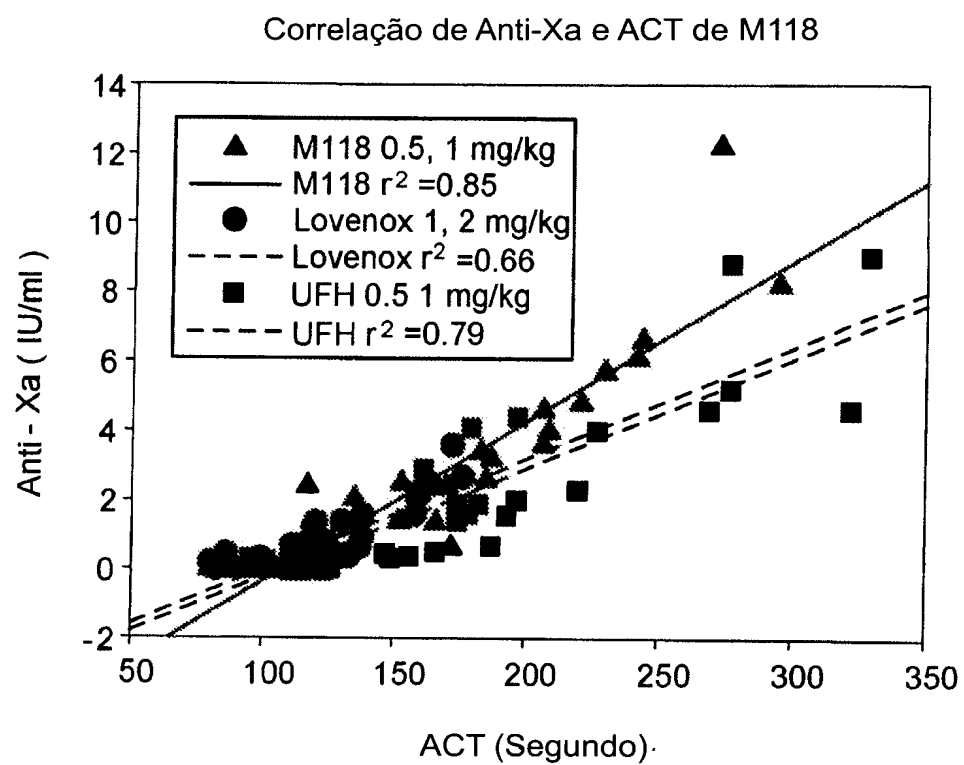


FIG. 12

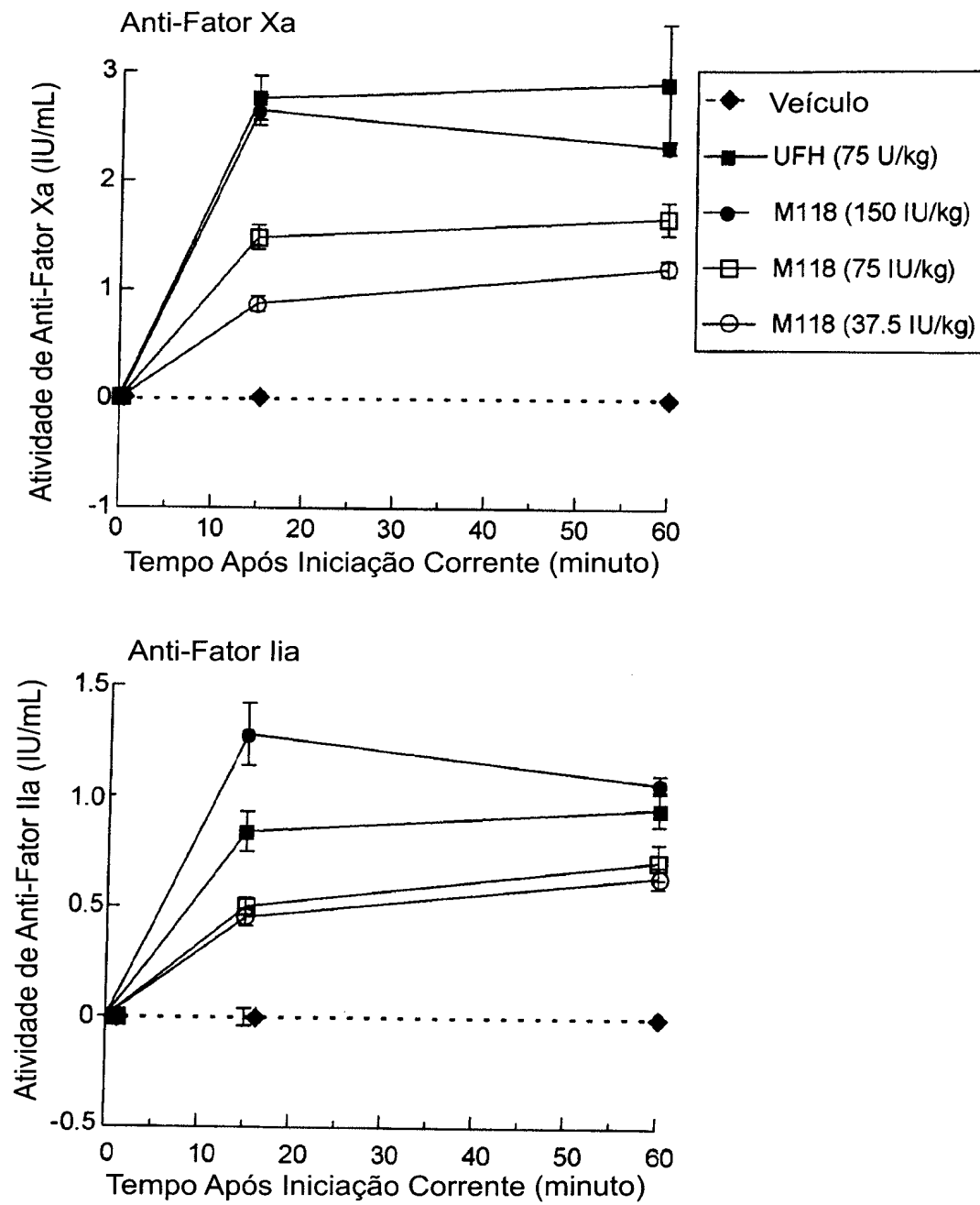


FIG. 13

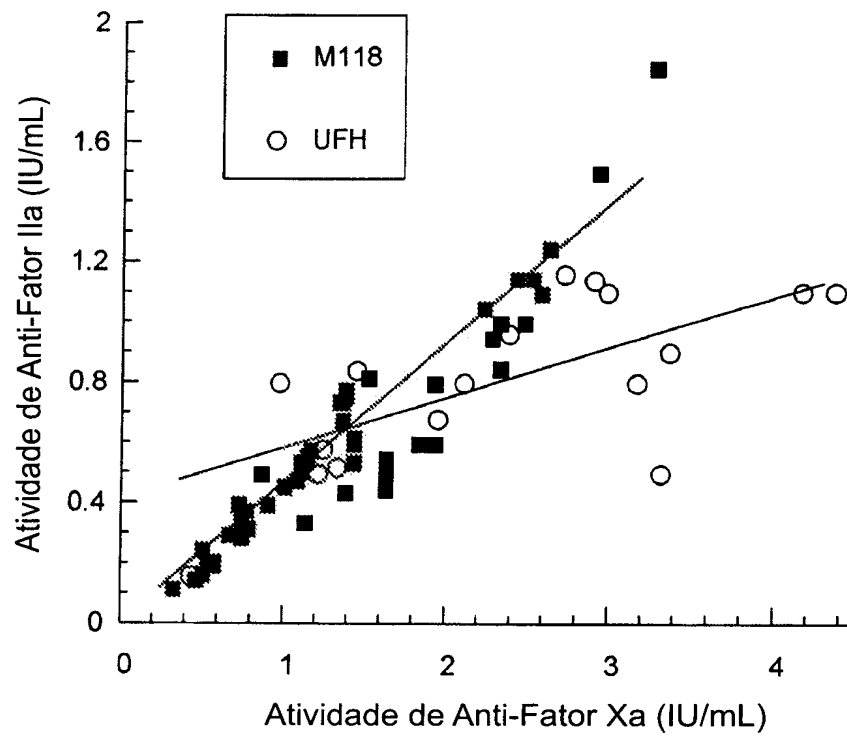


FIG. 14

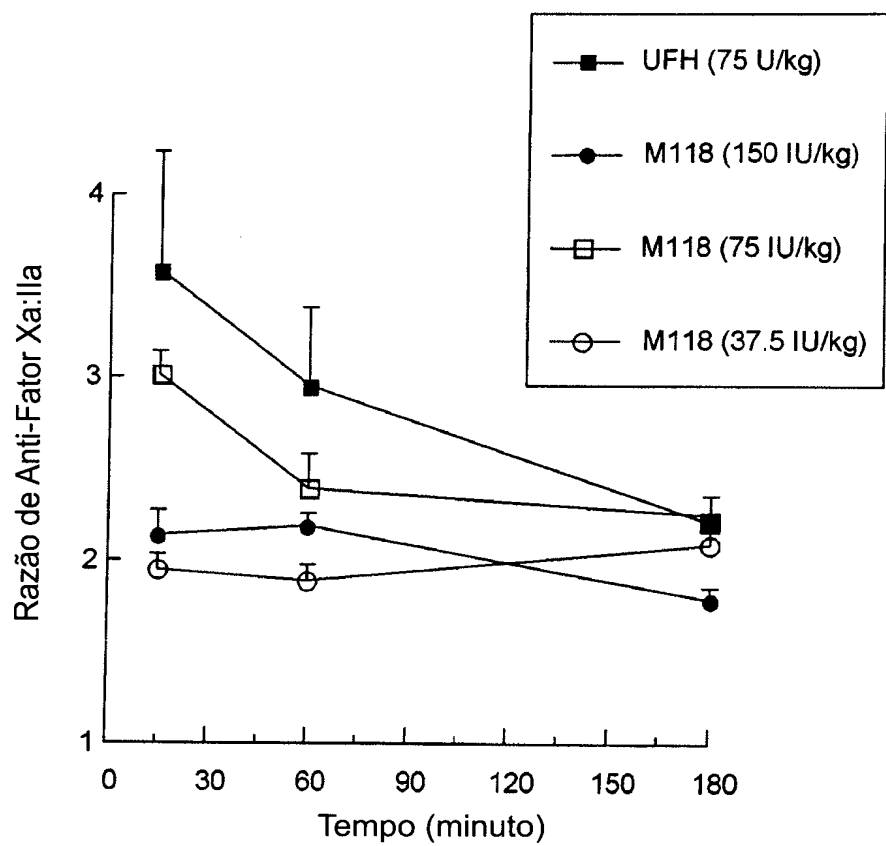


FIG. 15

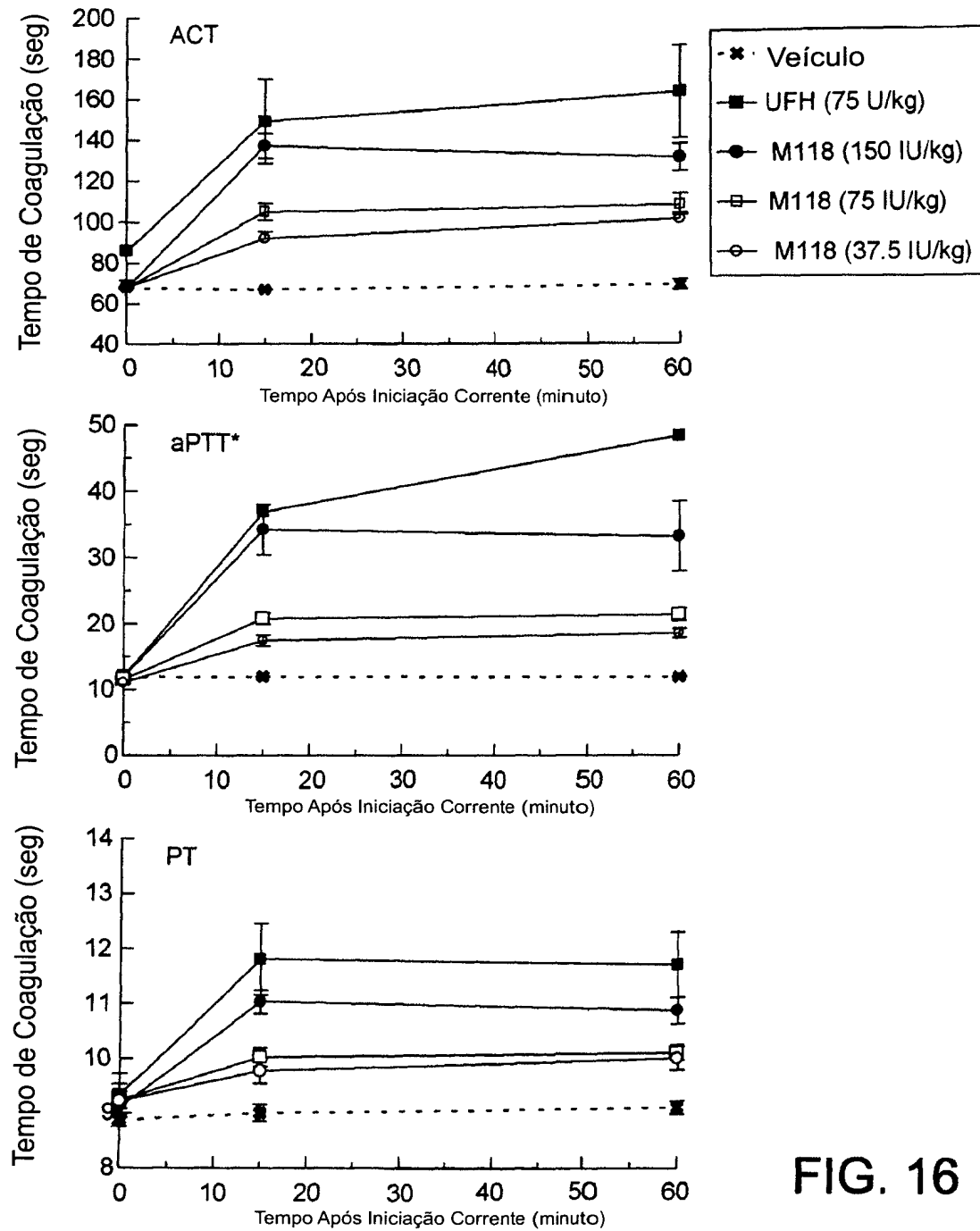
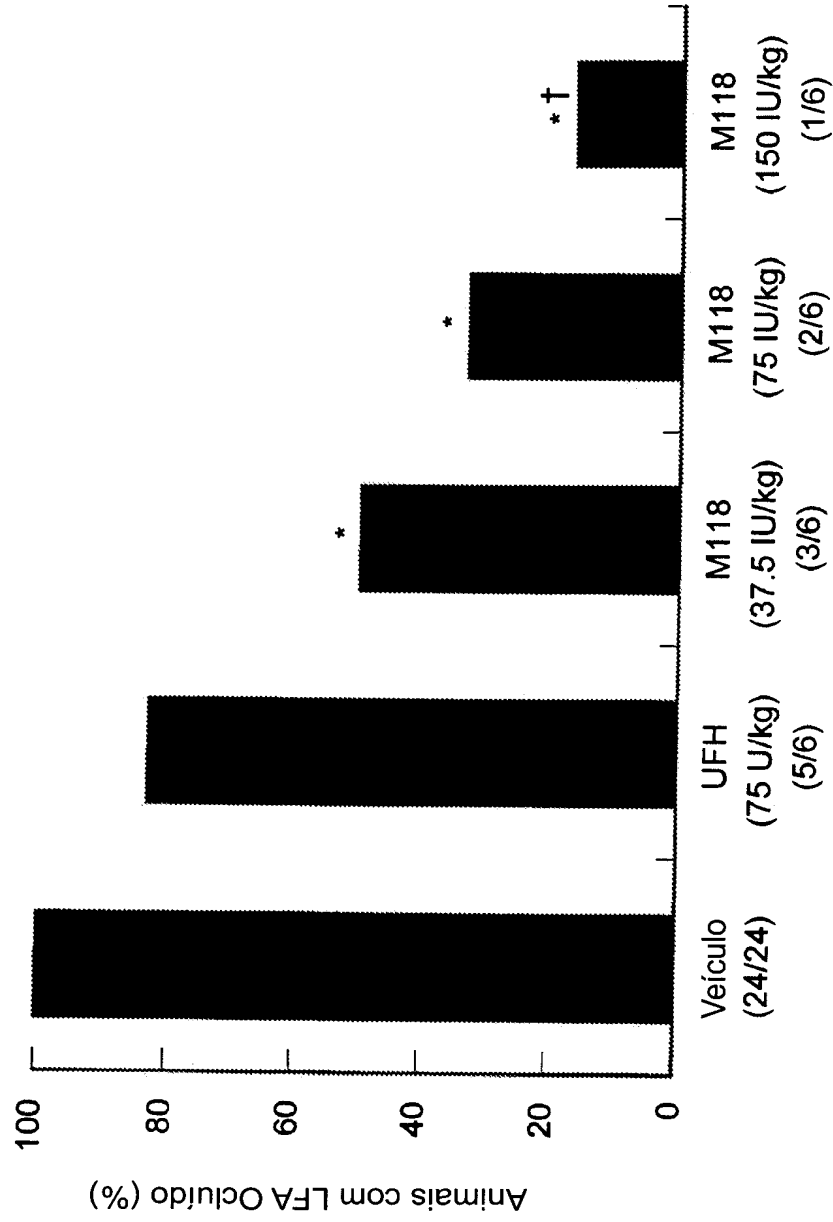


FIG. 16



*P<0,05 versus controle; †P<0,5 versus UFH.

FIG. 17

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÃO DE HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR E USO DA MESMA**".

5 A presente invenção refere-se a preparações de heparinas de baixo peso molecular (LMWHs) que tem propriedades aperfeiçoadas, por exemplo, propriedades que proporcionam uma vantagem clínica. Métodos de produção e uso, bem como métodos de análise de materiais de partida, processamento, intermediários e produtos finais na produção de tais preparações de LMWH, são providos.