

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 924 830**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)
C12P 19/26 (2006.01)
C08L 5/10 (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2014 PCT/US2014/042683**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14204929**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2014 E 14812890 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 3011043**

(54) Título: **Moléculas de heparina reversibles**

(30) Prioridad:

17.06.2013 US 201361835875 P

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

11.10.2022

(73) Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL (33.3%)
308 Bynum Hall Campus Box 4105 Chapel Hill, NC 27599-4105, US;
RENSSELAER POLYTECHNIC INSTITUTE (33.3%)
y
NUTECH VENTURES (33.3%)**

(72) Inventor/es:

**LIU, JIAN;
XU, YONGMEI;
LINHARDT, ROBERT, J. y
HARRIS, EDWARD**

(74) Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 924 830 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de heparina reversibles

5 CAMPO TÉCNICO

El objeto descrito en el presente documento se refiere a compuestos de heparina, su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante y la síntesis de compuestos de heparina.

10 ANTECEDENTES

El sulfato de heparán (HS) es un componente ubicuo de la superficie celular y la matriz extracelular. Regula una amplia gama de funciones fisiológicas y fisiopatológicas, incluido el desarrollo embrionario y la coagulación de la sangre, y puede facilitar la infección viral (Esko y Selleck (2002) Annu. Rev. Biochem. 71, 435-471; Liu y Thorp (2002) Med. Res. Rev. 22, 1-25). HS ejerce sus efectos biológicos al interactuar con las proteínas específicas involucradas en un proceso determinado (Capila y Lindhardt (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41, 390-412). El HS es un polisacárido altamente cargado que comprende unidades de glucosamina con enlaces 1→4 y ácido glucurónico/idurónico que contienen grupos N- y O-sulfo. Las secuencias de sacáridos únicas dentro de HS pueden determinar la especificidad de la unión de HS a sus proteínas diana (Linhardt (2003) J. Med. Chem. 46, 2551-2564). La heparina, una forma especializada de HS, es un fármaco anticoagulante de uso común. Por lo tanto, nuevos procedimientos para la síntesis de compuestos de heparina y HS atraen un interés considerable para aquellos que desarrollan anticoagulantes y otros fármacos relacionados con HS que tienen efectos farmacológicos mejorados.

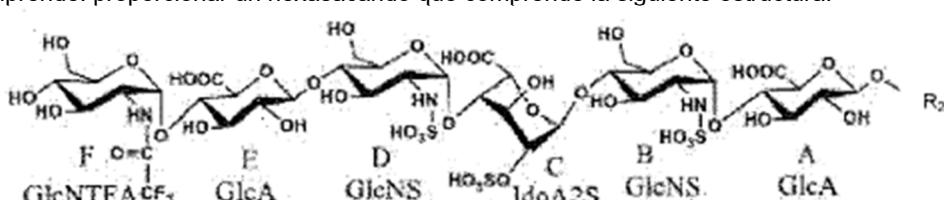
25 La heparina se ha utilizado con éxito como fármaco anticoagulante durante más de 50 años (Mackman, 2008). Actualmente se comercializa en tres formas: heparina no fraccionada (UF, *unfractionated*) ($\text{PM}_{\text{promedio}} \sim 14000$ Da); una heparina de bajo peso molecular ($\text{PM}_{\text{promedio}} \sim 6000$ Da); y el pentasacárido de heparina ULMW sintético ARIXTRA® (PM 1508,3 Da). La heparina UF se usa en cirugía y diálisis renal debido a su vida media relativamente corta y su seguridad para pacientes con insuficiencia renal (Hirsh et al., 2007). Las heparinas de bajo peso molecular y la heparina ULMW ARIXTRA®, introducidas hace más de una década, han desempeñado un papel cada vez más importante en la prevención de la trombosis venosa en pacientes de alto riesgo (Tohu et al., 2004; Weitz, 2010) debido a su dosis de anticoagulante más predecible, su vida media prolongada y su menor riesgo de osteoporosis. (Weitz y Linkins, 2007). Las investigaciones recientes sobre la heparina de bajo peso molecular dieron como resultado la aprobación europea de la bemiparina sódica (Martinez-Gonzalez y Rodriguez, 2010), una heparina de bajo peso molecular de segunda generación y la aprobación en los Estados Unidos de una heparina de bajo peso molecular genérica, la M-enoxaparina.

30 La heparina UF se aísla de intestino porcino o pulmón bovino, y las heparinas de bajo peso molecular se preparan mediante la degradación química o enzimática de esta heparina UF de origen animal. Un brote mundial de heparina contaminada ha generado preocupación sobre la fiabilidad y seguridad de las heparinas de origen animal y las heparinas de bajo peso molecular (Guerrini et al., 2008; Liu et al., 2009). Como resultado, es muy deseable un procedimiento rentable para preparar nuevas heparinas sintéticas (Peterson et al., 2009).

35 WO2012/116048; Y. XU ET AL, "Chemoenzymatic Synthesis of Homogeneous Ultralow Molecular Weight Heparins", SCIENCE, (20111027), vol. 334, núm. 6055, páginas 498 - 501; y AF MOON ET AL, "Dissecting the substrate recognition of 3-O-sulfotransferase for the biosynthesis of anticoagulant heparin", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US (20120319), vol. 109, núm. 14, páginas 5265 - 5270 describen heparinas y procedimientos para su síntesis.

RESUMEN

50 La presente invención proporciona en un primer aspecto un procedimiento para sintetizar un compuesto de heparina, que comprende: proporcionar un hexasacárido que comprende la siguiente estructura:



55 en la que R₂ es H o una etiqueta detectable; alargar el sustrato de hexasacárido a un heptasacárido utilizando heparosan sintasa-2 y el sustrato ácido glucurónico (GlcUA); alargar el sustrato de heptasacárido a un octasacárido utilizando N-acetil glucosaminil transferasa y N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA); epimerizar el octasacárido utilizando C₅-epimerasa (C₅-epi);

sulfatar el octasacárido epimerizado resultante utilizando 2-O-sulfotransferasa (2-OST) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS);

5 convertir el residuo o residuos de N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA) en el octasacárido en residuos de N-sulfo glucosamina (GlcNS) utilizando N-sulfotransferasa (NST), 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS) y una base para proporcionar un sustrato de octasacárido;

alargar el sustrato de octasacárido a un decasacárido utilizando heparosan sintasa-2 y N-acetil glucosaminil transferasa, y utilizando sustratos que comprenden ácido glucurónico (GlcA) y N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA);

10 epimerizar el decasacárido utilizando C₅-epimerasa (C₅-epi);

sulfatar el decasacárido epimerizado resultante utilizando 2-O-sulfotransferasa (2-OST) y de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS);

convertir el residuo o residuos de N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA) en el decasacárido sulfatado resultante en residuos de N-sulfo glucosamina (GlcNS) utilizando N-sulfotransferasa (NST), 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS) y una base para proporcionar un sustrato de decasacárido;

15 alargar el sustrato de decasacárido en un dodecasacárido utilizando heparosan sintasa-2 y N-acetil glucosaminil transferasa, y utilizando sustratos que comprenden ácido glucurónico (GlcA) y N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA);

epimerizar el dodecasacárido utilizando C₅-epimerasa (C₅-epi);

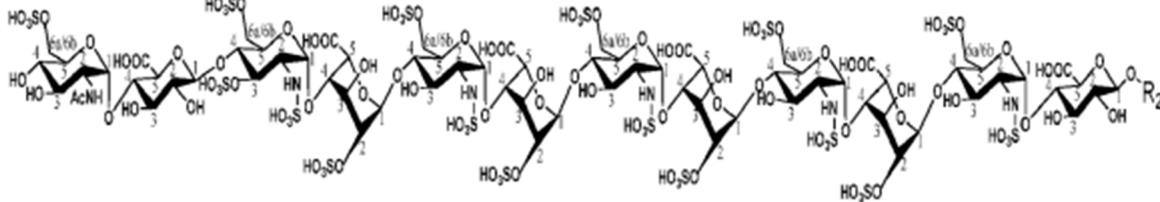
sulfatar el dodecasacárido epimerizado resultante utilizando

20 (i) 2-O-sulfotransferasa (2-OST) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS);

(ii) 6-O-sulfotransferasa (6-OST) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS); y

(iii) 3-O-sulfotransferasa 1 (3-OST-1), y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS);

en el que se sintetiza un compuesto de heparina representado por la siguiente estructura:



25 En una realización adicional del procedimiento anterior, el hexasacárido se proporciona mediante etapas que comprenden:

alargar un sustrato de monosacárido a un hexasacárido utilizando las enzimas N-acetil glucosaminil transferasa y heparosan sintasa-2, y

30 sustratos que comprenden ácido glucurónico (GlcA) y N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA);

convertir residuo(s) de N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA) en el hexasacárido en residuos de N-sulfo glucosamina (GlcNS) utilizando N-sulfotransferasa (NST), 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS) y una base;

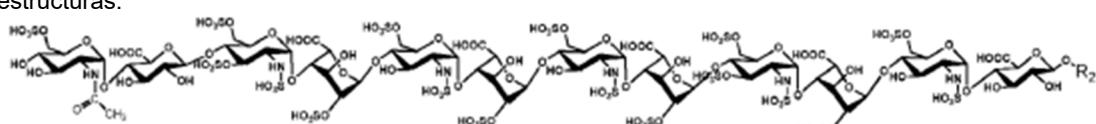
epimerizar el hexasacárido utilizando C₅-epimerasa (C₅-epi); y sulfatar el hexasacárido utilizando 2-O-sulfotransferasa (2-OST) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS).

35 En otra realización del procedimiento anterior, la 6-O-sulfotransferasa (6-OST) es 6-O-sulfotransferasa 1 y/o 3 (6-OST-1 y/o 6-OST-3).

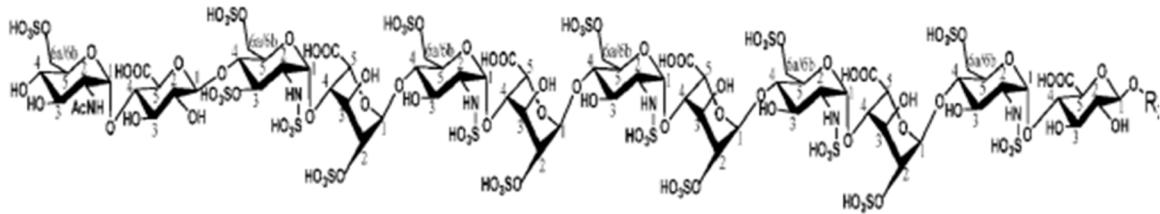
40 En una realización adicional, el procedimiento anterior comprende además sulfatar el dodecasacárido utilizando una 3-O-sulfotransferasa-5 (3-OST-5) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS).

En una realización adicional del procedimiento anterior, la glicosil transferasa se selecciona del grupo que consiste en N-acetil glucosaminil transferasa de *E. coli* K5 (KfiA) y/o heparosan sintasa-2 (pmHS2) de *Pasteurella multocida*.

45 La presente invención proporciona además en un segundo aspecto un compuesto de heparina de bajo peso molecular con actividad anticoagulante reversible, en el que el compuesto de heparina comprende una de las siguientes estructuras:

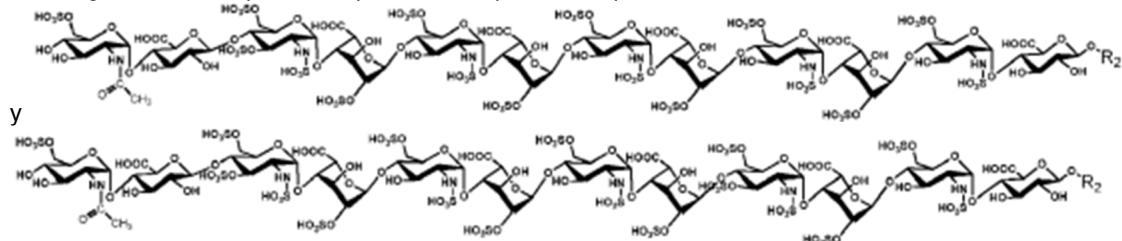


50 en la que R₂ es H o una etiqueta detectable, o



en la que R_2 es H o una etiqueta detectable.

La presente invención proporciona además en un tercer aspecto un compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante, en el que el compuesto de heparina comprende una estructura seleccionada de:



en la que R_2 es H o una etiqueta detectable,
para usar en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante en un sujeto que necesita dicho tratamiento.

En una realización adicional, la presente invención proporciona el compuesto de heparina para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante en un sujeto que necesita dicho tratamiento, en el que la enfermedad es tromboembolismo venoso.

En una realización adicional, la presente invención proporciona el compuesto de heparina para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante en un sujeto que necesita dicho tratamiento, en el que el sujeto que necesita dicho tratamiento tiene insuficiencia renal.

En una realización adicional, la presente invención proporciona el compuesto de heparina para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante en un sujeto que necesita dicho tratamiento, en el que el procedimiento comprende: proporcionar un sujeto que necesita terapia anticoagulante; administrar al sujeto dicho compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante; realizar un control al sujeto para detectar trombocitopenia inducida por heparina; y administrar al sujeto un antídoto para revertir la actividad anticoagulante del compuesto de heparina si el sujeto sufre trombocitopenia inducida por heparina, preferiblemente, en el que el antídoto para revertir la actividad anticoagulante del compuesto de heparina es protamina.

En algunas realizaciones, la base utilizada en una o más reacciones de conversión de la síntesis del compuesto de heparina según el primer aspecto puede ser un hidróxido de litio o una mezcla de trietilamina, CH_3OH y/o H_2O .

En algunas realizaciones, los procedimientos de síntesis de compuestos de heparina pueden tener un rendimiento superior al 30%. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan compuestos de heparina sintetizados mediante los procedimientos de síntesis descritos. En algunas realizaciones, los compuestos de heparina pueden tener actividad anticoagulante. En algunas realizaciones, los compuestos de heparina pueden no tener actividad anti-IIa detectable.

En algunas realizaciones, el compuesto de heparina es susceptible a la endocitosis mediada por estabilina-2, en el que un compuesto de heparina que sufre endocitosis a una tasa del 15 % o más es susceptible a la endocitosis mediada por estabilina-2.

En algunas realizaciones, el compuesto de heparina tiene una afinidad de unión a la antitrombina que oscila entre aproximadamente 23 nM y aproximadamente 37 nM. En algunas realizaciones, la actividad anticoagulante del compuesto de heparina es parcialmente reversible por la protamina, en el que un compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante que es reversible a una tasa del 50 % o más en presencia de 20 ug/ml o menos de protamina es parcialmente reversible.

En algunas realizaciones, el compuesto de heparina tiene una afinidad de unión a la antitrombina que oscila entre aproximadamente 12 nM y aproximadamente 44 nM. En algunas realizaciones, el compuesto de heparina tiene una actividad anti-Xa de aproximadamente 21 ngml⁻¹ de IC₅₀, en las condiciones descritas en el presente documento. En el presente documento, se proporciona un compuesto de heparina para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante según el tercer aspecto descrito anteriormente. El procedimiento puede comprender proporcionar un sujeto que necesita terapia anticoagulante, administrar al sujeto un compuesto de

heparina que tiene actividad anticoagulante, en el que el compuesto de heparina comprende un compuesto de heparina, tal como se describe en el presente documento, en el que la actividad anticoagulante del compuesto de heparina es reversible por la protamina, en el que la actividad anticoagulante se invierte en aproximadamente 50% o más en presencia de 1 ug/ml de protamina. En algunas realizaciones, el sujeto puede sufrir tromboembolismo venoso. En algunas realizaciones, el sujeto puede tener insuficiencia renal. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto humano.

En algunas realizaciones, el procedimiento puede comprender proporcionar un sujeto que necesita terapia anticoagulante, administrar al sujeto un compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante, realizar un control al sujeto para trombocitopenia inducida por heparina y administrar al sujeto un antídoto para revertir la actividad anticoagulante del compuesto de heparina si el sujeto sufre de trombocitopenia inducida por heparina. En algunas realizaciones, el sujeto sufre tromboembolismo venoso. En algunas realizaciones, el sujeto tiene insuficiencia renal. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. En algunas realizaciones, el antídoto para revertir la actividad anticoagulante del compuesto de heparina es la protamina.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan compuestos de heparina de bajo peso molecular con actividad anticoagulante reversible de acuerdo con el segundo aspecto descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, los compuestos de heparina de bajo peso molecular pueden ser susceptibles a la eliminación de la circulación mediada por el hígado. En algunas realizaciones, el compuesto de heparina puede ser susceptible a la endocitosis mediada por estabilina-2 a una tasa del 15 % o más. En algunas realizaciones, el compuesto de heparina es adecuado para la administración a pacientes con insuficiencia renal.

Por consiguiente, un objetivo del objeto de la presente descripción es proporcionar heparinas de bajo peso molecular que tengan una actividad anticoagulante reversible y procedimientos para sintetizarlas.

Habiéndose establecido anteriormente un objetivo del objeto de la presente descripción, y que se logra en su totalidad o en parte mediante el objeto de la presente descripción, otros objetivos se harán evidentes a medida que avanza la descripción cuando se toman en relación con los dibujos adjuntos y ejemplos como se describen mejor a continuación.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El objeto de la presente descripción se puede entender mejor haciendo referencia a las siguientes figuras. Los componentes de las figuras no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios del objeto de la presente descripción (a menudo esquemáticamente). En las figuras, los números de referencia similares designan partes correspondientes a lo largo de las diferentes vistas. Puede obtenerse una mayor comprensión del objeto de la presente descripción con referencia a las realizaciones expuestas en las ilustraciones de los dibujos adjuntos. Aunque las realizaciones ilustradas son meramente ejemplos de sistemas para llevar a cabo el objeto de la descripción, tanto la organización como el procedimiento de operación del objeto de la descripción, en general, junto con otros objetivos y ventajas de los mismos, puede entenderse más fácilmente con referencia a los dibujos y la siguiente descripción. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de este objeto de la descripción, que se establece con particularidad en las reivindicaciones, sino simplemente aclarar y exemplificar el objeto de la descripción.

Para una comprensión más completa del objeto de la presente descripción, ahora se hace referencia a los siguientes dibujos en los que:

Las Figuras 1A-1I ilustran las estructuras químicas de los Compuestos 1-9 (Figura 1A, Compuesto 1; Figura 1B, Compuesto 2; Figura 1C, Compuesto 3; Figura 1D, Compuesto 4; Figura 1E, Compuesto 5; Figura 1F, Compuesto 6; Figura 1G, Compuesto 7, Figura 1H, Compuesto 8, Figura 1I, Compuesto 9);

la figura 2 es una ilustración esquemática de la síntesis de los Compuestos 1 y 6;

la figura 3 es una ilustración esquemática de la síntesis de LMWH sintéticas. En algunos aspectos, la síntesis puede iniciarse a partir de un hexasacárido (Compuesto 6), que puede convertirse en un octasacárido (Compuesto 7), decasacárido (Compuesto 8) y dodecasacárido (Compuesto 9) para sintetizar los Compuestos 2, 3 y 4, respectivamente. La conversión del Compuesto 4 a 5 puede lograrse mediante la modificación con 3-OST-5;

las Figuras 4A-4D son representaciones gráficas de los datos para la determinación de la eliminación, la actividad anti-FXa y la sensibilidad a la neutralización por protamina de las LMWH sintéticas. La Figura 4A es un histograma del porcentaje de LMWH sintéticas marcadas con ³⁵S que se retuvieron en el hígado en un modelo de ratón. En comparación con el compuesto 1, todos los compuestos probados, con la excepción del compuesto 2 y la enoxaparina, mostraron una retención significativamente mayor en el hígado (****P < 0,0001). La figura 4B representa la actividad FXa de las LMWH sintéticas en presencia de diferentes concentraciones de protamina en condiciones *in vitro*. La

Figura 4C es un histograma de la reversibilidad *ex vivo* de la actividad anti-FXa por protamina. La inhibición de la actividad de FXa por los compuestos de prueba se vio significativamente afectada en presencia de protamina (*P < 0,05 y ****P < 0,0001). Los datos presentados en las Figuras 4A-4C son el promedio de tres a cinco determinaciones ± d. e. La Figura 4D representa el efecto del Compuesto 5 y la protamina en el tiempo de sangrado de la cola después del corte transversal de la cola. La protamina acortó significativamente el tiempo de sangrado primario (**P < 0,01) que se indujo por el compuesto 5. Cada punto de tiempo representa el valor medido de un ratón individual en el grupo de prueba;

la Figura 5 es un histograma de endocitosis de LMWH sintéticas marcadas con ^{35}S en células Flp-In-293. Las células se transfectaron de forma estable con el plásmido que expresa el receptor estabilina-2 (190-HARE). El valor de internalización se calculó restando el valor base de internalización no específica de la internalización total de un Compuesto marcado con ^{35}S . El valor base se determinó mezclando el Compuesto marcado con ^{35}S con un exceso molecular de al menos 100 veces de UHF no marcado. Todos los compuestos ensayados, en comparación con el Compuesto 1, tienen una tendencia significativamente mayor a la endocitosis ($**** = p < 0,0001$); la Figura 6 es un diagrama de líneas de la actividad anti-Xa de los Compuestos 1-5, enoxaparina y UFH.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, una fórmula química o un nombre determinados abarcarán todos los isómeros ópticos y estereoisómeros, así como las mezclas racémicas cuando existan tales isómeros y mezclas.

I. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc., utilizados en la memoria descriptiva del objeto de la presente descripción, deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible, tal como una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, temperatura, presión, concentración o porcentaje, pretende abarcar variaciones de en algunas realizaciones $\pm 20\%$, en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0,5\%$ y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos descritos. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva del objeto de la presente descripción son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas buscadas por el objeto de la presente descripción.

Tal como se usa en el presente documento, el término "y/o" cuando se usa en el contexto de una lista de entidades, se refiere a las entidades que están presentes individualmente o en combinación. Así, por ejemplo, la frase "A, B, C y/o D" incluye A, B, C y D individualmente, pero también incluye todas y cada una de las combinaciones y subcombinaciones de A, B, C y D.

El término "comprende", que es sinónimo de "incluye", "contiene" o "caracterizado por" es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas de procedimiento adicionales no enumerados. "Que comprende" es un término de la técnica utilizado en el lenguaje de las reivindicaciones que significa que los elementos mencionados están presentes, pero se pueden agregar otros elementos y seguir formando un Compuesto o procedimiento dentro del alcance de la reivindicación.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. Cuando la frase "consiste en" aparece en una cláusula del cuerpo de una reivindicación, en lugar de seguir inmediatamente al preámbulo, limita solo el elemento establecido en esa cláusula; otros elementos no están excluidos de la reivindicación en su conjunto.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados, más aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas del objeto reivindicado.

Con respecto a los términos "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en", donde uno de estos tres términos se usa en el presente documento, el objeto de la presente descripción y reivindicado puede incluir el uso de cualquiera de los otros dos términos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "heparinas", "compuesto de heparina", "HS", "compuesto similar a HS" y "molécula similar a HS" pretenden referirse a polisacáridos sulfatados sintéticamente que poseen una o más propiedades estructurales y/o funcionales de sulfatos de heparán.

II. Abreviaturas

HS	sulfato de heparán
LMWH	heparina de bajo peso molecular
NST	N-sulfotransferasa
PmHS2	heparosana sintasa 2 de <i>Pasteurella multocida</i>
KfIA	N-acetilglucosaminil transferasa de cepa K5 de <i>E. coli</i>
C ₅ -epi	glucuronil C ₅ -epimerasa
2-OST	2-O-sulfotransferasa
6-OST	isoforma 1 e isoforma 3 de 6-O-sulfotransferasa

3-OST-1	isoforma 1 de 3-O-sulfotransferasa
3-OST-5	isoforma 5 de 3-O-sulfotransferasa
NTFA	N-trifluoroacetilo
GlcNTFA	glucosamina N-trifluoroacetilada
5 GlcA	ácido glucurónico
IdoA2S	Ácido idurónico 2-O-sulfatado
GlcNS	N-sulfoglucosamina
GlcNAc	Glucosamina N-acetilada
UFH	Heparina no fraccionada

10

III Consideraciones Generales

15

Los sulfatos de heparán (HS) son polisacáridos altamente sulfatados presentes en la superficie de las células de mamíferos y en la matriz extracelular en grandes cantidades. El HS es un polisacárido altamente cargado que comprende unidades de glucosamina con enlaces 1 → 4 y ácido glucurónico/idurónico que contienen grupos N- y O-sulfo. La heparina, una forma especializada de HS, es un fármaco anticoagulante de uso común. Por lo tanto, "sulfato de heparán", tal como se usa en el presente documento, incluye heparina.

20

La heparina es un polisacárido que comprende una unidad de repetición de disacáridos de ácido idurónico (IdoA) o ácido glucurónico (GlcA) y residuos de glucosamina, cada uno capaz de transportar grupos sulfo. Las ubicaciones de los grupos sulfo, IdoA y GlcA dictan la actividad anticoagulante de la heparina. *In vivo*, la heparina es sintetizada por una serie de enzimas biosintéticas de sulfato de heparán (HS) (Figura 2). La HS polimerasa cataliza la formación del esqueleto de polisacárido, un disacárido repetitivo de GlcA y glucosamina N-acetilada (GlcNAc). Este esqueleto es entonces modificado por N-desacetilasa/N-sulfotransferasa (NDST), C₅-epimerasa (C₅-epi), 2-O-sulfotransferasa (2-OST), 6-O-sulfotransferasa (6-OST) y 3-O-sulfotransferasa (3-OST). La disponibilidad de formas recombinantes de enzimas biosintéticas de HS ofrece una nueva estrategia para preparar polisacáridos y oligosacáridos de heparina. Tradicionalmente, los oligosacáridos de heparina se han sintetizado químicamente a través de rutas largas. Aunque se han descrito varias estrategias sintéticas, la síntesis química de oligosacáridos de heparina es extremadamente desafiante, especialmente para oligosacáridos más grandes que los octasacáridos que tienen un alto contenido de grupos sulfo. Los procedimientos quimioenzimáticos han simplificado significativamente la síntesis, ofreciendo un enfoque práctico para preparar LMWH sintéticas.

30

Las heparinas desempeñan papeles en una variedad de procesos biológicos importantes, que incluyen ayudar a la infección viral, regular la coagulación sanguínea y el desarrollo embrionario, suprimir el crecimiento tumoral y controlar el comportamiento alimentario de los sujetos de prueba al interactuar con proteínas reguladoras específicas (Liu, J., y Thorp, SC (2002) Med. Res. Rev. 22:1-25; Rosenberg, RD, et al., (1997) J. Clin. Invest. 99:2062-2070; Bernfield, M., et al., (1999) Annu. Rev. Biochem. 68:729-777; Alexander, CM, et al., (2000) Nat. Genet. 25:329-332; Reizes, O., et al., (2001) Cell 106:105-116). Las secuencias únicas de sacáridos sulfatados pueden determinar a qué proteínas específicas se unen las heparinas, regulando así los procesos biológicos.

40

La biosíntesis de heparina tiene lugar en el aparato de Golgi. Puede sintetizarse inicialmente como un copolímero de ácido glucurónico y glucosamina N-acetilada por las D-glucuronil y N-acetyl-D-glucosaminiltransferasa, seguido de varias modificaciones (Lindahl, U., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273:24979-24982). Estas modificaciones pueden incluir la N-desacetilación y N-sulfatación de glucosamina, la epimerización C₅ de ácido glucurónico para formar residuos de ácido idurónico, la 2-O-sulfatación de ácido idurónico y glucurónico, así como 6-O-sulfatación y 3-O-sulfatación de glucosamina. Se han clonado y caracterizado varias enzimas que son responsables de la biosíntesis de HS (Esko, JD y Lindahl, U. (2001) J. Clin. Invest. 108:169-173).

50

Los niveles de expresión de varias isoformas de enzimas biosintéticas de HS contribuyen a la síntesis de secuencias específicas de sacáridos en tejidos específicos. N-desacetilasa/N-sulfotransferasa, 3-O-sulfotransferasa y 6-O-sulfotransferasa de HS están presentes en múltiples isoformas. Se cree que cada isoforma reconoce una secuencia de sacárido alrededor del sitio de modificación para generar una secuencia de sacárido sulfatado específica (Liu, J., et al., (1999) J. Biol. Chem. 274:5185-5192; Aikawa, J .-I., et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:5876-5882; Habuchi, H., et al., (2000) J. Biol. Chem. 275:2859-2868). Por ejemplo, las isoformas de D-glucosaminil 3-O-sulfotransferasa (3-OST) de HS generan residuos de glucosamina 3-O-sulfatados que están unidos a diferentes residuos de ácido idurónico sulfatado. La isoforma 1 de 3-OST (3-OST-1) transfiere el sulfato a la posición 3-OH de un residuo de glucosamina N-sulfatada que está unido a un residuo de ácido glucurónico en el extremo no reductor (GlcUA-GlcNS±6S). Sin embargo, la isoforma 3 de 3-OST (3-OST-3) transfiere el sulfato a la posición 3-OH de un residuo de glucosamina no sustituido en N que está unido a un ácido idurónico 2-O-sulfatado en el extremo no reductor (IdoUA2S-GlcNH₂ ± 6S) (Liu, J. et al., (1999) J. Biol. Chem. 274:38155 - 38162). La diferencia en la especificidad de sustrato de los 3-OST da como resultado distintas funciones biológicas. Por ejemplo, el HS modificado por 3-OST-1 se une a la antitrombina (AT) y posee actividad anticoagulante (Liu, J., et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:27072-27082). Sin embargo, el HS modificado por 3-OST-3 (3-OST-3A y 3-OST-3B) se une a la glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple, tipo 1 (VHS-1), mediando así la entrada viral (Shukla, D., et al., (1999) Cell 99:13-22).

65

El HS de la superficie celular también ayuda a la infección por VHS-1 (WuDunn, D. y Spear, PG (1989) J. Virol. 63:52-58). Un informe (Shukla, D., et al., (1999) Cell 99:13-22) sugiere que un HS sulfatado en 3-O específico está implicado en ayudar a la entrada de VHS-1. El HS 3-O-sulfatado es generado por 3-OST-3, pero no por 3-OST-1. Además, el HS 3-O-sulfatado proporciona sitios de unión para la glicoproteína D de la cubierta del VHS-1, que es una proteína viral clave involucrada en la entrada del VHS-1 (Shukla, D., et al., (1999) Cell 99:13-22). Debido a que el HS modificado por 3-OST-3 rara vez se encuentra en el HS de fuentes naturales, el estudio sugiere que el VHS-1 reconoce una estructura de sacárido única. De hecho, el resultado de la caracterización estructural de un octasacárido de unión a gD reveló que el octasacárido posee una secuencia de sacárido específica (Liu, J., et al., (2002) J. Biol. Chem. 277:33456-33467). Además, la afinidad de unión del HS 3-O-sulfatado por gD es de aproximadamente 2 μ M (Shukla, D., et al., Cell 99:13-22). Esta afinidad es similar a la notificada para la unión de gD a los receptores de proteína, lo que sugiere que VHS-1 utiliza receptores de proteína y de la superficie celular de HS para infectar células diana (Willis, SH, et al., (1998) J. Virol. 72:5938-5947; Krummenacher, C. et al., (1999) J. Virol. 73:8127-8137). Se cree que la interacción entre gD y los receptores de entrada de la proteína 3-O-sulfatada desencadena de alguna manera la fusión entre el virus y la célula en presencia de otras proteínas de la cubierta viral, incluidas gB, gH y gL (Shukla, D., y Spear, PG (2001) J. Clin. Invest. 108:503-510). Un estudio de la estructura del cocristal de gD y el receptor de entrada del herpes HveA sugiere que la unión de HveA a gD induce cambios conformatacionales en gD (Carfi, A., et al. (2001) Mol. Cell 8: 169-179).

Los mecanismos de anticoagulación regulados por HS se han estudiado ampliamente. Ahora se sabe que el HS, incluida la heparina, interactúa con AT, un inhibidor de la serina proteasa, para inhibir las actividades de la trombina y el factor Xa en la cascada de la coagulación sanguínea (Rosenberg, RD, et al., (1997) J. Clin. Invest 99:2062-2070). El HS con actividad anticoagulante (HS^{act}) y la heparina contienen uno o varios sitios de unión a AT por cadena de polisacárido. Este sitio de unión contiene una secuencia de pentasacárido específica con una estructura de -GlcNS(o Ac)6S-GlcUA-GlcNS3S(\pm 6S)-IdoUA2S-GlcNS6S-. La 3-O-sulfatación de la glucosamina para generar el residuo GlcNS3S(\pm 6S), que es llevada a cabo por 3-OST-1, juega un papel en la síntesis de HS^{act} (Liu, J., et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:27072-27082; Shworak, NW, et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:28008-28019).

IV. Compuestos de heparina

De acuerdo con algunas realizaciones, los compuestos de heparina del objeto de la descripción pueden tener una fuerte afinidad de unión por AT. Puede emplearse cualquier enfoque adecuado para determinar la afinidad de unión, tal como entendería un experto en la materia al revisar la presente descripción.

En algunas realizaciones, la actividad anticoagulante puede medirse determinando las actividades anti-Xa y anti-IIa. En algunas realizaciones, las actividades anti-Xa y anti-IIa pueden determinarse en presencia de antitrombina. Los compuestos de heparina con una fuerte afinidad de unión por AT y/o una alta actividad anticoagulante pueden tener altas actividades anti-Xa y anti-IIa. Como entendería un experto en la materia, los valores de IC_{50} son relativos a las condiciones en las que se toman las medidas. Como tal, los valores de IC_{50} expresados en este documento son relativos a las condiciones en las que se tomaron las medidas y, por lo tanto, pueden ajustarse en consecuencia como entendería un experto en la materia. Puede emplearse cualquier enfoque adecuado para determinar la actividad anticoagulante, tal como entendería un experto en la materia tras la revisión de la presente descripción.

En algunas realizaciones, los compuestos de heparina descritos pueden tener una actividad anticoagulante que es reversible en presencia de un agente de inversión, tal como, por ejemplo, protamina. En algunas realizaciones, un compuesto de heparina puede tener una actividad anticoagulante que es completamente reversible, sustancialmente completamente reversible o al menos parcialmente reversible por la protamina. En algunas realizaciones, un compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante que es reversible a una velocidad del 50 % o más en presencia de 20 ug/ml o menos de protamina es parcialmente reversible. En algunas realizaciones, un compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante que es reversible a una tasa del 50 % o más en presencia de 100 ug/ml o menos, 50 ug/ml o menos, 30 ug/ml o menos, 20 ug/ml o menos, 15 ug/ml o menos, 10 ug/ml o menos, 5 ug/ml o menos, o 1ug/ml o menos de protamina es parcialmente reversible. En algunas realizaciones, se considera que un compuesto de heparina de la presente descripción tiene una actividad anticoagulante reversible si la actividad anticoagulante del compuesto de heparina es reversible a una tasa similar a la de la heparina no fraccionada, tal como entendería un experto en la materia tras una revisión de la presente divulgación.

Una ventaja clínica importante de los compuestos de heparina descritos es su capacidad para eliminarse de la circulación a través del hígado, lo que permite que estos agentes se usen en pacientes con insuficiencia renal. La heparina no fraccionada (UFH) y los compuestos de heparina de cadena más grande pueden unirse a la estabilina-2, un receptor depurador presente en las células endoteliales sinusoidales del hígado que media su eliminación. En algunas realizaciones, los compuestos de heparina descritos mostraron una endocitosis significativa mediada por estabilina-2 según se midió en un ensayo basado en células.

Como demostraron Pempe et al., 2012, los compuestos de heparina con una sulfatación 3-O pueden absorberse y eliminarse de manera más eficiente en el hígado. Véase también Yu et al, 2014. De acuerdo con algunos aspectos del objeto de la presente descripción, el patrón de sulfatación de los compuestos de heparina de la presente descripción puede afectar a la eliminación de dichos compuestos a través del hígado. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un

compuesto de heparina sintética de bajo peso molecular susceptible de eliminación de la circulación mediada por el hígado comprende una sulfatación en 3-O. En algunos aspectos, los compuestos de heparina descritos en el presente documento que son dodecámeros o más largos con una sulfatación en 3-O pueden tener dicha eliminación hepática mejorada. En algunas realizaciones, se proporciona un patrón de sulfatación, tal como un patrón de sulfatación 3-O, en un compuesto de heparina sintético de bajo peso molecular, tal como un dodecámero o un oligosacárido sintético más grande, que cumple con los requisitos de una eliminación rápida por el hígado.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los compuestos de heparina del objeto de la presente descripción pueden ser susceptibles a la endocitosis mediada por estabilina-2, en donde un compuesto de heparina que experimenta endocitosis a una tasa del 15 % o más es susceptible a la endocitosis mediada por estabilina-2. En algunas realizaciones, un compuesto de heparina que se experimenta endocitosis a una tasa del 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 75 %, 90 % o más es susceptible a la endocitosis mediada por estabilina-2. Por lo tanto, en algunos aspectos se proporcionan compuestos de heparina sintéticos de bajo peso molecular susceptibles de eliminación de la circulación mediada por el hígado. En algunas realizaciones, los compuestos de heparina pueden ser susceptibles a la endocitosis mediada por estabilina-2 a una tasa del 15 % o más. Debido a estas características, en algunos aspectos, los compuestos de heparina descritos pueden ser adecuados para la administración a pacientes con insuficiencia renal. En algunos aspectos, dichos compuestos de heparina que son susceptibles a la eliminación de la circulación mediada por el hígado comprende un patrón de sulfatación, tal como un patrón de sulfatación en 3-O, tal como al menos uno 3-O sulfato, y en algunos aspectos puede ser un dodecámero.

Se pueden sintetizar cinco LMWH homogéneas (Compuestos **1-5**, Figuras 1A-1E, respectivamente), que van desde hexasacárido a dodecasacárido. Las estructuras de los Compuestos **1-4** difieren en sus extremos reductores, conteniendo un número diferente de unidades de repetición -IdoA2S-GlcNS6S-. El dodecasacárido **5** se diferencia del **4** en que tiene dos grupos 3-O-sulfo (Figura 1D y 1E). La síntesis del Compuesto **1** puede iniciarse a partir de un monosacárido comercialmente disponible, 1-O-(para-nitrofenil) glucurónido (GlcA-pnp) (Figura 2). El alargamiento de GlcA-pnp a un hexasacárido se puede lograr utilizando dos glicosiltransferasas bacterianas: KfiA (N-acetilglucosaminil transferasa de la cepa K5 de *E. coli*) y la heparasan sintasa 2 (pmHS2) de *Pasteurella multocida*. Las etapas posteriores de N-sulfatación, O-sulfatación y epimerización permitieron preparar el Compuesto **1**. El enfoque también puede permitir la síntesis del heasacárido **6**, un intermedio para la síntesis posterior.

La síntesis de los Compuestos **2, 3 y 4** puede iniciarse a partir del hexasacárido **6** a través de los intermedios **7, 8 y 9**, respectivamente (Figura 3). Estos intermedios contienen múltiples unidades de repetición -IdoA2S-GlcNS6S-, lo que plantea un desafío sintético debido a la especificidad de sustrato de C₅-epi²⁵.

La Figura 3 es una ilustración esquemática de la síntesis de LMWH sintéticas y, en particular, de la síntesis de los Compuestos **2 a 5**. La síntesis se puede iniciar a partir de un hexasacárido **6**. El hexasacárido se puede convertir en un octasacárido (**7**), decasacárido (**8**) y dodecasacárido (**9**) para sintetizar los Compuestos **2, 3 y 4**, respectivamente. La conversión de los Compuestos **4 a 5** se puede lograr mediante la modificación 3-OST-5.

La síntesis de intermedios, incluidos los Compuestos **7, 8 y 9**, puede seguir este esquema para evitar producir mezclas de productos. Cuando se forman mezclas, la eficiencia sintética disminuirá drásticamente. Debido a que hay muchas etapas involucradas en la síntesis, solo se presentan símbolos para representar la síntesis. Las estructuras químicas de los Compuestos **1-9** se muestran en las Figuras 1A-1I, respectivamente.

Se puede emplear una secuencia cuidadosamente diseñada de etapas enzimáticas para una alta pureza y altos rendimientos. La conversión de GlcA a IdoA2S implica dos etapas: la epimerización catalizada por C₅-epi de un GlcA en un IdoA y 2-OST transfirió un grupo sulfo al residuo IdoA. C₅-epi cataliza las reacciones directa e inversa, lo que lleva a la conversión incompleta de GlcA en IdoA2S²⁶ y una mezcla compleja de productos²⁷. La colocación de un dominio de pentasacárido, GlcN-trifluoroacetil(TFA)-GlcA-GlcNS-GlcA-GlcNS-, en el sustrato, hace que C₅-epi reaccione irreversiblemente solo con un residuo de GlcA (que se muestra en negrita) y evita una conversión incompleta.

La conversión del Compuesto **6** a **7**, que implica el compuesto del dominio de pentasacárido reconocido por C₅-epi, puede completarse en cuatro etapas. El residuo GlcNTFA (Residuo F) del hexasacárido **6** puede convertirse primero en un residuo GlcNS (Etapa a, Figura 3B). A continuación, el hexasacárido puede alargarse a un octasacárido en dos etapas enzimáticas (etapas b y c, Figura 3B), para obtener el dominio de pentasacárido deseado, tal como se muestra en el cuadro discontinuo (Figura 3B). La conversión de GlcA (Residuo E) a IdoA2S para producir **7** puede lograrse a continuación mediante C₅-epi y 2-OST (etapa d, Figura 3B). La formación del residuo de IdoA2S puede eliminar su reactividad hacia más modificación por C₅-epi. Repitiendo estas etapas (etapas a a d, Figura 3B) una o dos veces se puede obtener **8** y **9**, respectivamente.

En algunas realizaciones, los productos de las reacciones descritas e ilustradas pueden contener una etiqueta pnp con una fuerte absorbancia a 310 nm, lo que facilita el análisis de pureza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las estructuras se determinaron mediante espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS), análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) unidimensional (1D) y bidimensional (2D). El análisis por HPLC de dietilaminoetilo (DEAE) demuestra que **5** es de alta pureza, la MS proporciona una masa

observada de 3562,8755, muy cercana a la masa exacta calculada de 3562,9087 y la distribución isotópica observada para $C_{80}H_{121}N_7O_{115}S_{17}$ coincide con la distribución simulada. El espectro 1H -RMN de **5** representa la presencia de 12 protones anoméricos. Los análisis RMN 1-D y RMN 2-D adicionales confirmaron los enlaces glucosídicos correctos y condujeron a la asignación espectral de **5**. El análisis de secuencia asistido por MS identificó los residuos que portaban grupos 3-O-sulfo.

Una ventaja clínica importante de UFH y algunas cadenas de LMWH es su capacidad para eliminarse de la circulación a través del hígado, lo que permite que estos agentes se usen en pacientes con insuficiencia renal. Se examinaron las LMWH sintéticas para determinar si mostraban perfiles de eliminación similares. Se sabe que UFH y las cadenas más grandes de LMWH se unen a la estabilina-2, un receptor depurador presente en las células endoteliales sinusoidales del hígado que interviene en su eliminación. Al igual que UFH y LOVENOX®, los Compuestos **3, 4 y 5** mostraron una endocitosis significativa mediada por estabilina-2 medida en un ensayo basado en células, mientras que los Compuestos **1 y 2** mostraron una internalización muy baja (Figura 5). Utilizando un modelo de ratón, se comparó la retención de LMWH homogéneas sintetizadas en el hígado con la de UFH y LOVENOX® (Figura 4A). Los compuestos de mayor tamaño (Compuestos **3, 4 y 5**) se retuvieron en el hígado, mientras que los Compuestos de menor tamaño (Compuestos **1 y 2**) mostraron un nivel muy bajo de retención en el hígado (Figura 5).

También se determinó la actividad anticoagulante de las LMWH sintéticas. Todos los compuestos (**1-5**) mostraron una fuerte afinidad de unión a antitrombina (AT) (K_d 5-30 nM) (Tabla 1). Los resultados de los ensayos de actividad anti-Xa mostraron valores IC_{50} más bajos para los Compuestos **1-5** que UFH y LOVENOX®, lo que confirma su potente actividad anti-Xa (Figura 6 y Tabla 1). A diferencia de UFH y LOVENOX®, las LMWH sintéticas no tienen actividad anti-IIa detectable y, por lo tanto, estos compuestos son inhibidores específicos de Xa. La Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó recientemente una LMWH de "segunda generación", Bemiparina. La bemiparina tiene una actividad anti-IIa significativamente menor que otros fármacos de LMWH, pero tiene una utilidad clínica muy similar, lo que sugiere que la actividad anti-IIa de las LMWH es menos crítica.

A continuación, se determinó la reversibilidad de la actividad anticoagulante por protamina. Se comparó la reversibilidad de la protamina *in vitro* de cinco LMWH sintéticas (Figura 4B). A diferencia de los Compuestos **1, 2 y 3**, el Compuesto **4** fue parcialmente revertido por la protamina. Además, el Compuesto **5** mostró la misma reversibilidad por protamina que la UFH y una mayor reversibilidad que LOVENOX® (Figura 4B). Utilizando un modelo de ratón *ex vivo*, se confirmó que el Compuesto **5** tiene una sensibilidad similar a la neutralización por protamina que la UFH; tal como se esperaba, solo se observó neutralización parcial por protamina para LOVENOX® (Figura 4C). Finalmente, utilizando un modelo de sangrado de cola de ratón, se demostró que la protamina acortó el tiempo de sangrado primario y redujo la pérdida de sangre inducida por el Compuesto 5 (Figura 4D), lo que confirma la sensibilidad del Compuesto **5** a la neutralización por protamina *in vivo*.

De manera resumida, las Figuras 4A-4D ilustran que los Compuestos **3, 4 y 5** se internalizan en el hígado de ratones, y que la actividad anti-Xa del Compuesto **5** puede revertirse por la protamina en un experimento *in vitro*, mientras que la actividad anti-Xa de otros compuestos, incluida la enoxaparina (nombre comercial LOVENOX), no es reversible por la protamina. La UFH y el Compuesto **5** tienen una sensibilidad similar a la neutralización por protamina. La actividad anti-Xa del Compuesto 5 es reversible en un experimento *ex vivo*. La enoxaparina es solo parcialmente reversible, pero la UFH es totalmente reversible. Y la actividad anti-Xa del Compuesto 5 puede revertirse en un experimento *in vivo*.

La heparina y las LMWH son fundamentales para la práctica de la medicina moderna, pero su producción aún depende de una larga cadena de suministro, que es vulnerable a la contaminación y la adulteración. Después de la crisis de contaminación por heparina, la FDA de EE. UU. y la EMA han implementado una serie de nuevos enfoques para controlar la pureza de los medicamentos con heparina. Aunque estos esfuerzos han detenido la entrada de heparina contaminada al mercado, una solución a largo plazo para garantizar la seguridad de la cadena de suministro de heparina debería ser fabricar heparina sintética bajo procesos altamente regulados, eliminando las necesidades de heparina de origen animal. La síntesis quimioenzimática ofrece un enfoque para este objetivo. La síntesis completa de LMWH homogéneas requiere aproximadamente 20 etapas sintéticas y es potencialmente susceptible de fabricación a gran escala. También demostramos que las LMWH sintéticas tienen beneficios farmacológicos/clínicos adicionales. La síntesis quimioenzimática de las LMWH proporciona vías para la próxima generación de tratamientos con heparina.

TABLA 1. Resumen de las LMWH sintetizadas

Compuesto	Cantidad (mg)	Pureza (%) ¹	Afinidad a antitrombina (K_d) ²	Actividad anti-Fa (IC_{50} , ng ml ⁻¹) ³
1	5	≥ 99	7 ± 2 nM	14
2	6	≥ 99	8 ± 3 nM	17
3	6	≥ 99	5 ± 1 nM	15
4	70	≥ 99	30 ± 7 nM	19
5	17	≥ 99	28 ± 16 nM	21
6	461	≥ 99 %	-- ⁴	--

7	344	≥ 95 %	--	--
8	263	≥ 99 %	--	--
9	183	≥ 99 %	--	--

1. La pureza se determinó mediante análisis DEAE-HPLC.
2. Los valores de K_d son el promedio de dos o tres determinaciones. El valor de K_d para fondaparinux se describió previamente que era $5,9 \pm 1,5$ (Xu, Y. et al. *Science* **334**, 498-501, 2011).
3. IC_{50} representa la concentración inhibitoria semimáxima para inhibir la actividad del factor F_a. El valor de IC_{50} para fondaparinux se describió previamente que era $4,5 \text{ ng ml}^{-1}$ (Xu, Y. et al. *Science* **334**, 498-501, 2011). El valor de IC_{50} inferior observado para fondaparinux se atribuye a los diferentes protocolos utilizados en los dos experimentos.
4. Los compuestos **6-9** no presentan unión a antitrombina y no inhiben la actividad de F_{Xa}.

V. Síntesis quimioenzimática de heparinas de ultra bajo peso molecular

- El objeto de la presente descripción proporciona enfoques enzimáticos para los compuestos de heparina, incluidos los compuestos de heparina de bajo peso molecular estructuralmente homogéneos. Los compuestos de heparina descritos en el presente documento se pueden sintetizar a partir de un bloque de construcción de monosacáridos utilizando un enfoque enzimático, tal como se describe en este documento.
- La síntesis de compuestos de heparina de acuerdo con el objeto de la presente descripción incluye el alargamiento del esqueleto y la modificación de sacáridos. En algunas realizaciones, el objeto de la presente descripción proporciona un procedimiento para sintetizar un compuesto de heparina según el primer aspecto descrito anteriormente. Se proporciona una secuencia de etapas enzimáticas para sintetizar un dodecasacárido, tal como se describe en este documento, de una manera altamente eficiente. La síntesis del compuesto de heparina se inicia a partir de un hexasacárido, tal como se muestra en el primer aspecto anterior, y continúa a través de varios intermedios hasta el compuesto de heparina final. Estos intermedios contienen múltiples unidades de repetición -IdoA2S-GlcNS6S-, lo que plantea un desafío sintético debido a la especificidad de sustrato de C₅-epi. Se puede emplear una secuencia diseñada de etapas enzimáticas para lograr una alta pureza y altos rendimientos. Particularmente, la conversión de GlcA a IdoA2S implica dos etapas: la epimerización catalizada por C₅-epi de un GlcA a un IdoA, y 2-OST transfirió un grupo sulfo al residuo IdoA. C₅-epi cataliza las reacciones directa e inversa, lo que conduce a la conversión incompleta de GlcA en IdoA2S²⁶ y a una mezcla compleja de productos. Tales reacciones pueden producir cantidades sustanciales de subproductos, lo que hace que el proceso sea altamente ineficiente. La colocación de un dominio de pentasacárido, GlcN-trifluoroacetil(TFA)-GlcA-GlcNS-GlcA-GlcNS-, en el sustrato, dirige C₅-epi para reaccionar irreversiblemente solo con un residuo de GlcA (mostrado en negrita) y reduce o evita la conversión incompleta.
- La conversión de GlcA en IdoA2S puede lograrse mediante C₅-epi y 2-OST. La formación de residuos de IdoA2S entre las etapas de alargamiento entre octasacárido, decasacárido y dodecasacárido elimina su reactividad hacia más modificación por C₅-epi. La repetición de estas etapas permite el alargamiento hasta un dodecasacárido y la síntesis de compuestos de heparina de bajo peso molecular descritos en este documento, mientras se mantiene una alta eficiencia de síntesis. Por ejemplo, utilizando el proceso sintético tal como se describe en el presente documento, los compuestos de heparina, por ejemplo, un dodecasacárido, como se describe en el presente documento, pueden alargarse a tasas de eficacia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. Esto contrasta con los enfoques alternativos en los que un compuesto de heparina se alarga hasta la longitud deseada, por ejemplo, un dodecasacárido, y a continuación se sulfata, lo que puede producir eficiencias significativamente más bajas, por ejemplo, del 2 % al 5 %.
- En algunas realizaciones, un compuesto de heparina del objeto de la descripción puede tener un grupo R que es detectable, por ejemplo, tiene absorbancia de luz visible o UV. Diseñar y sintetizar un compuesto de heparina que sea detectable, por ejemplo, que tenga un grupo R que absorba la luz UV o visible, puede facilitar la detección de la pureza y el aislamiento del producto. La combinación de un compuesto de heparina con una "etiqueta" de luz UV o visible puede facilitar el seguimiento de las reacciones quimioenzimáticas y la síntesis del compuesto. Tal como entendería un experto en la materia, la detección de una "etiqueta" de luz UV o visible en un compuesto durante o después de la síntesis se puede lograr utilizando cualquier número de dispositivos espectrofotométricos disponibles. En algunas realizaciones, la "etiqueta" puede comprender un paranitrofenilo.
- Como alternativa, o adicionalmente, en algunas realizaciones, el grupo R detectable puede ser un grupo R hidrofóbico. Tal como entendería un experto en la materia, un grupo R hidrofóbico puede permitir que el producto se una a una columna C18, lo que puede permitir la purificación de las heparinas sintetizadas.
- En algunas realizaciones, un grupo R, tal como un grupo R que tiene absorbancia de luz UV o visible, o un grupo R hidrofóbico, puede eliminarse cuando se completa la síntesis de la heparina. Tal como entendería un experto en la materia, la eliminación del grupo R una vez que se logra su utilidad puede facilitar el procesamiento final del compuesto de heparina. Por ejemplo, en algún aspecto podría ser deseable eliminar el grupo R para evitar que grupos funcionales tóxicos potenciales entren en un compuesto farmacológico de heparina.
- V.A. Enzimas empleadas en la síntesis quimioenzimática de compuestos de heparina

El objeto de la presente descripción utiliza sulfotransferasas, epimerasas, glicosiltransferasas y heparosan sintetasas . Estas enzimas se denominan en el presente documento como "las enzimas", "estas enzimas" y/o "enzimas". En algunas realizaciones, las síntesis quimioenzimáticas pueden emplear NST, C₅-epimerasa (C₅-epi), 2-OST, 6-OST-1, 6-OST-3, 3-OST-1, 3-OST-5, N-acetil glucosaminil transferasa de *E. coli* K5 (KfiA), y/o heparosan sintasa-2 (pmHS2). En algunas realizaciones, estas y otras enzimas empleadas en las síntesis quimioenzimáticas pueden expresarse en *E. coli* y purificarse mediante cromatografía de afinidad apropiada, tal como se describió anteriormente (Liu et al., 2010).

5 Las reacciones de conversión emplean un compuesto base o una solución. Tales bases pueden incluir, por ejemplo, hidróxido de litio o una mezcla de trietilamina, CH₃OH y/o H₂O.

10 Las síntesis quimioenzimáticas emplean sulfotransferasas, tales como O-sulfotransferasas (OST), para sulfatar polisacáridos. Las sulfotransferasas comprenden una familia de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo sulfonato o sulfurilo (SO₃) desde un compuesto donador de sulfo, es decir, una molécula donadora de SO₃, a una molécula aceptora. El compuesto donador de sulfo o molécula donadora de SO₃ es el cofactor 3'-fosfoadenosina-5'-fosfatosulfato (PAPS). Aunque es más exacto llamar a estas reacciones de sulfonación, el término sulfatación todavía se usa ampliamente. Por lo tanto, el término "sulfatación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la transferencia de un grupo sulfonato o sulfurilo de una molécula a otra.

15 20 Las sulfotransferasas median la sulfatación de diferentes clases de sustratos, tales como carbohidratos, oligosacáridos, péptidos, proteínas, flavonoides y esteroides para una variedad de funciones biológicas, incluida la señalización y modulación de la unión al receptor (Bowman et al., (1999) Chem. Biol. 6, R9-R22 y Falany (1997) FASEB J. 11, 1-2). Se han identificado y clonado muchas sulfotransferasas nuevas (Aikawa et al., (1999) J. Biol. Chem. 274, 2690; Dooley (1998) Chemico-Biol. Interact. 109, 29; Fukuta et al. (1998) Biochim. Biophys. Act. 1399, 57; Habuchi et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 9208; Mazany et al., (1998) Biochim. Biophys. Act. 1407, 92; Nastuk et al. (1998) J. Neuroscience 18, 7167; Ong et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 5190; Ouyang et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 24770; Saeki et al. (1998) J. Biochem. 124, 55; Uchimura y otros (1998) J. Biol. química 273, 22577; y Yoshinari et al., (1998) J. Biochem. 123, 740).

25 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "O-sulfotransferasa (OST)" incluye polipéptidos y ácidos nucleicos que codifican HS O-sulfotransferasas, tales como por ejemplo "2-OST" (por ejemplo, 2-OST de ratón, GENBANK® Acceso N.º AAC40135; "3-OST-1" (por ejemplo, 3-OST-1 humana, GENBANK® Acceso N.º NP_005105; "3-OST-3" (por ejemplo, 3-OST-3A humano, GENBANK® Acceso N.º NP_006033 y 3-OST-3B humano, GENBANK® Acceso N.º NP_006032 y "6-OST" (por ejemplo, 6-OST-1 de ratón, GENBANK® Acceso N.º NP_056633, 6-OST-2 de ratón, GENBANK® Acceso N.º BAA89247 y 6-OST-3 de ratón, GENBANK® Acceso N.º NP_056635), que son HS 2-O-sulfotransferasa, HS 3-O-sulfotransferasa isoforma 1, HS 3-O-sulfotransferasa isoforma 3 y HS 6-O-sulfotransferasa, respectivamente. En algunas realizaciones, una OST puede comprender 3-OST-5.

35 40 El término "OST" incluye homólogos de invertebrados y vertebrados de las O-sulfotransferasas (por ejemplo, homólogos de mamíferos (tales como humanos y ratones), insectos y aves).

Las síntesis quimioenzimáticas descritas emplean C₅-epimerasa (C₅-epi).

45 50 En algunas realizaciones, las síntesis quimioenzimáticas descritas pueden emplear N-acetil glucosaminil transferasa de *E. coli* K5 (KfiA).

Las síntesis quimioenzimáticas descritas emplean heparosan sintasa-2 (pmHS2).

55 60 Los términos "producto génico de OST", "proteína de OST", "polipéptido de OST", "producto génico de la epimerasa", "proteína de la epimerasa", "polipéptido de la epimerasa", "producto génico de la glucosaminil transferasa", "proteína de la glucosaminil transferasa", "polipéptido de la glucosaminil transferasa", "producto génico de heparosan sintasa", "proteína de heparosan sintasa" y "polipéptido de heparosan sintasa" se refieren a péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas a las secuencias de aminoácidos nativos del organismo de interés y que son biológicamente activos porque comprenden la totalidad o una parte de la secuencia de aminoácidos de una O-sulfotransferasa, epimerasa , glucosaminil transferasa o heparosan sintasa, o reaccionan de forma cruzada con anticuerpos producidos contra tales enzimas, o retienen toda o parte de la actividad biológica de la secuencia de aminoácidos nativa o proteína de tales enzimas. Dicha actividad biológica puede incluir inmunogenicidad.

65 70 Los términos "producto génico de OST", "proteína de OST", "polipéptido de OST", "producto génico de la epimerasa", "proteína de la epimerasa", "polipéptido de la epimerasa", "producto génico de la glucosaminil transferasa", "proteína de la glucosaminil transferasa", "polipéptido de la glucosaminil transferasa", "producto génico de heparosan sintasa", "proteína de heparosan sintasa" y "polipéptido de heparosan sintasa" también incluyen análogos de las enzimas. Por "análogo" se entiende que una secuencia peptídica o de ADN puede contener alteraciones en relación con las secuencias descritas en el presente documento, pero conserva toda o parte de la actividad biológica de esas secuencias. Los análogos se pueden derivar de secuencias de nucleótidos genómicas, tal como se describe en este documento, o de otros organismos, o se pueden crear sintéticamente. No hay necesidad de un "producto génico de

- 5 OST", "proteína de OST", "polipéptido de OST", "producto génico de la epimerasa", "proteína de la epimerasa", "polipéptido de la epimerasa", "producto génico de la glucosaminil transferasa", "proteína de la glucosaminil transferasa", "polipéptido de glucosaminil transferasa", "producto génico de heparosan sintasa", "proteína de heparosan sintasa" y "polipéptido de heparosan sintasa" para comprender toda o sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de un producto génico de enzima nativa. Se anticipa que las secuencias más cortas o más largas serán de utilidad en el objeto de la presente invención, las secuencias más cortas se denominan en el presente documento "segmentos". De este modo, los términos "producto génico de OST", "proteína de OST", "polipéptido de OST", "producto génico de la epimerasa", "proteína de la epimerasa", "polipéptido de la epimerasa", "producto génico de la glucosaminil transferasa", "proteína de la glucosaminil transferasa", "polipéptido de glucosaminil transferasa", "producto génico de heparosan sintasa", "proteína de heparosan sintasa" y "polipéptido de heparosan sintasa" también incluyen polipéptidos y proteínas de fusión o recombinantes que comprenden secuencias de la proteína enzimática. Los procedimientos para preparar dichas proteínas son conocidos en la técnica.
- 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Los términos "producto génico de OST", "proteína OST", "polipéptido OST", "producto génico de la epimerasa", "proteína de la epimerasa", "polipéptido de la epimerasa", "producto génico de la glucosaminil transferasa", "proteína de la glucosaminil transferasa", "polipéptido de glucosaminil transferasa", "producto génico de la heparosan sintasa", "proteína de la heparosan sintasa" y "polipéptido de la heparosan sintasa" se refieren a cualquier secuencia de ADN que sea sustancialmente idéntica a una secuencia de polinucleótidos que codifica un producto génico de la isoforma de la enzima, una proteína o un polipéptido como se definen anteriormente, y también puede comprender cualquier combinación de secuencias de control asociadas. Los términos también se refieren a ARN, o secuencias antisentido, complementarias a dichas secuencias de ADN. Tal como se usa en este documento, el término "segmento de ADN" se refiere a una molécula de ADN que ha sido aislada libre de ADN genómico total de una especie en particular. Además, un segmento de ADN que codifica un polipéptido de una de estas enzimas se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias de codificación para una de estas enzimas, pero que se aísla o se purifica del ADN genómico total de una especie de origen, tal como para ejemplo *Homo sapiens*. Dentro del término "segmento de ADN" se incluyen segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, incluidos, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares.
- El término "sustancialmente idéntico", cuando se usa para definir un producto génico de una de estas enzimas o secuencia de aminoácidos, o un gen de enzima o secuencia de ácido nucleico, significa que una secuencia particular varía de la secuencia de una enzima natural en una o más delecciones, sustituciones o adiciones, cuyo efecto neto de las mismas es retener al menos parte de la actividad biológica del gen, producto génico o secuencia natural. Dichas secuencias incluyen secuencias "mutantes", o secuencias en las que la actividad biológica se altera hasta cierto punto, pero conserva al menos parte de la actividad biológica original.
- Alternativamente, las secuencias de análogos de ADN son "sustancialmente idénticas" a las secuencias de ADN específicas descritas en el presente documento si: (a) la secuencia de análogos de ADN se deriva de las regiones codificantes del gen de la enzima natural; o (b) la secuencia del análogo de ADN es capaz de hibridar secuencias de ADN de (a) en condiciones rigurosas y que codifican productos génicos de la enzima biológicamente activos; o (c) las secuencias de ADN están degeneradas como resultado de un código genético alternativo a las secuencias de análogos de ADN definidas en (a) y/o (b). Las proteínas análogas sustancialmente idénticas serán iguales o superiores a aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia correspondiente de la proteína nativa. Las secuencias que tienen menores grados de identidad, pero una actividad biológica comparable se consideran equivalentes. En la determinación de secuencias de ácidos nucleicos, todas las secuencias de ácidos nucleicos en cuestión capaces de codificar secuencias de aminoácidos sustancialmente similares se consideran que son sustancialmente similares a una secuencia de ácidos nucleicos de referencia, independientemente de las diferencias en las secuencias de codones o la sustitución de aminoácidos equivalentes para crear equivalentes biológicamente funcionales.
- La identidad de secuencia o el porcentaje de similitud de una secuencia peptídica o de ADN puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de la secuencia utilizando el programa informático GAP, disponible en el Grupo informático de genetistas de la Universidad de Wisconsin. El programa GAP utiliza el procedimiento de alineación de Needleman et al. (1970) J Mol Biol 48:443, revisado por Smith et al. (1981) Adv Appl Math 2:482. Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos (es decir, nucleótidos o aminoácidos) alineados que son similares, dividido por el número total de símbolos en la secuencia más corta de las dos. Los parámetros preferidos para el programa GAP son los parámetros predeterminados, que no imponen una penalización por los espacios finales. Véase Schwartz et al. (1979) Nuc Acids Res 6(2):745-755; Gribskov et al. (1986) Nuc Acids Res 14(1):327-334.
- Se describe, pero no se reivindica per se, que el presente objeto se refiere al uso de genes de enzimas y productos génicos que incluyen dentro de sus respectivas secuencias una secuencia que es esencialmente la de un gen de enzima, o la proteína correspondiente. Por ejemplo, el término "una secuencia esencialmente como la de un gen de OST", significa que la secuencia es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una parte de un gen de OST y contiene una minoría de bases o aminoácidos (ya sea ADN o proteína) que no son idénticos a los de una proteína OST o un gen de OST, o que no son un equivalente biológicamente funcional. Los términos "una secuencia esencialmente como la de un gen de la epimerasa", "una secuencia esencialmente como la de un gen de la glicosil

transferasa" y "una secuencia esencialmente como la de un gen de heparosan sintasa" tienen significados similares. El término "equivalente biológicamente funcional" se entiende bien en la técnica y se define con más detalle en el presente documento. Las secuencias de nucleótidos son "esencialmente las mismas" cuando tienen entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 85 % o más preferiblemente, entre aproximadamente el 86 % y aproximadamente el 90 %, o más preferiblemente superior al 90 %, o más preferiblemente entre aproximadamente el 91% y aproximadamente el 95%, o incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 96% y aproximadamente el 99%; de residuos de ácido nucleico que son idénticos a la secuencia de nucleótidos del gen de la enzima. De manera similar, las secuencias peptídicas que tienen aproximadamente 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, o preferiblemente de 90 a 95 %, o más preferiblemente más de 96 %, o más preferiblemente de 95 a 98 %, o lo más preferiblemente de 96 %, 97%, 98% o 99% de aminoácidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes o biológicamente funcionalmente equivalentes a los aminoácidos del polipéptido enzimático serán secuencias que son "esencialmente las mismas".

Los productos génicos y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes para las enzimas empleadas en los procedimientos descritos, que tienen codones funcionalmente equivalentes, también están cubiertos por el objeto de la presente descripción. El término "codón funcionalmente equivalente" se usa en el presente documento para referirse a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los codones ACG y AGU para serina. Los solicitantes contemplan la sustitución de codones funcionalmente equivalentes de la Tabla 1 en secuencias de las enzimas descritas en este documento como equivalentes.

20

TABLA 2 – Codones funcionalmente equivalentes

Aminoácidos		Codones
Alanina	Ala	A GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F UUC UUU
Glicina	Gly	G GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H CAC CAU
Isoleucina	Ile	I AUA AUC AUU
Lisina	Lys	K AAA AAG
Leucina	Leu	L UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M AUG
Asparagina	Asn	N AAC AAU
Prolina	Pro	P CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q CAA CAG
Arginina	Arg	R AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	ser	S ACG AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W UGG
Tirosina	Tyr	Y UAC UAU

25 Los expertos en la técnica también entenderán que las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos N- o C-terminales adicionales o secuencias de ácidos nucleicos 5' o 3', y aún estar abarcadas por las enzimas descritas en el presente documento, siempre que la secuencia conserve la actividad de la proteína biológica en lo que respecta a la expresión de la proteína. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir varias secuencias no codificantes que flanquean las partes 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir varias secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que aparecen dentro de los genes.

30 Se describe, pero no se reivindica per se, que el presente objeto también abarca el uso de segmentos de nucleótidos que son complementarios a las secuencias del presente objeto, segmentos que son totalmente complementarios, es decir, complementarios en toda su longitud. Las secuencias de ácido nucleico que son "complementarias" son aquellas 35 que están apareadas por bases según las reglas de complementariedad estándar de Watson-Crick. Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencias complementarias" significa secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente complementarias, tal como se puede evaluar mediante la misma comparación de nucleótidos establecida anteriormente, o se define como capaz de hibridarse con el segmento de ácido nucleico en cuestión en condiciones relativamente rigurosas, tales como las descritas en el presente documento. Un ejemplo particular de un 40 segmento de ácido nucleico complementario es un oligonucléotido antisentido.

45 Una técnica en el sector para evaluar secuencias complementarias y/o aislar secuencias de nucleótidos complementarias es la hibridación. La hibridación de ácidos nucleicos se verá afectada por condiciones, tales como la concentración de sal, la temperatura o los disolventes orgánicos, además de la composición de bases, la longitud de las cadenas complementarias y el número de desajustes de bases de nucleótidos entre los ácidos nucleicos que

hibridan, tal como se entenderá fácilmente por los expertos en la materia. Las condiciones de temperatura rigurosas generalmente incluirán temperaturas superiores a aproximadamente 30°C, típicamente superiores a aproximadamente 37°C, y preferiblemente superiores a aproximadamente 45°C. Las condiciones salinas rigurosas normalmente serán inferiores a aproximadamente 1.000 mM, típicamente inferiores a aproximadamente 500 mM y preferiblemente inferiores a aproximadamente 200 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medida de un solo parámetro. Véase, por ejemplo, Wethmar & Davidson (1968) *J Mol Biol* 31:349-370. La determinación de las condiciones de hibridación apropiadas para identificar y/o aislar secuencias que contienen altos niveles de homología es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Con el fin de especificar condiciones de alta rigurosidad, las condiciones preferidas son una concentración de sal de aproximadamente 200 mM y una temperatura de aproximadamente 45°C. Un ejemplo de dichas condiciones rigurosas es la hibridación a 4XSSC, a 65°C, seguida de un lavado en 0,1XSSC a 65°C durante una hora. Otro esquema de hibridación rigurosa de ejemplo usa formamida al 50%, 4XSSC a 42°C. Otro ejemplo de "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo, 6XSSC, polivinilpirrolidona al 0,2 %, Ficoll al 0,2 %, albúmina sérica bovina al 0,2 %, dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, ADN de esperma de salmón a 100 µg/ml y formamida al 15 % a 68°C. Los ácidos nucleicos que tienen similitud de secuencia se detectan por hibridación en condiciones de baja rigurosidad, por ejemplo, a 50 °C y 10XSSC (NaCl 0,9 M/citrato de sodio 0,09 M) y permanecen unidos cuando se someten a lavado a 55°C en 1XSSC. La identidad de la secuencia se puede determinar mediante hibridación en condiciones rigurosas, por ejemplo, a 50 °C o más y 0,1XSSC (NaCl 9 mM/citrato de sodio 0,9 mM).

Los ácidos nucleicos que son sustancialmente idénticos a las enzimas proporcionadas, por ejemplo, variantes alélicas, versiones genéticamente alteradas del gen, etc., se unen a las OST descritas en condiciones de hibridación rigurosas. Mediante el uso de sondas, particularmente sondas de secuencias de ADN marcadas, se pueden aislar genes homólogos o relacionados. La fuente de genes homólogos puede ser cualquier especie, por ejemplo, especies de primates, particularmente humanos; roedores, tales como ratas y ratones; caninos; felinos; bovinos; ovinos; equinos; insectos; levaduras; nematodos; etc.

Entre especies de mamíferos, por ejemplo, humanos, ratones y ratas, los homólogos tienen una similitud de secuencia sustancial, es decir, al menos un 75% de identidad de secuencia entre secuencias de nucleótidos. La similitud de secuencia se calcula en base a una secuencia de referencia, que puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, tal como un motivo conservado, una región codificante, una región flanqueante, etc. Una secuencia de referencia tendrá habitualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos de largo, más normalmente al menos aproximadamente 30 nucleótidos de largo, y puede extenderse a la secuencia completa que se está comparando. Los algoritmos para el análisis de secuencias son conocidos en la técnica, tal como BLAST, descrito en Altschul et al. (1990) *J Mol Biol* 215:403-410. Las secuencias proporcionadas en este documento son esenciales para reconocer proteínas relacionadas con enzimas y homólogas en búsquedas de bases de datos.

A nivel biológico, la identidad es sólo eso, es decir, el mismo aminoácido en la misma posición relativa en un miembro de una familia determinada de una familia de genes. La homología y la similitud generalmente se consideran términos más amplios. Por ejemplo, aminoácidos bioquímicamente similares, por ejemplo, leucina e isoleucina o glutamato/aspartato, pueden estar presentes en la misma posición; estos no son idénticos per se, pero son bioquímicamente "similares". Tal como se describe en el presente documento, estos se denominan diferencias conservadoras o sustituciones conservadoras. Esto difiere de una mutación conservadora a nivel de ADN, que cambia la secuencia de nucleótidos sin hacer un cambio en el aminoácido codificado, por ejemplo, TCC a TCA, los cuales codifican serina. Cuando se hace referencia a porcentajes en el presente documento, se entiende que se refiere a porcentaje de identidad. Las identidades en porcentaje referenciados en el presente documento se pueden generar mediante alineaciones con el programa GENWORKS™ (Oxford Molecular, Inc. de Campbell, California, EE. UU.) y/o el programa BLAST en el sitio web de NCBI. Otro programa de alineación de uso común se titula CLUSTAL W y se describe en Thompson et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-4680, entre otros lugares.

El término "gen" se usa por simplicidad para referirse a una unidad codificante de proteína, polipéptido o péptido funcional. Como entenderán los expertos en la técnica, este término funcional incluye tanto secuencias genómicas como secuencias de ADNc.

Como se indicó anteriormente, se pueden realizar modificaciones y cambios en la estructura de las proteínas y péptidos enzimáticos descritos en el presente documento y seguir constituyendo una molécula que tiene características similares o deseables. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin una pérdida apreciable de capacidad interactiva con, por ejemplo, estructuras en el núcleo de una célula. Dado que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, se pueden realizar ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína (o la secuencia de ácido nucleico que la codifica) para obtener una proteína con las mismas propiedades, mejoradas o antagónicas. Tales propiedades se pueden lograr mediante la interacción con las dianas normales de la proteína nativa, pero este no tiene por qué ser el caso, y la actividad biológica del objeto de la descripción no está limitada a un mecanismo de acción particular.

Alternativamente, se pueden crear proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en la que se pueden diseñar cambios en la estructura de la proteína, basándose en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se intercambian. Los cambios diseñados por el hombre pueden introducirse mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína o probar enzimas mutantes para examinar la actividad enzimática u otra actividad a nivel molecular.

Las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño y similares. Un análisis del tamaño, 5 la forma y el tipo de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos revela que la arginina, la lisina y la histidina son todos residuos cargados positivamente; que la alanina, la glicina y la serina son todas de tamaño similar; y que la fenilalanina, el triptófano y la tirosina tienen una forma generalmente similar. Por lo tanto, según estas consideraciones, 10 la arginina, la lisina y la histidina; la alanina, la glicina y la serina; y la fenilalanina, el triptófano y la tirosina; se definen aquí como equivalentes biológicamente funcionales. Los expertos en la materia entenderán otros cambios 15 biológicamente funcionalmente equivalentes.

Al realizar sustituciones de aminoácidos equivalentes biológicamente funcionales, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus 20 características de hidrofobicidad y carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); 25 tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína 25 generalmente se entiende en la técnica (Kyte et al. (1982) J Mol Biol 157:105, incorporado aquí como referencia). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y todavía conservan una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, se 30 prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén dentro de ± 2 del valor original, aquellos que estén dentro de ± 1 del valor original, son particularmente preferidos, y aquellos dentro de $\pm 0,5$ del valor original son aún más particularmente preferidos.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar de forma eficaz sobre 35 la base de la hidrofilicidad. La Patente de EE.UU. Nº 4.554.101, incorporada aquí como referencia, establece que la mayor hidrofilicidad local promedio de una proteína, determinada por la hidrofilicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína. Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofilicidad similar y todavía obtener una proteína biológicamente equivalente.

Tal como se detalla en la Patente de EE.UU. Nº 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilicidad a 40 los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

Al realizar cambios basados en valores de hidrofilicidad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos 45 valores de hidrofilicidad estén dentro de ± 2 del valor original, se prefieren particularmente aquellos que estén dentro de ± 1 del valor original, y son incluso más particularmente preferidos aquellos dentro de $\pm 0,5$ del valor original.

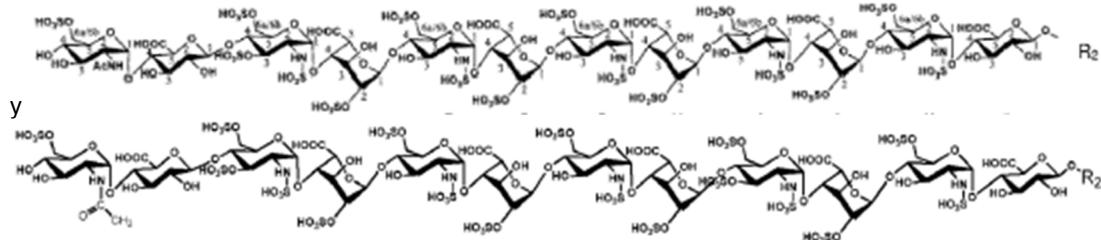
Aunque la descripción se ha centrado en polipéptidos funcionalmente equivalentes que surgen de cambios de 50 aminoácidos, se entenderá que estos cambios pueden efectuarse mediante la alteración del ADN codificador, teniendo en cuenta también que el código genético está degenerado y que dos o más codones pueden codificar el mismo aminoácido.

Se describe, pero no se reivindica per se, que los segmentos de ácido nucleico del presente objeto, 55 independientemente de la longitud de la propia secuencia de codificación, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, múltiples sitios de clonación, otros segmentos de codificación y similares, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando limitada la longitud total preferiblemente por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido. Por ejemplo, se pueden preparar fragmentos de ácido nucleico que incluyen un tramo corto complementario a una secuencia de ácido nucleico expuesta en cualquiera de las enzimas descritas en el presente documento, tales como aproximadamente 10 nucleótidos, y que son de hasta 10.000 o 5, 000 pares de bases de longitud, prefiriéndose segmentos de 3000 en ciertos casos. También se contemplan como útiles 60 segmentos de ADN con longitudes totales de aproximadamente 4.000, 3.000, 2.000, 1.000, 500, 200, 100 y 65 aproximadamente 50 pares de bases de longitud.

- Se describe, pero no se reivindica per se, que los vectores recombinantes forman aspectos adicionales del presente objeto. Los vectores particularmente útiles son aquellos en los que la parte codificante del segmento de ADN está posicionada bajo el control de un promotor. El promotor puede ser el asociado naturalmente con un gen de enzima, tal como se puede obtener aislando las secuencias no codificantes 5' ubicadas en dirección 5' del segmento codificante o exón, por ejemplo, utilizando tecnología de clonación recombinante y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/u otros procedimientos conocidos en la técnica, junto con las composiciones descritas en el presente documento.
- 5 Se describe, pero no se reivindica per se, que se obtendrán ciertas ventajas colocando el segmento de ADN codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo. Tal como se usa en el presente documento, un promotor recombinante o heterólogo es un promotor que normalmente no está asociado con un gen de enzima en su entorno natural. Dichos promotores pueden incluir promotores aislados de células bacterianas, virales, eucariotas o de mamíferos. Naturalmente, será importante emplear un promotor que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula elegido para la expresión. El uso de combinaciones de promotores y tipos de células para la expresión de proteínas es generalmente conocido por los expertos en la técnica de la biología molecular (ver, por ejemplo, Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Prensa, Puerto de Cold Spring, Nueva York). Los promotores empleados pueden ser constitutivos o inducibles y pueden usarse en las condiciones apropiadas para dirigir un alto nivel de expresión del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes.
- 10 20 En algunas realizaciones del procedimiento descrito en el presente documento para sulfatar polisacáridos, una enzima del objeto de la presente descripción (por ejemplo, sulfotransferasas, epimerasas, glicosiltransferasas y/o heprosan sintatas) puede inmovilizarse sobre un sustrato. Esto proporciona la ventaja de que el sustrato al que se unen las enzimas se puede lavar después de una reacción de sulfatación para eliminar todos los componentes de la reacción, excepto las enzimas unidas. Por tanto, los productos de la reacción se pueden separar más fácilmente de las enzimas que catalizan la reacción y las enzimas se pueden reciclar y utilizar de nuevo en múltiples reacciones de sulfatación. En algunas realizaciones, el sustrato es agarosa. En realizaciones particulares, el sustrato de agarosa es una partícula de agarosa y las enzimas están unidas a las partículas.
- 15 25 30 V.B. Reducción de los efectos inhibidores de la PAP
- 35 Los procedimientos de la presente descripción para sintetizar compuestos de heparina pueden comprender el uso de una enzima regeneradora de PAPS y un compuesto donador de sulfo. La enzima regeneradora de PAPS cataliza la regeneración de PAPS a partir de PAP utilizando el compuesto donador de sulfo como sustrato. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.255.088; y Burkart et al., (2000) J. Org. Chem. 65, 5565-5574, ambos incorporados aquí como referencia en su totalidad. Por lo tanto, el sistema de regeneración de PAPS proporciona la doble ventaja de reducir los efectos inhibidores de la acumulación de PAP sobre la actividad de la sulfotransferasa, mientras que también "recarga" constantemente la mezcla de reacción con la molécula donadora de sulfo primaria, PAPS. En algunas realizaciones, la enzima regeneradora de PAPS es una estrógeno sulfotransferasa.
- 40 45 50 55 60 65 Por lo tanto, un aspecto del objeto de la presente descripción se refiere a un proceso de regeneración de un compuesto donador de sulfo (por ejemplo, PAPS) acoplado con la sulfatación de un sustrato de polisacárido. En particular, el proceso puede ser de un tipo en el que la sulfatación de un sustrato de polisacárido es catalizada por una sulfotransferasa, tal como una o más OST, con una conversión de 3'-fosfoadenosina-5'-fosfatosulfato (PAPS) en adenosina 3',5'-difosfato (PAP). El proceso de sulfatación se puede acoplar con una regeneración enzimática del PAPS a partir de PAP. La regeneración enzimática puede emplear una arilsulfotransferasa como catalizador y un sulfato de arilo como sustrato. En algunas realizaciones, la regeneración enzimática puede comprender una estrógeno sulfotransferasa (EST) humana o de ratón. Como se describe en otra parte de este documento, los sustratos de carbohidratos preferidos pueden incluir GAG, tal como, por ejemplo, sulfatos de heparán, que incluyen heparina.
- 50 55 60 65 El acoplamiento de la reacción de sulfatación catalizada por sulfotransferasa con un sistema de regeneración de PAPS puede proporcionar la ventaja adicional de generar PAPS utilizado en la reacción directamente a partir de PAP. Es decir, la mezcla de reacción se puede formular para combinar PAP con una enzima regeneradora de PAPS antes o simultáneamente con la adición de una sulfotransferasa a la mezcla de reacción. La enzima regeneradora de PAPS puede entonces generar PAPS a partir del PAP para su uso por la sulfotransferasa, aliviando así la necesidad de suministrar cualquiera de los PAPS más caros e inestables a la mezcla de reacción. Por ejemplo, acoplar el sistema de regeneración de PAPS para usar PNPS como donador de sulfo puede reducir potencialmente el coste de la síntesis de polisacáridos sulfatados hasta 1000 veces. Por tanto, se describe un procedimiento para sulfatar un polisacárido que comprende proporcionar una mezcla de reacción que comprende en la misma adenosina 3',5'-difosfato (PAP), una enzima regeneradora de PAPS y un compuesto donador de sulfo (que no sea PAPS, por ejemplo, PNPS) e incubar la mezcla de reacción durante un período de tiempo suficiente para catalizar la producción de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS) a partir de PAP por la enzima regeneradora de PAPS que utiliza el compuesto donador de sulfo como sustrato. El procedimiento comprende además incubar un sustrato de polisacárido y al menos una enzima O-sulfotransferasa (OST) con la mezcla de reacción, en el que la producción de un polisacárido sulfatado a partir del sustrato de polisacárido es catalizada por la enzima OST con una conversión de PAPS a PAP y en el que la enzima regeneradora de PAPS cataliza entonces la regeneración de PAPS a partir de PAP, utilizando de nuevo el compuesto donante de sulfo como sustrato.

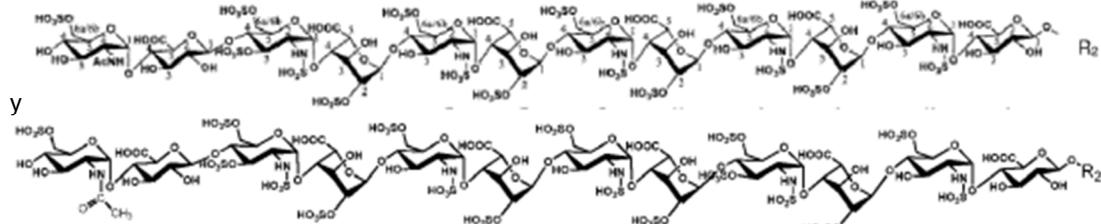
VI. Procedimientos de tratamiento

En el presente documento se proporciona un compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante, en el que el compuesto de heparina comprende una estructura seleccionada de:



- en la que R₂ es H o una etiqueta detectable, opcionalmente paranitrofenilo, para usar en un procedimiento para tratar una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante en un sujeto que necesita tal tratamiento. En algunos aspectos, el compuesto de heparina utilizado en dichos tratamientos es un compuesto de heparina que comprende un compuesto de heparina sintético de bajo peso molecular con actividad anticoagulante reversible, en el que la actividad anticoagulante del compuesto de heparina es reversible por la protamina, en el que la actividad anticoagulante se invierte en aproximadamente el 50% o más en presencia de 1 ug/ml de protamina, tal como se describe en el presente documento.

El compuesto de heparina para usar en un procedimiento para tratar una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante en un sujeto que necesita tal tratamiento puede comprender proporcionar un sujeto que necesita terapia anticoagulante, administrar al sujeto un compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante, realizar un control al sujeto por la trombocitopenia inducida por heparina, y administrar al sujeto un antídoto para revertir la actividad anticoagulante del compuesto de heparina si el sujeto padece trombocitopenia inducida por heparina. En dichos procedimientos, el compuesto de heparina comprende un compuesto de heparina que comprende una estructura seleccionada de:



en el que R₂ es H o una etiqueta detectable, opcionalmente paranitrofenilo. En algunos aspectos, el antídoto para revertir la actividad anticoagulante del compuesto de heparina es la protamina.

- En algunas realizaciones, un sujeto a tratar con el compuesto de heparina para uso en cualquiera de los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento puede ser un sujeto que sufre de tromboembolismo venoso. En algunas realizaciones, un sujeto a tratar puede ser un sujeto con insuficiencia renal. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas. A la luz de la presente divulgación y el nivel general de experiencia en la técnica, los expertos entenderán que los siguientes ejemplos pretenden ser solo ilustrativos y que se pueden emplear numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance del objeto actualmente reivindicado.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS PARA LOS EJEMPLOS 1-11

Expresión de enzimas biosintéticas de HS. Se utilizaron un total de nueve enzimas para la síntesis, incluidas NST, C₅-epi, 2-OST, 6-OST-1, 6-OST-3, 3-OST-1, 3-OST-5, Kfia y pmHS2. Todas las enzimas se expresaron en *E. coli* y se purificaron mediante cromatografía de afinidad apropiada, tal como se describió anteriormente (Liu, R. et al., J Biol Chem 285, 34240-34249, 2010; Xu, D., Moon, A., Song, D., Pedersen, LC y Liu, J. Nat Chem Biol 4, 200-202, 2008).

Preparación de cofactores enzimáticos. Se preparó un donador de sulfo, 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS), a partir de ATP y sulfato de sodio utilizando adenosina fosfoquinasa y ATP-sulfurilasa (Zhou, X., Chandarajoti, K., Pham, TQ, Liu, R. & Liu, J., Glycobiology 21, 771-780, 2011). La preparación de UDP-GlcNTFA se inició a partir de glucosamina (Sigma-Aldrich), que primero se convirtió en GlcNTFA al reaccionar con trifluorotioacetato de S-etilo

(Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Liu, R. et al., J Biol Chem 285, 34240-34249, 2010). El GlcNTFA resultante se convirtió en GlcNTFA-1-fosfato utilizando N-acetilhexosamina 1-quinasa (Zhao, G., Guan, W., Cai, L. & Wang, PG, Nat. Protoc. 5, 636-646, 2010). El plásmido que expresa N-acetilhexoamina 1-quinasa fue un generoso regalo del Prof. Peng Wang (Universidad Estatal de Georgia), y la expresión de la enzima se llevó a cabo en *E. coli* como se describió (Zhao, G., Guan, W., Cai, L. & Wang, PG, Nat. Protoc. 5, 636-646, 2010). La síntesis de UDP-GlcNTFA se completó transformando GlcNTFA-1-fosfato utilizando glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa/N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa (GlmU), tal como se describió (Liu, R. et al., J Biol Chem 285, 34240-34249, 2010). El UDP-GlcNTFA resultante estaba listo para la reacción de alargamiento involucrada en el uso de KfiA como se describe a continuación.

Síntesis del compuesto 6. La conversión de un material de partida GlcA-PNP en el compuesto 6 implica siete etapas, incluidas cinco etapas de alargamiento, una etapa de destrifluoroacetilación/N-sulfatación y una etapa de C₅-epimerización/2-O-sulfatación. El alargamiento de GlcA-PNP (100 mg, de Sigma-Aldrich) a GlcA-GlcNTFA-GlcA-GlcNTFA-GlcA-PNP se completó en 4 etapas utilizando dos glicosiltransferasas bacterianas, N-acetil glucosaminil transferasa de *E. coli* K5 (KfiA) y heparasan sintasa-2 (pmHS2) de *Pasteurella multocida*. Para introducir un residuo de GlcNTFA, se incubó GlcA-pnp (1,2 mM) con KfiA (20 µgml⁻¹) en un tampón que contenía Tris (25 mM, pH 7,5), MnCl₂ (15 mM) y UDP-GlcNTFA (1,5 mM), a temperatura ambiente durante la noche. Para introducir un residuo de GlcA, el sustrato disacárido, GlcNTFA-GlcA-pnp (1,2 mM), se incubó con pmHS2 (20 µgml⁻¹) en un tampón que contenía Tris (25 mM, pH 7,5), MnCl₂ (15 mM) y UDP-GlcA (1,5 mM), a temperatura ambiente durante la noche. El producto después de cada etapa de alargamiento se purificó utilizando una columna C₁₈ (0,75 × 20 cm; Biotage), que se eluyó con un gradiente lineal de 0-100% de acetonitrilo en H₂O y TFA al 0,1% en 60 min a un caudal de 2 mlmin⁻¹. El eluyente se controló mediante la absorbancia a 310 nm y la identidad del producto se confirmó mediante ESI-MS. La adición de residuos de GlcNTFA y GlcA se repitió una vez más para formar un esqueleto de pentasacárido para la posterior N-destrifluoroacetilación/N-sulfatación.

El esqueleto de pentasacárido se sometió adicionalmente a destrifluoroacetilación, seguida de N-sulfatación con N-sulfotransferasa (NST). Los esqueletos de pentasacáridos (280 mg) se secaron y resuspendieron en 30 ml de LiOH 0,1 M en hielo durante 2 horas. El grado de finalización de la reacción de destrifluoroacetilación se controló mediante análisis PAMN-HPLC y ESI-MS. Una vez completada la destrifluoroacetilación, el pH de la mezcla de reacción disminuyó a 7,0 y se incubó con MES 50 mM pH 7,0, N-sulfotransferasa 10 µgml⁻¹ y PAPS 0,5 mM en 780 ml a 37°C durante la noche, donde la cantidad de PAPS fue aproximadamente 1,5 veces la cantidad molar de grupos NH₂ en el pentasacárido. El producto N-sulfatado se purificó mediante columna Q y el producto purificado con la estructura de GlcA-GlcNS-GlcA-GlcNS-GlcA-PNP se dializó.

En el pentasacárido GlcA-GlcNS-GlcA-GlcNS-GlcA-pnp, se introdujo otro GlcNTFA utilizando KfiA siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La reacción fue mediante PAMN-HPLC para observar un desplazamiento en el tiempo de retención del pico con la absorbancia a 310 nm. La mezcla de reacción se incubó con MES 50 mM (pH 7,0), CaCl₂ 2 mM, 10 µgml⁻¹ de C₅-epi, 2-OST 10 µgml⁻¹, PAPS 0,2 mM y sustrato de hexasacárido 0,13 mM en un volumen de 2 litros a 37°C durante la noche. A continuación, la mezcla de reacción se purificó mediante una columna de Q-Sefarosa para obtener el Compuesto 6.

Análisis por HPLC. Se utilizó tanto DEAE-HPLC como intercambio aniónico basado en poliaminas (PAMN)-HPLC para analizar la pureza de los productos. Las condiciones de elución para el análisis de HPLC se describieron en otro lugar (Liu, R. et al. J Biol Chem 285, 34240-34249, 2010).

45 EJEMPLO 1

SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS 1, 2, 3, 4 Y 5

La conversión del compuesto 6 a 1, el compuesto 7 a 2 y el compuesto 8 a 3 siguió las mismas reacciones, incluyendo destrifluoroacetilación/N-sulfatación, 6-O-sulfatación y 3-O-sulfatación por la enzima 3-OST-1. La conversión del compuesto 9 a 4 implicó 2 etapas, incluida la 6-O-sulfatación y la sulfatación con 3-OST-1. La conversión del compuesto 4 a 5 se completó mediante 3-O-sulfatación utilizando la enzima 3-OST-5. La reacción de 6-O-sulfatación contenía MES 50 mM, pH 7,0, PAPS 1,5 mM y sustrato 0,3 mM, 0,2 mgml⁻¹ de 6-OST-1 y 0,2 mgml⁻¹ de 6-OST-3 en 20 a 40 ml durante la noche a 37°C. El grado de reacción se controló mediante DEAE-HPLC. La mezcla de reacción de sulfatación de 3-OST-1 y 3-OST-5 contenía MES 50 mM, pH 7,0, MnCl₂ 10 mM, MgCl₂ 5 mM, PAPS 0,5 mM, sustrato 0,25 mM, 10 ugml⁻¹ de 3-OST-1 o 10 ugml⁻¹ de 3-OST-5 durante la noche a 37°C. El grado de la reacción también se controló mediante DEAE-HPLC. Los productos se purificaron mediante columna Q-Sefarosa.

60 EJEMPLO 2

PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS INTERMEDIOS Y DE LMWH MEDIANTE Q-SEFAROSA

La purificación de los compuestos 6, 7, 8 y 9, así como todos los demás intermedios anteriores, se realizó mediante una columna de Q-Sefarosa de flujo rápido (15 × 200 mm; GE Health Care, Wauwatosa, Wisconsin, Estados Unidos de América), que se eluyó con un gradiente lineal de 20-100 % de NaCl 1 M en NaOAc 20 mM a pH 5,0 en 2 horas a

un caudal de 2 mlmin⁻¹. La purificación de esos oligosacáridos altamente sulfatados, es decir, los compuestos de LMWH 1-5, se llevó a cabo mediante una columna de Q-Sefarosa, que se eluyó con un gradiente lineal de 30-100 % de NaCl 2 M en NaOAc 20 mM a pH 5,0 en 2 horas a un caudal de 2 mlmin⁻¹.

- 5 *Determinación de la actividad anti-Xa in vitro y ex vivo.* Los ensayos se basaron en un procedimiento publicado previamente (Zhang, L. et al., J. Biol. Chem. 276, 42311-42321, 2001; Duncan et al., Biochim Biophys Acta 1671, 34-43, 2004). Brevemente, se diluyó factor Xa humano (Enzyme Research Laboratories, South Bend, Indiana, Estados Unidos de América) a 50 Uml⁻¹ con PBS. Los sustratos cromogénicos, S-2765 era de Diapharma (Westchester, Ohio, Estados Unidos de América) y se prepararon a 1 mgml⁻¹ en agua. UFH (de la Farmacopea de Estados Unidos),
10 LOVENOX® (de farmacia local) y LMWH (Compuestos 1 a 5) se disolvieron en PBS a varias concentraciones (3 a 600 µgml⁻¹). La mezcla de reacción, que consistía en 20 µl de plasma humano (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América) y 8 µl de la solución que contenía la muestra, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se añadió factor Xa (100 µl). Despues de incubar a temperatura ambiente durante 4 min, se añadieron 30 µl de sustrato S-2765. La absorbancia de la mezcla de reacción se midió a 405 nm de forma continua durante 5 min. Los valores de absorbancia se representaron frente al tiempo de reacción. Las velocidades de reacción iniciales en función de la concentración se usaron para calcular los valores de IC₅₀.
- 15

EJEMPLO 3

20 **PREPARACIÓN DE LMWH MARCADO CON 35S**

Se modificaron UFH (de US Pharmacopea) y LOVENOX® (de farmacia local) mediante N-sulfotransferasa. La reacción consistió en MES 50 mM pH 7,0, N-sulfotransferasa 0,1 mgml⁻¹ y [³⁵S]PAPS 0,5 nmol (la actividad específica de [³⁵S]PAPS fue de $2,2 \times 10^4$ cpm/pmol), 50 µg de UFH o LOVENOX ® en 500 µl en total a 37°C durante la noche. Los productos se purificaron mediante una columna DEAE. Los compuestos de LMWH 1 a 4 marcados con ³⁵S se prepararon a partir de los compuestos intermedios de LMWH sin grupos 3-O-sulfo. La reacción consistió en MES 50 mM pH 7,0, MnCl₂ 10 mM, MgCl₂ 5 mM, 3-OST-1 0,1 mgml⁻¹ y 0,5 nmol de [³⁵S]PAPS (la actividad específica de [³⁵S]PAPS fue $2,2 \times 10^4$ cpm/pmol), 5 µg de oligosacárido en 500 µl en total a 37°C durante la noche. El Compuesto 5 de LMWH marcado con ³⁵S se preparó a partir del Compuesto 4 de LMWH. La reacción consistió en MES 50 mM pH 7,0, MnCl₂ 10 mM, MgCl₂ 5 mM, 3-OST-5 0,1 mgml⁻¹ y [³⁵S]PAPS 0,5 nmol (la actividad específica de [³⁵S]PAPS fue de $2,2 \times 10^4$ cpm/pmol), 5 µg de oligosacárido en 500 µl en total a 37°C durante la noche. El compuesto 5 marcado con ³⁵S se purificó mediante una columna DEAE-HPLC.

EJEMPLO 4

35 **DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE UNIÓN DE LAS LMWH A LA ANTITROMBINA (AT)**

La constante de disociación (K_d) de cada muestra y AT se determinó utilizando coelectroforesis de afinidad (Lee, MK & Lander, AD, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2768-2772, 1991). Se cargaron aproximadamente 1500-2500 cpm de Compuestos 1 a 5 de LMWH marcados con ³⁵S por carril con zonas de AT a concentraciones de 0, 8, 16, 32, 60, 120, 250, 500 y 1000 nM. El gel se desarrolló a 300 mA durante 2 horas, se secó y analizó en un Phospholmager (Amersham Biosciences, Wauwatosa, Wisconsin, Estados Unidos de América Storm 860). El coeficiente de retraso se calculó a $R = (M_0 - M)/M_0$, donde M_0 es la movilidad del polisacárido a través de la zona sin AT y M es la movilidad de la muestra a través de cada zona de separación. A continuación, se representó gráficamente el coeficiente de retraso frente al coeficiente de retraso dividido por su respectiva concentración de AT. La pendiente de la recta representa $-1/K_d$.

EJEMPLO 5

50 **NEUTRALIZACIÓN DE LMWH POR PROTAMINA /N VITRO**

Los procedimientos siguieron una publicación anterior (Sundaram, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 651-656, 2003). Los compuestos de LMWH y el cloruro de protamina (Sigma-Aldrich) se disolvieron en PBS. Las concentraciones de las muestras de LMWH para cada compuesto fueron diferentes porque cada compuesto tiene un valor IC₅₀ diferente para la actividad anti-Xa. La mezcla de reacción consistió en 20 µl de plasma humano (Sigma-Aldrich), 2 µl de la solución madre de LMWH (400 × IC₅₀ de su actividad anti-Xa) y 8 µl de protamina con varias concentraciones (de 0-90 µg/ml), y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, la mezcla (30 µl) se sometió a la medición de la actividad anti-Xa, tal como se ha descrito anteriormente.

60 **EJEMPLO 6**

NEUTRALIZACIÓN DE LMWH POR PROTAMINA EN RATONES

El estudio se realizó en ratones macho C57BL/6J de ocho semanas de vida (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, Estados Unidos de América) (n=4 por grupo). Los experimentos con ratones fueron aprobados por los Comités de Uso y Cuidado de Animales de la UNC y cumplieron con las pautas de los Institutos Nacionales de Salud. Bajo anestesia

con isoflurano, a los ratones se les administró por vía subcutánea PBS, HNF (3 mgkg⁻¹), LOVENOX® (3 mgkg⁻¹) o el Compuesto 5 (0,6 mgkg⁻¹) 30 min antes de la administración de protamina. Se administraron protamina (15 mgkg⁻¹) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) por vía intravenosa a través de una inyección en el plexo retroorbitario, y 5 minutos más tarde se extrajeron muestras de sangre de la vena cava inferior en jeringas precargadas con una solución de citrato de sodio al 3,2 % (relación de volumen final 9:1). Para obtener plasma de ratón, las muestras de sangre se centrifugaron a 4000 g durante 15 min a 4 °C. A continuación, se usó plasma de ratón para determinar la actividad anti-Xa. El análisis *ex vivo* de la actividad anti-Xa se realizó de forma similar al estudio *in vitro* descrito anteriormente. Brevemente, se incubó plasma (10 µl) de diferentes grupos de ratones con factor Xa humano 80 nM (10 µl) a temperatura ambiente durante 4 minutos y a continuación se añadió S-2765 (1 mgml⁻¹, 30 µl). La actividad anti-Xa en el plasma de ratón de los ratones inyectados con PBS se definió como 100%. El análisis estadístico para comparaciones múltiples se realizó mediante ANOVA de dos vías con la prueba post-hoc de Bonferroni (GraphPad Prism Software, La Jolla, California, Estados Unidos de América).

EJEMPLO 7

MODELO DE RATÓN DE SANGRADO DE LA COLA

Bajo anestesia con isoflurano, a los ratones (n= 8 por grupo) se les administró PBS o el Compuesto 5 (0,6 mgkg⁻¹) por vía subcutánea, 30 min más tarde se les administró PBS o protamina (15 mgkg⁻¹) mediante inyección intravenosa retroorbital. Después de 5 minutos, la parte distal de la cola se seccionó transversalmente a un diámetro constante (1,5 mm), aproximadamente a 3-4 mm del extremo. Eso da lugar a un sangrado tanto arterial como venoso. La cola se colocó inmediatamente en un tubo falcon de 15 ml que contenía 13 ml de PBS precalentado (37 °C) y se observó la pérdida de sangre durante 30 min. El tiempo de sangrado primario se definió como el tiempo hasta el primer cese del sangrado. Posteriormente, también se registró el tiempo para cada sangrado reiniciado y se utilizó para calcular el tiempo de sangrado total. Un ratón del grupo Compuesto 5/protamina recibió una inyección de protamina imprecisa y se excluyó del estudio. La sangre recogida en PBS se usó para calcular la pérdida de volumen de sangre total. Se añadió ácido fórmico a las muestras (proporción 70:30) y se midió la absorbancia a 405 nm. Se generó una curva patrón mezclando 13 ml de PBS con cantidades conocidas de sangre. El análisis estadístico entre cada grupo se realizó mediante ANOVA unidireccional (GraphPad Prism Software, La Jolla, California, Estados Unidos de América) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

EJEMPLO 8

ANÁLISIS POR MS

Los análisis de baja resolución se realizaron en un Thermo LCQ-Deca. Los compuestos de LMWH y los intermedios se diluyeron directamente en 200 µl de MeOH/H₂O 9:1. Se utilizó una bomba de jeringa (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, Estados Unidos de América) para introducir la muestra por infusión directa (35 µlmin⁻¹). Los experimentos se llevaron a cabo en modo de ionización negativa con la fuente de electrospray ajustada a 5 KV y 275°C. El oligosacárido sulfatado (1 µl) se diluyó en una solución de trabajo diferente que contenía 200 µl de acetonitrilo al 70% e imidazol 10 mM. Los experimentos para oligosacáridos sulfatados se llevaron a cabo en modo de ionización negativa con la fuente de electrospray ajustada a 2 KV y 200°C. El control automático de ganancia se fijó en 1 × 10⁷ para MS de rastreo completo. Los datos de MS se adquirieron y procesaron utilizando Xcalibur 1.3.

Se realizó un análisis ESI-MS de alta resolución en Thermo LTQ XL Orbitrap (Breman, Alemania) en las siguientes condiciones. Se usó una columna de cromatografía de interacción líquida hidrófila (HILIC) Luna (2,0 × 150 mm², 20 Å, Phenomenex, Torrance, California, Estados Unidos de América) para separar la mezcla de oligosacáridos. La fase móvil A era acetato de amonio 5 mM preparado con agua de grado de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El móvil B era acetato de amonio 5 mM preparado en acetonitrilo de grado HPLC al 98 % con un 2 % de agua de grado HPLC. Después de la inyección de 8,0 µl de mezcla de oligosacáridos (1,0 µgµl⁻¹) a través de un inyector automático Agilent 1200, se usó una bomba binaria de HPLC para suministrar el gradiente de 10 % A a 35 % A durante 40 min a un caudal de 150 µlmin⁻¹. La columna de LC se conectó directamente en línea a la fuente de ionización por electrospray estándar del espectrómetro de masas (MS) con transformada de Fourier (FT) LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San-Jose, California, Estados Unidos de América). Los parámetros de origen para la detección por FT-MS se optimizaron utilizando Arixtra® (adquirido en una farmacia) para minimizar la fragmentación interna y la pérdida de sulfato y maximizar la señal/ruido en el modo de iones negativos. Los parámetros optimizados, utilizados para evitar la fragmentación en la fuente, incluyeron un voltaje de pulverización de 4,2 KV, un voltaje de capilar de -40 V, un voltaje de lente de tubo de -50 V, una temperatura de capilar de 275 °C, un caudal de vaina de 30 y un caudal de gas auxiliar de 6. La calibración externa de los espectros de masas producía rutinariamente una precisión de masas superior a 3 ppm. Todos los espectros de masas FT se adquirieron a una resolución de 60.000 con un rango de masas de 300-2000 Da.

EJEMPLO 9

ANÁLISIS POR RMN

Los compuestos LMWH y los intermedios se analizaron mediante ^1H -RMN 1D y RMN 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC). Todos los experimentos de RMN se realizaron a 298 K en un espectrómetro Bruker Avance II de 800 MHz con software Topsin 2.1. Las muestras (3,0 a 6,0 mg) se disolvieron cada una en 0,5 ml de D₂O (99,996 %, Sigma-Aldrich) y se liofilizaron tres veces para eliminar los protones intercambiables.

Las muestras se volvieron a disolver en 0,4 ml de D₂O y se transfirieron a microtubos de RMN (DE 5 mm, tubos de RMN Norrell de Sigma Aldrich). Los experimentos de ^1H RMN 1D se realizaron con 256 rastreos y un tiempo de adquisición de 850 ms. Los experimentos ^1H - ^1H COSY 2D se realizaron con 16 rastreos, un retraso de relajación de 1,5 segundos y un tiempo de adquisición de 500 milisegundos. Se realizaron experimentos ^1H - ^{13}C HMQC 2D con 16 rastreos, 1,5 segundos de retraso de relajación y 250 milisegundos de tiempo de adquisición.

Los compuestos de LMWH y los intermedios también se analizaron mediante ^1H -RMN 1D, ^{13}C -RMN 1D y RMN 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC) en el espectrómetro Varian Inova de 500 MHz con software VnmrJ 2.2D. Las muestras (2,0 a 5,0 mg) se disolvieron en 0,5 ml de D₂O (99,994 %, Sigma-Aldrich) y se liofilizaron tres veces para eliminar los protones intercambiables.

Las muestras se volvieron a disolver en 0,5 ml de D₂O y se transfirieron a microtubos de RMN (DE 5 mm, Norrell). Los experimentos de ^1H -RMN 1D se realizaron con 256 rastreos y un tiempo de adquisición de 768 ms. Los experimentos de ^{13}C -RMN 1D se realizaron con 40.000 rastreos, un retraso de relajación de 1,0 s y un tiempo de adquisición de 1.000 ms. Se realizaron experimentos ^1H - ^1H COSY 2D con 48 rastreos, 1,8 segundos de retraso en la relajación y 204 ms de tiempo de adquisición. Se realizaron experimentos ^1H - ^{13}C HSQC 2D con 48 rastreos, 1,5 segundos de retraso de relajación y 256 ms de tiempo de adquisición.

EJEMPLO 10

DETERMINACIÓN DE LA UNIÓN DE LMWH A ESTABILINA-2

La línea celular Estabilina-2 que expresa 190-HARE (Harris et al., J. Biol. Chem. 279, 36201-36209, 2004) se cultivó hasta un 90 % de confluencia con DMEM + 8 % FBS + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina B en placas de 24 pocillos durante al menos 2 días antes del experimento en una incubadora de cultivo de tejidos estándar. Se añadió medio de endocitosis (DMEM + BSA al 0,05 %) que contenía una cantidad conocida de compuesto de LMWH marcado con ^{35}S , LOVENOX® o UFH a cada pocillo por triplicado y se dejó incubar con las células durante 3 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. La internalización específica del receptor se evaluó incubando cada ligando radiomarcado con un exceso de al menos 100 veces de UFH no marcada. A continuación, las células se lavaron con solución salina equilibrada de Hank (CaCl₂ 1,26 mM, KCl 5,33 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, MgCl₂-6H₂O 0,5 mM, MgSO₄-7H₂O 0,41 mM, NaCl 138 mM, NaHCO₃ 4,0 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, rojo de fenol 0,3 mM, pH 7,2) tres veces, y las células se lisaron en 0,4 ml de NaOH 0,3 N. Se mezclaron 0,35 ml de la mezcla de lisado celular con 4 ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de América) y se midió la radiactividad mediante un contador de centelleo Beckman Coulter LS6500. El lisado celular de 0,05 ml restante se usó para determinar los niveles de proteína utilizando el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich). Los datos se calcularon como el porcentaje de CPM específicas internalizadas de la cantidad total añadida por μg de proteína de lisado celular \pm desviación estándar.

EJEMPLO 11

DETERMINACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE LMWH IN VIVO

El experimento con ratones fue aprobado por los Comités de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Nebraska. Se anestesiaron ratones BALB/c de cinco a seis semanas de vida (Harlan Laboratories, Indianápolis, Indiana, Estados Unidos de América) que pesaban 18-20 g en una pequeña cámara a 34°C con un flujo de oxígeno que contenía isoflurano al 4 %. Una vez que los ratones estaban inconscientes, se colocaron individualmente en una almohadilla calentada con un cono nasal colocado sobre el hocico con un flujo constante de oxígeno que contenía isoflurano al 2 %. Una cantidad específica de compuesto de LMWH marcado con ^{35}S , LMWH o UFH se inyectó a través de la vena lateral de la cola utilizando una aguja 27G1/2 montada en una jeringa de 1 ml. Se permitió que el material marcado circulara en la sangre durante 12 minutos mientras el ratón permanecía inconsciente. Se expuso la cavidad abdominal mediante incisión y se recogió, lavó y pesó el hígado. Se homogeneizaron aproximadamente 100 mg de cada uno de los lóbulos en 0,75 ml de NP-40 al 1 % y a continuación se centrifugaron a 12 000 \times g durante 2 min para sedimentar el material insoluble. A continuación, se añadió el sobrenadante a 4 ml de fluido de centelleo, se mezcló durante 30 min mediante agitación y a continuación se evaluó la radiactividad mediante un contador de centelleo Beckman Coulter LS6500. Los datos se presentan como el porcentaje de CPM en el hígado total dividido por el CPM total inyectado \pm error estándar de 3-5 ratones por ligando.

REFERENCIAS

Las referencias enumeradas a continuación, así como todas las referencias citadas en el suplemento de la memoria descriptiva, explican, proporcionan antecedentes o enseñan metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en este documento.

Aikawa et al., (1999) J. Biol. Chem. 274, 2690.
 Aikawa, J.-I., et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 5876-5882.
 Alexander, C. M., et al., (2000) Nat. Genet. 25, 329-332.

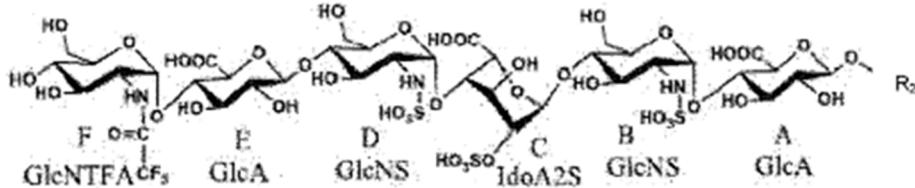
- Altschul et al. (1990) J Mol Biol 215, 403-410.
- Atha, D. H., et al., (1985) Biochemistry 24, 6723-6729.
- Avci, F. Y., et al., (2003) Curr. Pharm. Des. 9, 2323-2335.
- Balagurunathan, K., et al., (2003) J. Biol. Chem. 278, 52613-52621.
- Balagurunathan, K., et al., (2003) Nat. Biotechnol. 21, 1343-1346.
- Bernfield, M., et al., (1999) Annu. Rev. Biochem. 68, 729-777.
- Bjornsson, S. (1993) Anal. Biochem. 210, 282-291.
- Bowman et al., (1999) Chem. Biol. 6, R9-R22.
- Burkart, M. D., et al., (2000) J. Org. Chem. 65, 5565-5574.
- Capila, I., and Linhardt, R. J. (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41, 390-412.
- Carfi, A., et al., (2001) Mol. Cell 8:169-179.
- Chen et al., (1992) Protein Expression Purif. 3, 421-6.
- Chen, J., et al., (2003) Glycobiology 13, 785-794.
- Chen et al., (2005) J. Biol. Chem. 280, 42817-42825.
- Conrad, H. (1998) Heparin-binding Proteins, Academic Press, San Diego, CA.
- Copeland et al., (2008) Biochemistry 47: 5774-5783.
- Das et al. (2001) Chemistry 7, 4821-4834.
- Dementiev, A., et al., (2004) Nat. Struct. Biol. 11, 867-863.
- Dooley (1998) Chemico-Biol. Interact. 109, 29.
- Duncan, M. B., et al., (2004) Biochim. Biophys. Acta 1671, 34-43.
- Edavettal, S. C., et al., (2004) J. Biol. Chem. 279, 25789-25797.
- Esko, J. D., and Lindahl, U. (2001) J. Clin. Invest. 108:169-173.
- Esko, J. D., and Selleck, S. B. (2002) Annu. Rev. Biochem. 71, 435-471.
- Falany (1997) FASEB J. 11, 1-2.
- Feyerabend et al. (2006) Nat. Chem. Biol. 2, 195-196.
- Fukuta et al. (1998) Biochim. Biophys. Act. 1399, 57.
- Fuster et al. (2005) Nat. Rev. Cancer 5, 526-542.
- Gama et al. (2006) Nat. Chem. Biol. 2, 467-473.
- Gribskov et al. (1986) Nuc Acids Res 14(1), 327-334.
- Guo et al. (1994) Chem.-Biol. Interact. 92, 25-31.
- Habuchi et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 9208.
- Habuchi, H., et al., (2000) J. Biol. Chem. 275, 2859-2868.
- Harris, E.N. et al., J. Biol. Chem. 279, 36201-36209 (2004).
- Kakuta et al. (2003) Biochem. Soc. Trans. 31 (pt2), 331-334.
- Kreuger et al. (2006) J. Cell Biol. 174, 323-327.
- Krumenacher, C., et al., (1999) J. Virol. 73, 8127-8137.
- Kuberan, B., et al., (2003) J. Am. Chem. Soc. 125, 12424-12425.
- Kyte et al. (1982) J Mol Biol 157, 105.
- Lee, M.K., and Lander, A.D., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2768-2772.
- Li et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 28158-28163
- Lin et al., (1995) J. Am. Chem. Soc. 117, 8031.
- Lin et al. (1998) Anal. Biochem. 264, 111-117.
- Lindahl, U., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 24979-24982.
- Lindahl, U. et al., (2005) J. Med. Chem. 48, 349-352.
- Linhardt, R. J. (2003) J. Med. Chem. 46, 2551-2564.
- Liu, J., and Thorp, S. C. (2002) Med. Res. Rev. 22, 1-25.
- Liu, J., et al., (1996) J. Biol. Chem. 271, 27072-27082.
- Liu, J., et al., (1999) J. Biol. Chem. 274, 38155-38162.
- Liu, J., et al., (1999) J. Biol. Chem. 274, 5185-5192.
- Liu, J., et al., (1999) J. Biol. Chem. 274, 5185-5192.
- Liu, J., et al., (1999) J. Biol. Chem. 274, 38155-38162.
- Liu, J., et al., (2002) J. Biol. Chem. 277, 33456-33467.
- Liu, R. et al. J Biol Chem 285, 34240-34249 (2010).
- Liu et al. (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 263-272.
- Marcus et al. (1980) Aial. Biochem. 107, 296.
- Marshall et al., (1997) J. Biol. Chem. 272, 9153-9160.
- Marshall et al., (1998) Chem. -Biol. Interact. 109, 107-116.
- Mazany et al., (1998) Biochim. Biophys. Act. 1407, 92.
- Moon, A., et al., (2004) J. Biol. Chem. 279, 45185-45193.
- Muñoz et al. (2006) Biochemistry 45, 5122-5128.
- Muñoz et al. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. 339, 597-602
- Nastuk et al. (1998) J. Neuroscience 18, 7167.
- Needleman et al. (1970) J Mol Biol 48, 443.
- Ong et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 5190.
- Ornitz, D. M., et al., (1996) J. Biol. Chem. 271, 15292-15297.
- Ouyang et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 24770.

- Ozawa et al., (1990) Nucleic Acids Res. 18, 4001z.
Pempe et al., (2012) J. Biol. Chem. 287, 20774-20783.
Petitou, M., et al., (1999) Nature 398, 417-422.
Petitou, M., and van Boeckel, C. A. A. (2004) Angew. Chem. Int. Ed. 43, 3118-3133.
- 5 Reizes, O., et al., (2001) Cell 106:105-116.
Rosenberg, R. D., et al., (1997) J. Clin. Invest. 99, 2062-2070.
Saeki et al. (1998) J. Biochem. 124, 55.
Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 10 Sasisekharan, R., et al., (2002) Nat. Rev. Cancer 2, 521-528.
Schwartz et al. (1979) Nuc Acids Res 6(2), 745-755.
Shively, J.E., and Conrad, H.E. (1976) Biochemistry 15, 3932-3942.
Shriver et al. (2004) Nat. Rev. Drug Discov. 863-873.
- 15 Shukla, D., et al. (1999) Cell 99, 13-22.
Shukla, D., and Spear, P. G. (2001) J. Clin. Invest. 108, 503-510.
Shworak, N. W., et al., (1997) J. Biol. Chem. 272, 28008-28019.
Smith et al. (1981) Adv Appl Math 2, 482.
Sundaram, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 651-656 (2003)
- 20 Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res 22(22), 4673-4680.
Patente de Estados Unidos No. 6,255,088.
Patente de Estados Unidos No. 4,554,101.
Uchimura et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 22577.
Vann et al., (1981) Eur. J. Biochem. 116, 359-364.
- 25 Wethmur & Davidson (1968) J Mol Biol 31, 349-370.
Willis, S. H., et al., (1998) J. Virol. 72, 5938-5947.
WuDunn, D., and Spear, P. G. (1989) J. Virol. 63, 52-58.
Xu, D. et al., Nat Chem Biol 4, 200-202 (2008).
- 30 Xu, Y. et al. Science 334, 498-501 (2011).
Xu, Y. et. al., Nat Chem Biol 4, 248-252 (2014).
Yang et al. (1996) Protein Expression Purif. 8, 423-429.
Yang et al., (1997) Protein Eng. 10, 70.
- 35 Yang et al., (1998) Chem. -Biol. Interact. 109, 129-135.
Yoshinari et al., (1998) J. Biochem. 123, 740.
Zhang, L., et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 42311-42321.
Zhang, L., et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 28806-28813.
Zhao, G., et al., Glycobiology 21, 771-780 (2011).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para sintetizar un compuesto de heparina, que comprende:
proporcionar un hexasacárido que comprende la siguiente estructura:

5



en la que R₂ es H o una etiqueta detectable;
alargar el sustrato de hexasacárido a un heptasacárido utilizando heparosan sintasa-2 y el sustrato ácido glucurónico (GlcUA);

10 alargar el sustrato de heptasacárido a un octasacárido utilizando N-acetil glucosaminil transferasa y N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA);
epimerizar el octasacárido utilizando C₅-epimerasa (C₅-epi);
sulfatar el octasacárido epimerizado resultante utilizando 2-O-sulfotransferasa (2-OST) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS);

15 convertir el residuo o residuos de N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA) en el octasacárido en residuos de N-sulfo glucosamina (GlcNS) utilizando N-sulfotransferasa (NST), 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS) y una base para proporcionar un sustrato de octasacárido;

20 alargar el sustrato de octasacárido a un decasacárido utilizando heparosan sintasa-2 y N-acetil glucosaminil transferasa, y utilizando sustratos que comprenden ácido glucurónico (GlcA) y N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA);

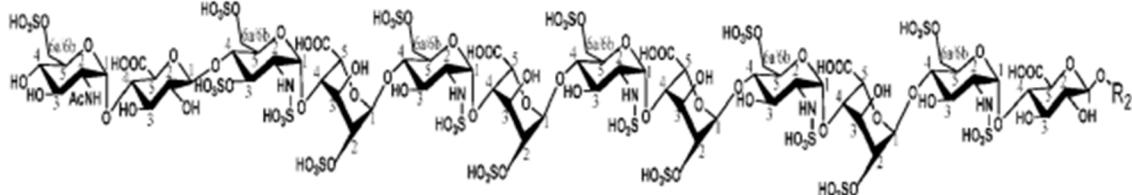
25 epimerizar el decasacárido utilizando C₅-epimerasa (C₅-epi);
sulfatar el decasacárido epimerizado resultante utilizando 2-O-sulfotransferasa (2-OST) y de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS);

convertir el residuo o residuos de N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA) en el decasacárido sulfatado resultante en residuos de N-sulfo glucosamina (GlcNS) utilizando N-sulfotransferasa (NST), 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS) y una base para proporcionar un sustrato de decasacárido;

30 alargar el sustrato de decasacárido en un dodecasacárido utilizando heparosan sintasa-2 y N-acetil glucosaminil transferasa, y utilizando sustratos que comprenden ácido glucurónico (GlcA) y N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA);

35 epimerizar el dodecasacárido utilizando C₅-epimerasa (C₅-epi);
sulfatar el dodecasacárido epimerizado resultante utilizando
(i) 2-O-sulfotransferasa (2-OST) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS);
(ii) 6-O-sulfotransferasa (6-OST) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS); y
(iii) 3-O-sulfotransferasa 1 (3-OST-1), y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS);

en el que se sintetiza un compuesto de heparina representado por la siguiente estructura:



2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el hexasacárido se proporciona mediante las etapas que comprenden:

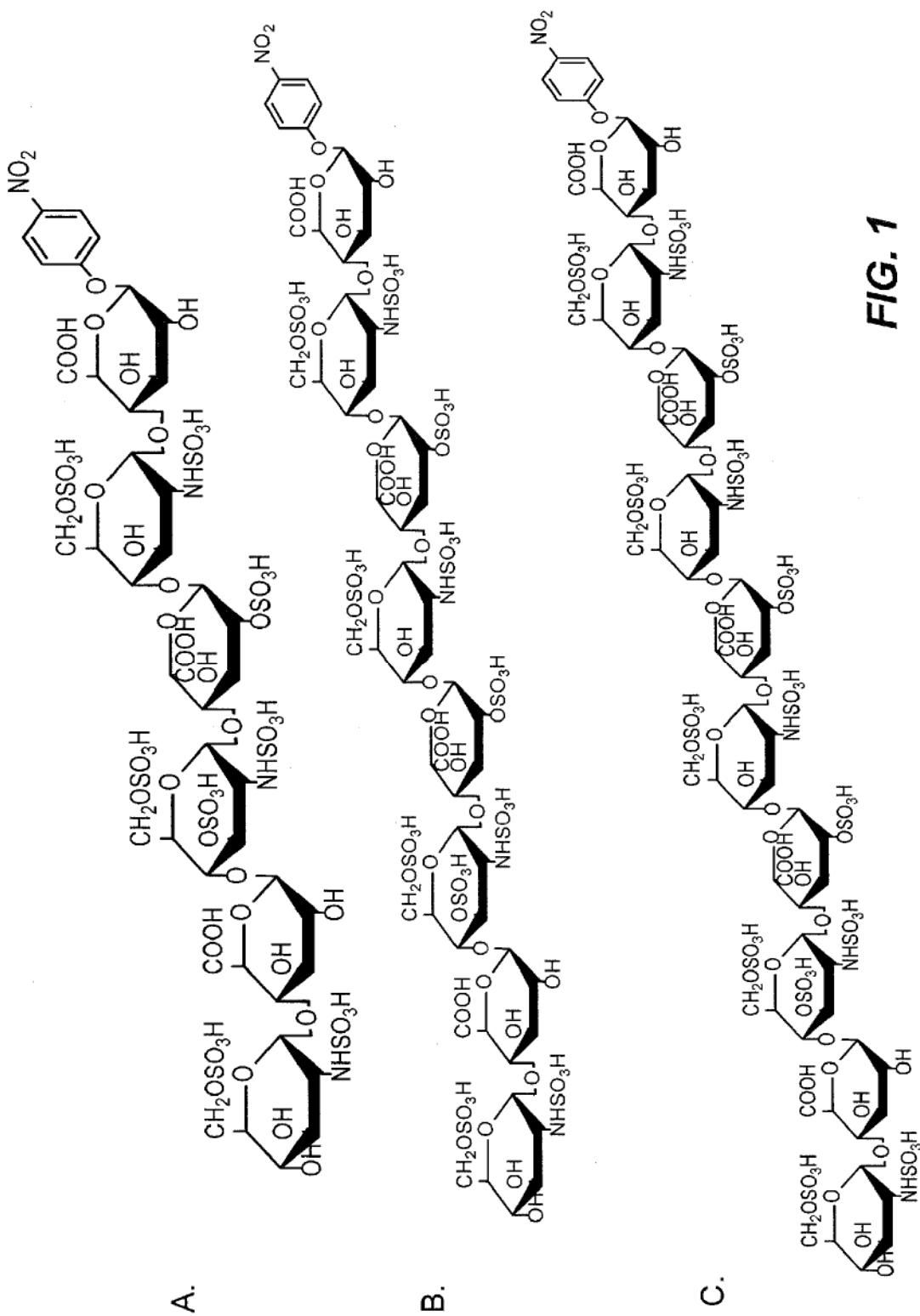
40 alargar un sustrato de monosacárido a un hexasacárido utilizando enzimas N-acetil glucosaminil transferasa y heparosan sintasa-2, y sustratos que comprenden ácido glucurónico (GlcA) y N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA);
convertir el residuo o residuos de N-trifluoroacetil glucosamina (GlcNTFA) en el hexasacárido en residuos de N-sulfo glucosamina (GlcNS) utilizando N-sulfotransferasa (NST), 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS) y una base;

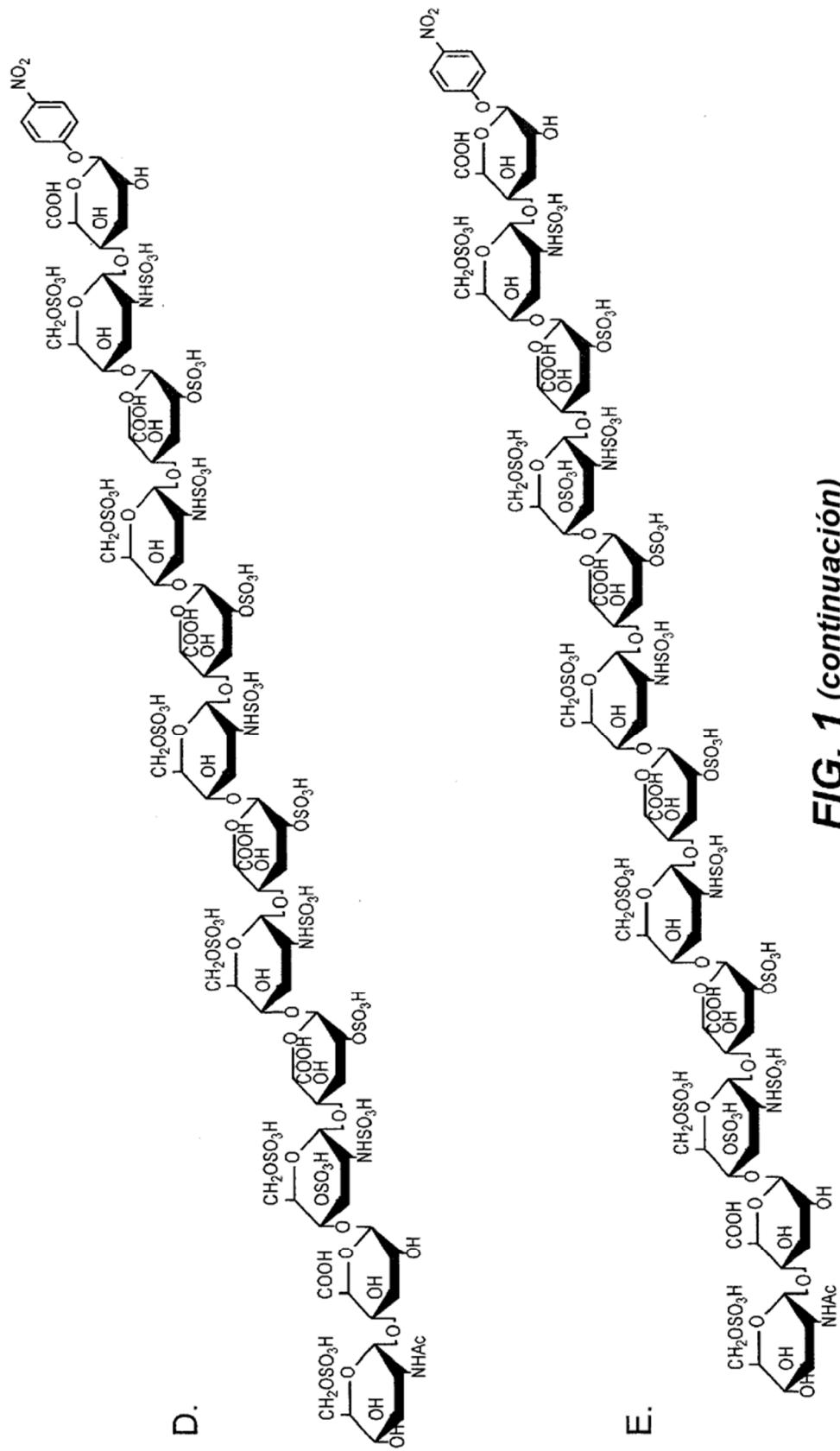
45 epimerizar el hexasacárido utilizando C₅-epimerasa (C₅-epi); y
sulfatar el hexasacárido utilizando 2-O-sulfotransferasa (2-OST) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS).

3. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la 6-O-sulfotransferasa (6-OST) es 6-O-sulfotransferasa 1 y/o 3 (6-OST-1 y/o 6-OST-3).

50 4. Procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además sulfatar el dodecasacárido utilizando una 3-O-sulfotransferasa-5 (3-OST-5) y 3'-fosfoadenosina 5'-fosfatosulfato (PAPS).

5. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la glicosil transferasa se selecciona del grupo que consiste en N-acetyl glucosaminil transferasa de *E. coli* K5 (KfiA) y/o heparosan sintasa-2 (pmHS2) de *Pasteurella multocida*.
6. Compuesto de heparina de bajo peso molecular con actividad anticoagulante reversible, en el que el compuesto de heparina comprende una de las siguientes estructuras:
-
- en la que
R₂ es H o una etiqueta detectable, o
-
- 10 en la que R₂ es H o una etiqueta detectable.
7. Compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante, en el que el compuesto de heparina comprende una estructura seleccionada de:
-
- 15 y
-
- en las que
R₂ es H o una etiqueta detectable,
para usar en un procedimiento para tratar una enfermedad sensible a la terapia anticoagulante en un sujeto que necesita tal tratamiento.
- 20
8. Compuesto de heparina para usar en un procedimiento de la reivindicación 7, en el que la enfermedad es tromboembolismo venoso.
- 25 9. Compuesto de heparina para usar en un procedimiento de la reivindicación 7, en el que el sujeto que necesita dicho tratamiento tiene insuficiencia renal.
- 30 10. Compuesto de heparina para usar en un procedimiento de la reivindicación 7, en el que el procedimiento comprende:
proporcionar un sujeto que necesita terapia anticoagulante;
administrar al sujeto dicho compuesto de heparina que tiene actividad anticoagulante;
realizar un control al sujeto para detectar trombocitopenia inducida por heparina; y
administrar al sujeto un antídoto para revertir la actividad anticoagulante del compuesto de heparina si el sujeto padece trombocitopenia inducida por heparina.
- 35 11. Compuesto de heparina para usar en un procedimiento de la reivindicación 10, en el que el antídoto para revertir la actividad anticoagulante del compuesto de heparina es la protamina.



**FIG. 1 (continuación)**

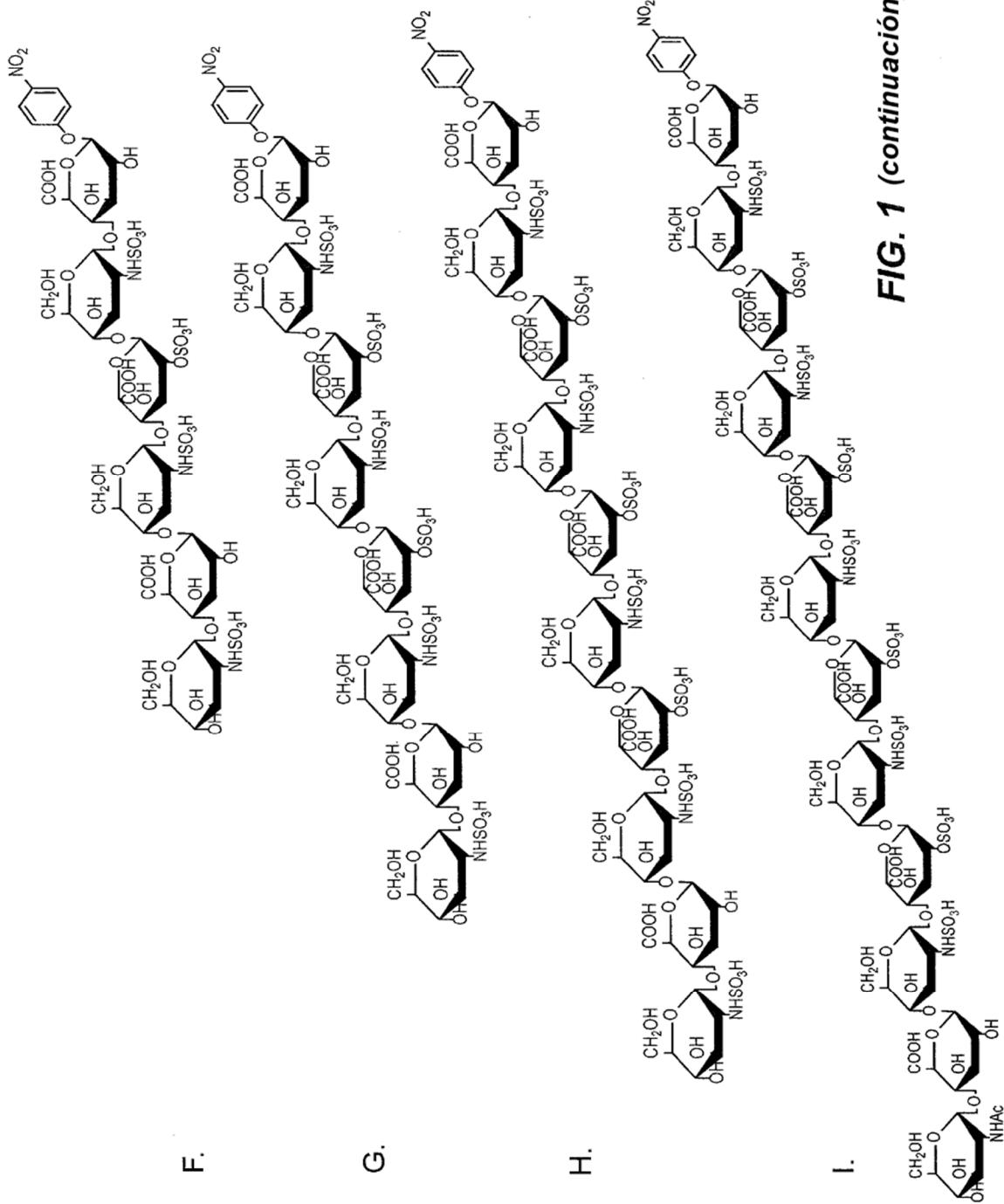


FIG. 1 (continuación)

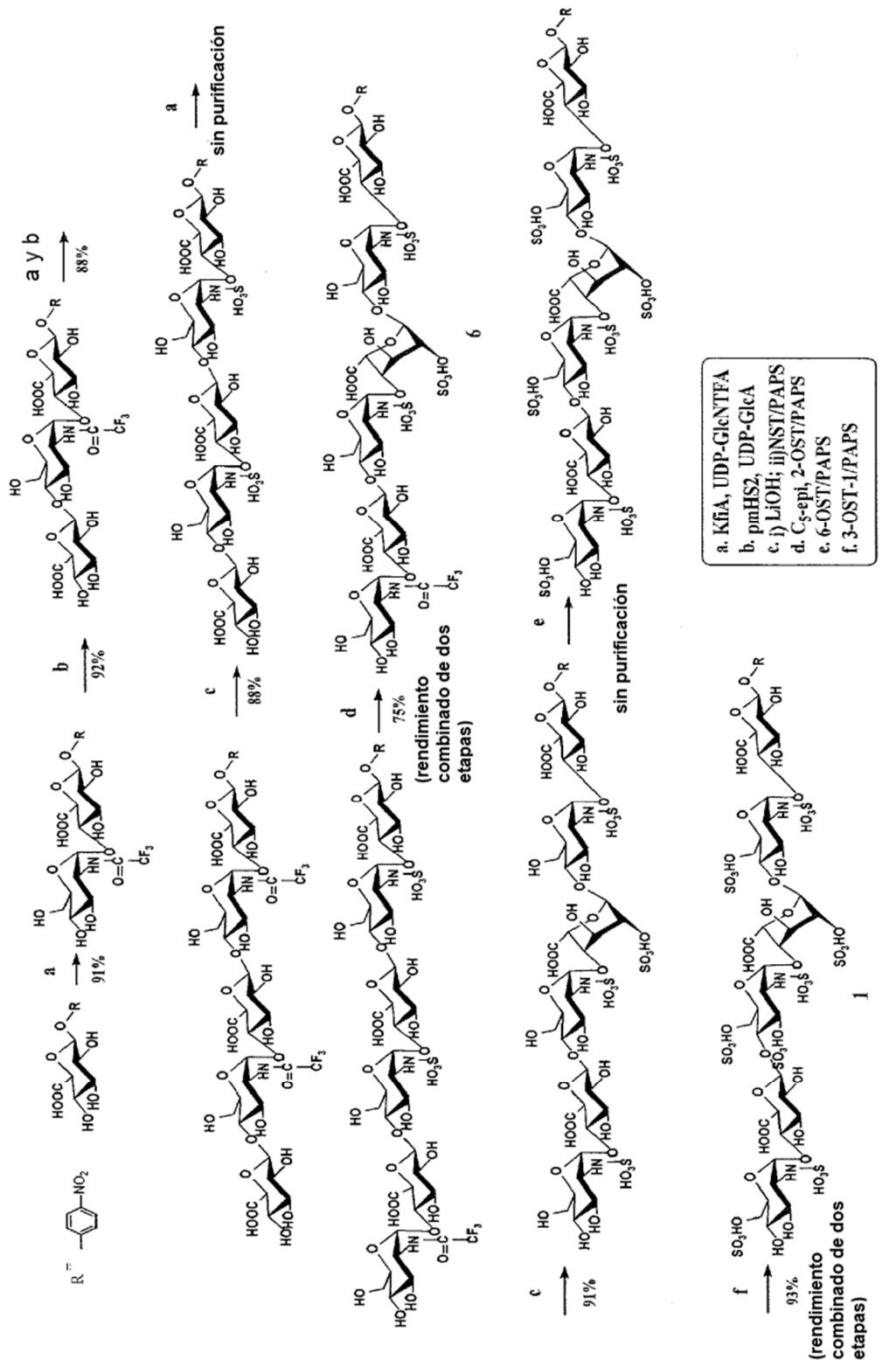


FIG. 2

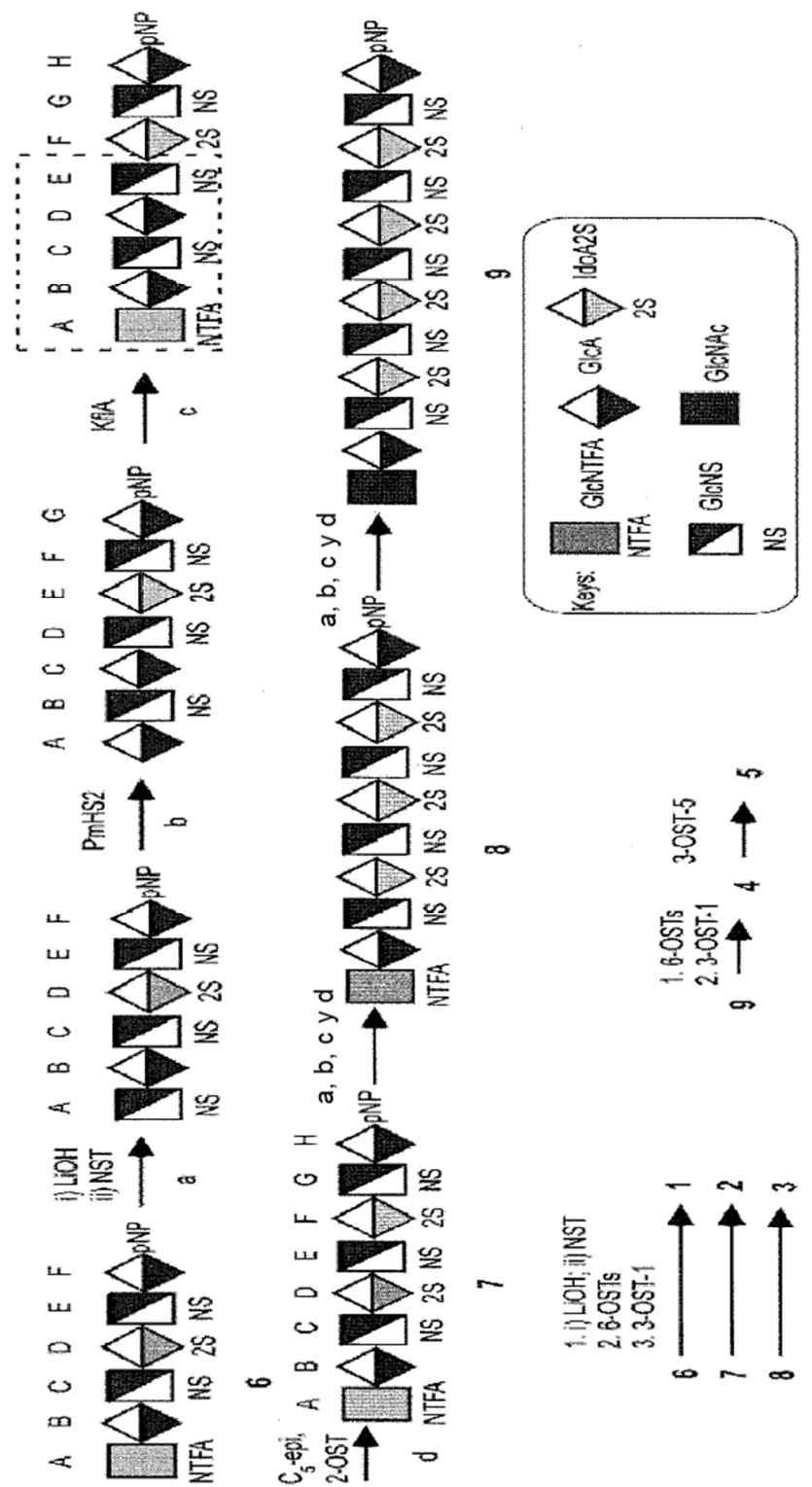
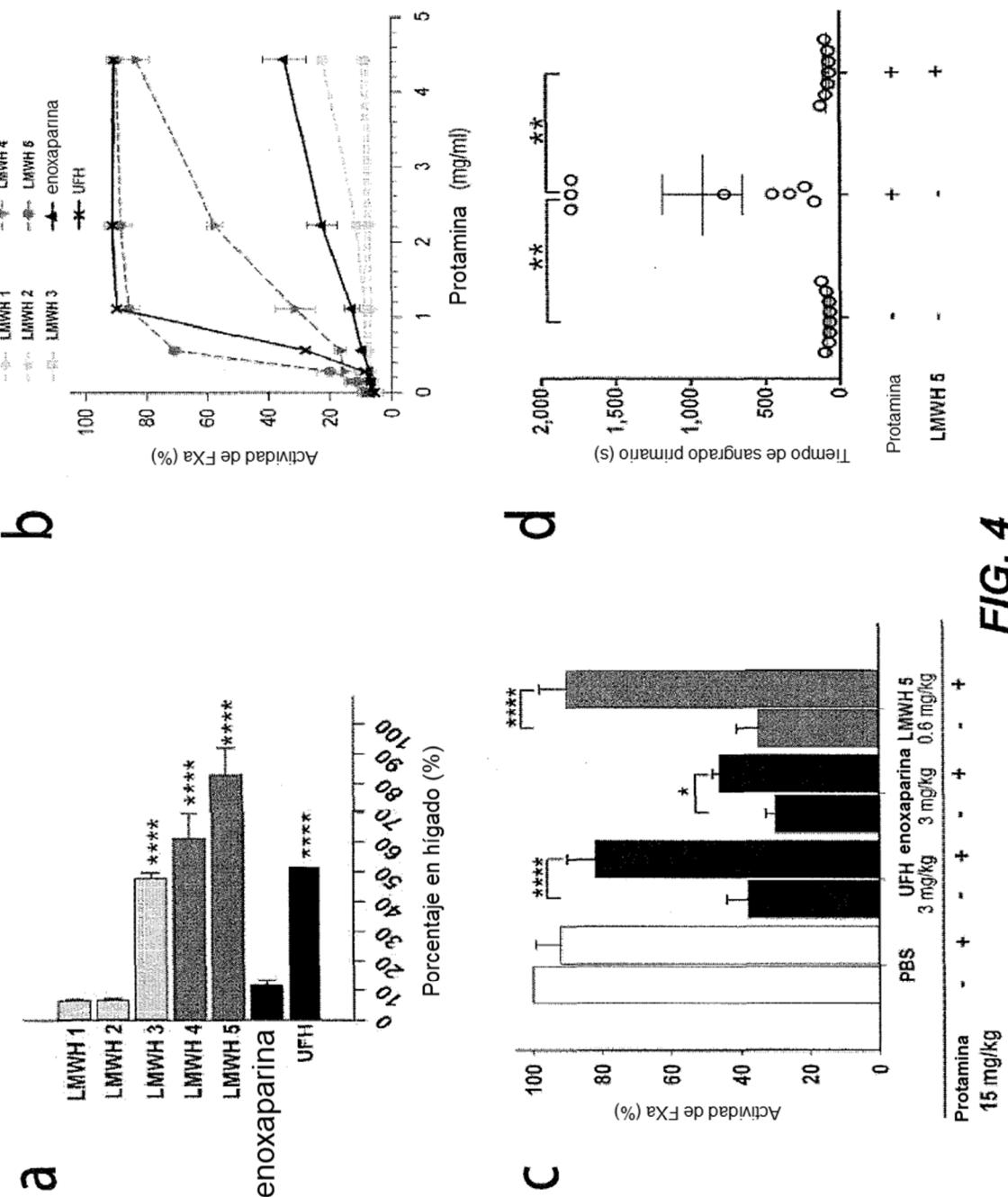


FIG. 3

**FIG. 4**

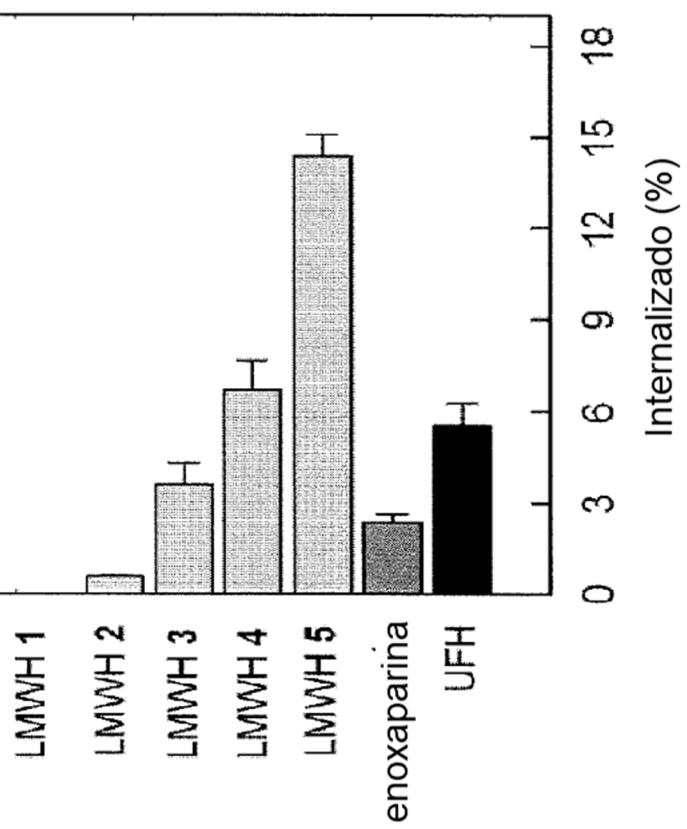


FIG. 5

FIG. 6

