



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 701**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01972994 .6**
96 Fecha de presentación : **12.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1319183**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2003**

54 Título: **Métodos y productos relacionados con heparina de peso molecular bajo.**

30 Prioridad: **12.09.2000 US 231994 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.08.2009

73 Titular/es:
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Sundaram, Mallikarjum;**
Venkataraman, Ganesh;
Shriver, Zachary;
Liu, Dongfang;
Qi, Yi, Wei y
Sasisekharan, Ram

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 324 701 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

Métodos y productos relacionados con heparina de peso molecular bajo.

5 **Antecedentes de la invención**

La coagulación es un camino fisiológico implicado en el mantenimiento de la hemostasis normal de la sangre en los mamíferos. En condiciones en las que se produce una lesión vascular, el camino de la coagulación se estimula para formar un coágulo de sangre a fin de prevenir la pérdida de sangre. Inmediatamente después que ocurre la lesión vascular, las plaquetas de la sangre comienzan a agregarse en el sitio de la lesión formando un tapón físico para detener la pérdida. Adicionalmente, el vaso lesionado sufre una vasoconstricción para reducir el flujo de sangre al área y comienza a agregarse la fibrina formando una red insoluble o coágulo, que cubre el área lesionada. Cuando un desequilibrio en el camino de la coagulación se desplaza hacia una coagulación excesiva, el resultado es el desarrollo de tendencias trombóticas, que se manifiestan a menudo como ataques cardíacos, derrames cerebrales, trombosis venosa profunda, e infartos de miocardio. Las terapias actuales para tratamiento de los trastornos asociados con los desequilibrios en el camino de la coagulación implican muchos riesgos y deben ser controladas cuidadosamente.

La heparina, un glucosaminoglucano fuertemente sulfatado afín a la heparina (HLGAG) (sic) producido por las células cebadas, es un anticoagulante muy utilizado en clínica, y es uno de los primeros fármacos biopolímeros y uno de los pocos fármacos constituidos por carbohidratos. La heparina provoca fundamentalmente su efecto por dos mecanismos, los dos cuales implican la fijación de la antitrombina III (AT-III) a una secuencia específica de pentasacárido, $H_{NAc/S,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ contenida en el polímero. En primer lugar, la fijación de AT-III al pentasacárido induce un cambio de conformación en la proteína que media su inhibición del factor Xa. En segundo lugar, la trombina (factor IIa) se fija también a la heparina en un sitio próximo al sitio de fijación de AT-III al pentasacárido. La formación de un complejo ternario entre AT-III, trombina y heparina da como resultado la desactivación de la trombina. Al contrario de su actividad anti-Xa que requiere únicamente el sitio de fijación de AT-III al pentasacárido, la actividad anti-IIA de la heparina es dependiente del tamaño, requiriendo al menos 18 unidades de sacárido para la formación eficiente de un complejo ternario AT-III, trombina, y heparina.

Además de las propiedades anticoagulantes de la heparina, su complejidad y amplia distribución en los mamíferos han conducido a la sugerencia de que la misma puede estar implicada también en una extensa gama de actividades biológicas adicionales. Los glucosaminoglucanos semejantes a la heparina (HLGAGs) presentes tanto en la superficie de la célula como en la matriz extracelular, son un grupo de polisacáridos complejos que tienen una longitud variable, coherentes en una unidad repetida de disacárido compuesta de glucosamina y un ácido urónico (ácido idurónico o ácido glucurónico). El alto grado de complejidad para los HLGAGs proviene no sólo de su polidispersidad y de la posibilidad de dos componentes de ácido urónico diferentes, sino también de la modificación diferencial en cuatro posiciones de la unidad de disacárido. Tres posiciones, a saber, C2 del ácido urónico, y las posiciones C3, C6 de las glucosamina pueden estar O-sulfatadas. Adicionalmente, C2 de la glucosamina puede estar N-acetilado o N-sulfatado. En conjunto, estas modificaciones podrían conducir teóricamente a 32 unidades de disacárido posibles, haciendo los HLGAGs potencialmente más densos en información que el DNA (4 bases) o las proteínas (20 aminoácidos). Esta enormidad de posibles variantes estructurales hace posible que los HLGAGs estén involucrados en un gran número de procesos biológicos diversos, que incluyen la angiogénesis (Sasisekharan, R., Moses, M. A., Nugent, M. A., Cooney, C. L. y Langer, R. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1524-8.), embriogénesis (Binari, R. C., Staveley, B. E., Johnson, W. A., Godavarti, R., Sasisekharan, R. y Manoukian, A. S. (1997) *Development* **124**, 2623-32; Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L. y Selleck, S. B. (1999) *Nature* **400**, 276-80; y Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N. y Michelson, A. M. (1999) *Development* **126**, 3715-23) y la formación de fibrillas β en la enfermedad de Alzheimer (McLaurin, J., Franklin, T., Zhang, X., Deng, J. y Fraser, P. E. (1999) *Eur J Biochem* **266**, 1101-10; y Lindahl, B., Westling, C., Giménez-Gallego, G., Lindahl, U. y Salmivirta, M. (1999) *J Biol Chem* **274**, 30631-5).

Aunque la heparina es muy eficaz en una diversidad de situaciones clínicas y tiene el potencial de ser utilizada en muchas otras, los efectos secundarios asociados con la terapia de heparina son muchos y variados. Efectos secundarios tales como la trombocitopenia inducida por heparina (HIT) están asociados fundamentalmente con la cadena larga de la heparina no fraccionada (UFH), que proporciona dominios de fijación para diversas proteínas. Esto ha conducido a la explosión en la generación y utilización de heparina de peso molecular bajo (LMWH) como una alternativa eficaz para UFH. Aunque la atención se ha enfocado en LMWH como sustitutos de heparina debido a su acción farmacológica más predecible, efectos secundarios reducidos, actividad antitrombótica prolongada, y mejor biodisponibilidad, existe actualmente una posibilidad limitada de normalizar el proceso de fabricación de LMWH. Dado que las LMWH se derivan de heparinas y por tanto son polidispersas y microheterogéneas, con estructura indefinida, poseen variabilidad inherente, lo que impide actualmente un proceso eficiente para su fabricación. Sería valioso tanto médica como científicamente disponer de un método coherente, de calidad controlada, eficiente en tiempo, independiente de la concentración, y altamente reproducible para fabricar heparina y otros glucosaminoglucanos.

En un intento de caracterizar las variaciones moleculares, estructurales y de actividad de la heparina, se han investigado varias técnicas para el análisis de las preparaciones de heparina. La electroforesis en gradiente de gel de poliacrilamida (PAGE) y la HPLC de intercambio de iones fuertes (SAX) han sido utilizadas para el análisis cualitativo y cuantitativo de las preparaciones de heparina. Aunque el método PAGE en gradiente puede ser útil en la determinación del peso molecular, el mismo adolece de falta de resolución, particularmente falta de resolución de

diferentes oligosacáridos que tengan el mismo tamaño. La SAX-HPLC, que está basada en la detección por absorban-
 5 de aislamiento y análisis. cía ultravioleta, es a menudo insuficientemente sensible para la detección de pequeñas cantidades de oligosacáridos estructuralmente importantes derivados de heparina. Las tecnologías actuales para purificación y análisis de heparinas y otros glucosaminoglucanos son insuficientes. Existe una gran necesidad clínica y científica de métodos mejorados

Sumario de la invención

La invención se refiere en algunos aspectos a métodos para caracterización de preparaciones de polisacáridos.
 10 Como resultado de las estructuras complejas de los sacáridos, ha sido difícil, si no imposible, caracterizar la pureza y/o actividad de las preparaciones de polisacáridos. Al contrario que las muestras de ácido nucleico y proteínas, las preparaciones de polisacáridos se caracterizan generalmente basándose en su capacidad para producir un cierto nivel de actividad en una muestra biológica. Estos ensayos no alcanzan el nivel de exactitud que puede alcanzarse por
 15 caracterización estructural directa. De acuerdo con algunos aspectos de la invención, se proporciona un método de análisis y caracterización de una muestra de polisacárido. El método implica aplicar una restricción experimental a un polisacárido en una muestra a fin de producir un polisacárido modificado que tiene un componente de firma, detección de la presencia del componente de firma en la muestra como indicación de que el polisacárido está presente en la muestra, y determinación de la presencia o ausencia del componente de firma para analizar la muestra. En algunas realizaciones, el componente de firma tiene una actividad biológica conocida y en otras realizaciones el componente de firma es biológicamente inactivo.

La restricción experimental aplicada a la muestra es cualquier tipo de manipulación que dé como resultado la iden-
 20 tificación de la presencia o ausencia del componente de firma. La restricción experimental puede, por ejemplo, ser una cualquiera sola o una combinación de los tipos siguientes de restricciones experimentales: electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de permeación en gel, resonancia magnética nuclear, modificación con una enzima tal como digestión con una exoenzima o una endoenzima, digestión química, o modificación química.

El componente de firma puede utilizarse para proporcionar información acerca de la muestra. Algunos de los usos
 30 dependen de si el componente de firma es un componente biológico activo o inactivo. Por ejemplo, en algunos casos en que el componente de firma es un componente biológico activo y la muestra es un lote de polisacárido, el componente de firma puede utilizarse para monitorizar la pureza del lote por determinación de la cantidad del componente de firma en el lote. En otras realizaciones, el método de análisis es un método para monitorización de la presencia de componentes activos en la muestra, en donde la presencia del componente de firma en la muestra es indicativa de un
 35 componente activo en la muestra. En otras realizaciones, el método de análisis es un método para la determinación de la cantidad de componentes activos en la muestra por determinación de la cantidad del componente de firma de la muestra. El método puede realizarse también al menos sobre dos muestras de tal modo que se determinan las cantidades relativas del componente de firma en cada una de las al menos dos muestras, siendo el nivel relativo más alto del componente de firma indicativo de la muestra más activa.

En algunos casos en que el componente de firma es un componente biológico inactivo, el método de análisis puede
 40 ser un método para monitorización de la presencia de componentes activos en la muestra, siendo la presencia del componente de firma en la muestra indicativa de una muestra que carece de un componente activo.

Los métodos son útiles también en algunas realizaciones para identificación de moléculas biológicamente activas.
 45 Por ejemplo, el componente de firma puede utilizarse para cribar una genoteca.

Así, en algunas realizaciones, el componente de firma es una porción biológicamente activa y de un polisacárido.
 50 Porciones biológicamente activas de polisacáridos incluyen, pero sin carácter limitante, un tetrasacárido del dominio de fijación de AT-III de la heparina, un tetrasacárido del dominio de fijación de FGF de heparina, $\Delta\text{UH}_{\text{NAc},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAc},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; y $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

En algunas realizaciones, el polisacárido es un glucosaminoglucano, tal como una heparina de peso molecular bajo
 55 (LMWH), heparina, una heparina preparada por medios biotecnológicos, una heparina modificada químicamente, una heparina sintética, y un sulfato de heparano.

En otra realización, el polisacárido contenido en la muestra se compara con una base de datos de referencia de
 60 polisacáridos de tamaño idéntico que el polisacárido, en donde los polisacáridos de la base de datos de referencia se han sometido también a las mismas restricciones experimentales que el polisacárido de la muestra, proporcionando la comparación un análisis de la composición del polisacárido de la muestra.

En algunas realizaciones preferidas, la muestra es un producto farmacéutico. En otras realizaciones, la muestra es
 una muestra biológica, tal como una muestra de sangre.

Un método para evaluar la calidad de una muestra de polisacáridos se proporciona de acuerdo con otros aspectos
 65 de la invención. El método implica identificar un componente contenido en la muestra de polisacárido, determinar un valor cuantitativo de la cantidad de componente, en donde el valor cuantitativo del componente es indicativo de la calidad de la muestra de polisacárido. En una realización, el método implica identificar al menos dos componentes

ES 2 324 701 T3

en la muestra de polisacárido y determinar un valor cuantitativo de la cantidad de cada uno de los al menos dos componentes para evaluar la calidad de la muestra de polisacárido.

5 El valor cuantitativo puede calcularse por una diversidad de métodos diferentes, que dependen del modo en que se procesa la muestra para identificar el componente. Por ejemplo, el valor cuantitativo puede calcularse como el área bajo la curva cuando la muestra se procesa por electroforesis capilar, como el factor de respuesta, o como la cantidad relativa en porcentaje de cada fracción presente en la muestra.

10 En una realización, el paso de calcular la cantidad relativa en porcentaje de cada fracción presente en la muestra se determina de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{PRA} = \text{RF} \times \text{AUC}_{\%R}$$

15 en donde

PRA = cantidad relativa en porcentaje de cada fracción

RF = factor de respuesta

20 $\text{AUC}_{\%R}$ = AUC relativa en porcentaje $[(100 \times \text{AUC}_C)/\text{AUC}_T]$

AUC_C = área bajo la curva para un componente

25 AUC_T = la suma del área bajo la curva para todos los componentes.

En otro método de realización implementado por ordenador para generar una estructura de datos, materializada tangiblemente en un medio legible por ordenador, que representa un valor cuantitativo de un componente de un polisacárido, comprendiendo el método un acto de realización del cálculo anterior (sic).

30 En una realización, el componente es el componente de firma $\Delta\text{UH}_{\text{Nac},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{Nac},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

35 En algunas realizaciones, el método de degradación química se selecciona del grupo que incluye despolimerización oxidante con H_2O_2 o Cu^+ y H_2O_2 , escisión desaminante con nitrito de isoamilo, o ácido nitroso, escisión β -eliminadora con éster bencílico de heparina por tratamiento alcalino o por heparinasa.

40 En otras realizaciones, el glucosaminoglucano se selecciona del grupo constituido por heparina, análogos de heparina, LMWH, heparina biotecnológica, heparina modificada químicamente, o heparina sintética.

Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para analizar o evaluar una muestra en donde la muestra es una preparación de LMWH.

45 En algunos aspectos, la preparación de LMWH puede tener al menos 15% de disacáridos disulfatados, menos de 75% de disacáridos trisulfatados, 3-5% de disacáridos monosulfatados, y al menos 2% de tetrasacárido 4-7.

En algunas realizaciones, la preparación de LMWH incluye al menos 3,5%, 4,0%, ó 5% de $\Delta\text{UH}_{\text{Nac},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{Nac},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

50 La preparación de LMWH puede incluir al menos 3,5%, 4,0%, ó 5,0% de $\Delta\text{UH}_{\text{Nac},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{Nac},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

55 Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar diversas realizaciones de la invención. Por esta razón, se prevé que todas las limitaciones de la invención que implica un elemento cualquiera o combinaciones de elementos pueden incluirse en cada uno de los aspectos de la invención.

Breve descripción de los dibujos

60 La Figura 1 es un espectro de masas MALDI del complejo protonizado de AT-10 con $(\text{RG})_{19}\text{R}$.

La Figura 2 muestra el tratamiento de AT-10 con heparinasa. (A) Tratamiento incompleto de AT-10 con heparinasa I. En las condiciones utilizadas en este estudio, la heparinasa I escinde un enlace glicosídico que contiene un $\text{I}_{2\text{S}}$. (B) Espectro de masas MALDI de fragmentos de AT-10 procedentes de la digestión exhaustiva con heparinasa I. (C) El espectro de masas MALDI de AT-10 marcado y tratado con heparinasa I exhibe 5 fragmentos: uno con peso molecular de 576,7 Da (atribuible a \pm D), dos tetrasacáridos con peso molecular de 1037,9 (*) y 1154,0 Da, y un hexasacárido marcado másico con un peso molecular de 1671,4 (masa de 1715,3 más el marcador másico de 56,1). Dado que la eficiencia de acoplamiento era \sim 90%, se observa también un hexasacárido sin marcar (masa de 1615,1).

La Figura 3 representa la degradación exhaustiva de AT-10 con ácido nitroso. El ácido nitroso escinde en los residuos H_{NS} , dejando como residuo una anhidromanosa ($\Delta = 97,1$ Da). En el recuadro se muestra el espectro de masas del perfil de degradación cuando la muestra se trató con iduronidasa (arriba), glucosamina-6-O-sulfatasa (centro) y glucuronidasa (abajo) en dicho orden.

5

La Figura 4 es un espectro de masas MALDI que muestra la degradación parcial de AT-10 con ácido nitroso.

La Figura 5 muestra las estructuras de los tres compuestos modelo de oligosacáridos utilizados en este estudio. (A) El pentasacárido 1 (Penta 1) tiene la secuencia $H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$, contiene un sitio de fijación de AT-III intacto y tiene un peso molecular calculado de 1508,2. Los dos enlaces glicosídicos potencialmente sensibles a la escisión por heparinasa I, II o III están marcados como A.1 y A.2. (B) El pentasacárido 2 (Penta 2), con la secuencia $H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$, y un peso molecular calculado de 1428,1, es estructuralmente idéntico a Penta 1, menos un 3-O-sulfato en la glucosamina interna, por lo que no contiene un sitio AT-III completo. Como en el caso de Penta 1, los enlaces potencialmente sensibles a la escisión por heparinasa están marcados B.1 y B.2. (C) Se utilizó también en este estudio un hexasacárido derivado de heparinasa (Hexa 1), con la secuencia $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Hexa 1 (peso molecular calculado 1614,3) contiene sólo un sitio de fijación de AT-III parcialmente intacto; análogamente a AT-10, falta la unidad de disacárido del extremo reductor $I_{2S}H_{NS,6S}$. Como en el caso de Penta 1 y Penta 2, los sitios de escisión potencial están marcados como C.1, C.2.

10

15

20

La Figura 6 es un espectro de masas MALDI de los productos de digestión con (A) heparinasa I, (B) heparinasa II, y (C) heparinasa III de Penta 1. Heparinasa I y II cortan Penta 1 en el enlace $G_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ (sitio A.2) para dar un disacárido pentasulfatado y un producto disacárido trisulfatado. Penta 1 no es escindible por heparinasa III.

25

La figura 7 es un espectro de masas MALDI de los productos de digestión con (A) heparinasa I, (B) heparinasa II, y (C) heparinasa III de Penta 2 complejados con $(RG)_{19}R$.

La Figura 8 es un espectro de masas MALDI de los productos de digestión con (A) heparinasa I, (B) heparinasa II, y (C) heparinasa III de Hexa 1 complejados con $(RC)_{19}R$.

30

La Figura 9 muestra la titulación por fluorescencia de AT-III con heparina de longitud total (●) o AT-10 (◆) a pH 6,0 $I = 0,025$. Los datos se representan gráficamente como la relación de fluorescencia de AT-III después de la introducción de sacárido a la fluorescencia inicial de AT-III (I/I_0) frente a la concentración de sacárido añadida. Los datos se ajustaron por regresión no lineal y se determinó el valor K_D . Para la heparina, el valor K_D medido era 10 nM, mientras que para AT-10 este valor era 800 nM. El recuadro muestra la fijación de heparina a AT-III a pH 7,4 $I = 0,15$. El valor K_D medido de 36 nM concuerda favorablemente con otras determinaciones de la afinidad de heparina para AT-III.

35

La Figura 10 muestra el análisis funcional del decaesacárido AT-10 y su comparación con el pentasacárido de fijación de AT-III. La actividad anticoagulante *in vitro* del decaesacárido AT-10 (▲) se comparó con el pentasacárido sintético (■) o enoxaparina (⊠) una heparina de peso molecular bajo generada por escisión química de la heparina. Las actividades de los tres compuestos se evaluaron por medida de (A) actividad anti-IIa, (B) la actividad anti-Xa, o (C) actividad anti-Xa utilizando el factor Xa purificado, o (D) vía HepTest. Asimismo, se midieron el tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT) y el tiempo de protrombina (PT), en donde ninguno de los compuestos exhibía actividad significativa, coherente con su alta relación de actividad anti-Xa:anti-IIa.

40

Las Figuras 11A y 11B muestran gráficos del análisis de composición de UFH derivada de mucosa intestinal de porcino. Se digirió UFH con Heparinasa I, II, y III y se sometió a Electroforesis Capilar (CE). El pico 1 (Figura 9A) se confirmó así como el disacárido trisulfatado $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$. Los picos 2, 3, y 4 son disacáridos disulfatados, y 5, 6, y 7 son disacáridos monosulfatados. El pico 8 es el tetrasacárido $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Además de éstos, existe una pequeña cantidad de disacáridos no sulfatados que migran de modo mucho más lento que los sacáridos sulfatados, como se muestra en la Figura 9B.

50

La Figura 12 muestra la traza CE del producto de digestión exhaustiva del pentasacárido AT-10 (sic) $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$. El tetrasacárido del pico 8 en el producto de digestión exhaustiva de heparina tiene la misma masa y tiempo de migración que $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

55

La Figura 13 es un gráfico de actividad anti-factor Xa para fracciones diferentes de UFH como una función de su contenido de $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Un gráfico de actividad anti-factor Xa como función de % $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$ da una línea recta con $r = 0,91$.

60

Descripción detallada

La invención implica varios descubrimientos que han conducido a nuevos avances en el campo de la biología de los polisacáridos. Uno de los problemas principales en la caracterización de los polisacáridos es consecuencia de su diversidad estructural. Esta diversidad estructural es uno de los factores que han hecho difícil estudiar las relaciones secuencia-función para los polisacáridos. La síntesis química de oligosacáridos definidos se ha utilizado en el estudio de la contribución relativa a las actividades biológicas, tales como la fijación con afinidad alta a AT-III de modifica-

65

- ciones específicas en la secuencia de pentasacáridos de heparina (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Sin embargo, tales métodos de síntesis son complejos y no han sido aplicados extensamente al estudio de otras secuencias biológicas. Un enfoque alternativo que implica fraccionamiento por afinidad de polisacáridos con proteínas de interés y caracterización subsiguiente ha proporcionado alguna información global en relación con los patrones de sulfatación de los polisacáridos que determinan afinidad (Parthasarathy, N., Gotow, L. F., Bottoms, J. D., Kute, T. E., Wagner, W. D. y Mulloy, B. (1998) *J Biol Chem* 273, 21111-4.; Sasaki, T., Larsson, H., Kreuger, J., Salmivirta, M., Claesson-Welsh, L., Lindahl, U., Hohenester, E. y Timpl, R. (1999) *Embo J* 18, 6240-8; y Kreuger, J., Prydz, K., Pettersson, R. F., Lindahl, U. y Salmivirta, M. (1999) *Glycobiology* 9, 723-9).
- La invención está basada, en un aspecto, en un nuevo método para caracterización de muestras de polisacáridos. Se ha descubierto que las secuencias de polisacáridos pueden secuenciarse rápida y exactamente a fin de identificar un componente de firma del polisacárido. El componente de firma puede utilizarse para caracterizar la muestra de polisacárido de maneras que no eran posibles anteriormente. El análisis de polisacáridos de grado farmacéutico está regido por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y otras farmacopeas nacionales. Por regla general, los tipos de análisis requeridos para los polisacáridos son ensayos funcionales y en algunos casos ensayos estructurales muy generales. Los ensayos que están siendo utilizados actualmente para determinar la actividad/pureza de una preparación de heparina disponible comercialmente son un ensayo de coagulación *in vitro* y un test para endotoxinas bacterianas. Se ha determinado que la cantidad de heparina es aquella cantidad que hará que 1 ml de plasma de oveja experimente semicoagulación cuando se mantiene durante 1 hora a 20°C en comparación con un estándar USP de referencia (definido como unidades/ml) o el estándar Quinto Internacional para Heparina no Fraccionada (WHO-5) (definido como Unidades Internacionales/ml). (Linhardt, R. J. y Gunay, N. S. (1999) *Semin Thromb Hemost* 25, 5-16). Comparados con los requisitos reguladores estrictos para otros fármacos (no polisacáridos), estos estándares de caracterización están anticuados.
- Los métodos de la invención proporcionan una vía mucho más exacta para caracterización de estas muestras. Los métodos implican manipular una muestra que contiene polisacárido a fin de identificar la presencia o ausencia de un componente de firma. Puede determinarse la cantidad del componente de firma presente en la muestra. La cantidad de componente de firma proporciona una caracterización exacta de la muestra.
- Así, en algunos aspectos, la invención es un método de análisis de una muestra por aplicación de una restricción experimental a un polisacárido en una muestra, para producir un polisacárido modificado, que tiene un componente de firma, detectar la presencia del componente de firma en la muestra como indicación de que el polisacárido está presente en la muestra, y determinar la presencia o ausencia del componente de firma para analizar la muestra.
- Un "polisacárido" es un polímero compuesto de monosacáridos enlazados unos a otros. En muchos polisacáridos, el bloque de construcción básico del polisacárido es realmente una unidad de disacárido, que puede ser repetitiva o no repetitiva. Así, una unidad, cuando se utiliza con respecto a un polisacárido, hace referencia a un bloque de construcción básico de un polisacárido y puede incluir un bloque de construcción monómero (monosacárido) o un bloque de construcción dímero (disacárido).
- Los métodos para caracterización de muestras de polisacáridos se desarrollaron basándose en el análisis experimental de glucosaminoglucanos afines a heparina (HLGAGs), pero las propiedades expuestas en esta memoria pueden extenderse a otros polisacáridos. Los métodos de la invención se expondrán con respecto a HLGAGs como ejemplo, pero los métodos no se limitan a HLGAGs. Así, en una realización, la muestra de polisacárido a analizar incluye HLGAGs o glucosaminoglucanos. Como se utilizan en esta memoria, los términos "HLGAG" y "glucosaminoglucanos" se utilizan intercambiamente para hacer referencia a una familia de moléculas que tienen estructuras y propiedades afines a la heparina. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitante, heparina de peso molecular bajo (LMWH), heparina, heparina preparada biotecnológicamente, heparina modificada químicamente, heparina sintética, y sulfato de heparano. El término "heparina biotecnológica" abarca heparina que se prepara a partir de fuentes naturales de polisacáridos que han sido modificados químicamente y se describe en Razi *et al.*, *Biochem. J.* (1995, 15 de julio); 309 (parte 2): 465-72. La heparina modificada químicamente se describe en Yates *et al.*, *Carbohydrate Res* (1996, 20 de noviembre); 294: 15-27, y es conocida por los expertos en la técnica. La heparina sintética es bien conocida por los expertos en la técnica y se describe en Petitou, M. *et al.*, *Bioorg. Med Chem Lett.* (1999, 19 de abril); 9(8): 1161-6.
- Como se muestra en los ejemplos siguientes, la secuencia de un decaacárido fraccionado de AT-III (AT 10), que puede utilizarse como componente de firma de HLGAGs, ha sido identificada utilizando un esquema de nomenclatura codificada en propiedades/espectrometría de masas (PEN-MALDI), una metodología de secuenciación descrita en las Solicitudes de Patente US Núms. de Serie 09/557.997 y 09/558.137 presentadas el 24 de abril de 2000, que tienen inventores comunes, y Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42. Secuenciación Integral de Glucanos (IGS) (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. y Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2698-703.) y análisis por resonancia magnética nuclear del protón (¹H NMR) del decaacárido son coherentes con los resultados de PEN-MALDI. La flexibilidad de esta estrategia de secuenciación se demuestra también por el hecho de que es posible deducir información de secuencia para oligosacáridos contaminantes, si están presentes. La secuenciación de un sacárido químicamente complejo fraccionado de AT-III (con inclusión de la rara sulfatación en 3-O de la glucosamina) estableció una metodología que puede extenderse al análisis de otros oligosacáridos HLGAG de interés, por ejemplo aquellos HLGAGs con propiedades de fijación de factores de crecimiento. Una metodología de secuenciación directa para estos tipos de secuencias ha hecho posibles estudios estructura-función de esta clase importante de moléculas.

ES 2 324 701 T3

Los HLGAGs y otros polisacáridos tienen todos ellos componentes de firma. Un “componente de firma” es un oligosacárido que está presente en y es característico de un polisacárido particular. Las propiedades de la firma seleccionada pueden depender del tipo de polisacárido que se estudia y del tipo de restricción experimental aplicada al polisacárido. La firma es un elemento reproducible de un polisacárido particular que se manipula con una restricción experimental particular. Por ejemplo, algunas firmas de los HLGAGs que han sido identificadas y cuya utilidad se ha demostrado son $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$; o $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$. Cuando una muestra que contiene HLGAG se somete a electroforesis capilar después de tratamiento con heparinasa, esta firma será identificada y es susceptible de ser cuantificada.

El componente de firma puede ser biológicamente activo o inactivo. Puede derivarse una información importante del componente de firma tanto si el mismo es un componente activo como si se trata de un componente inactivo. Una firma que tiene actividad biológica es un oligosacárido que se sabe produce una función biológica específica. Por ejemplo, se sabe que los tetrasacáridos $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$; o $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ forman parte de las secuencias que poseen actividad anticoagulante, dando como resultado la inhibición del factor Xa. Por tanto, la presencia de este componente en una muestra es directamente indicativa de la actividad anti-coagulante del HLGAG.

Las firmas que tienen actividad biológica pueden utilizarse para una diversidad de propósitos. Por ejemplo, estos tipos de firmas son útiles para monitorizar la variabilidad lote-a-lote de una preparación de polisacárido. La pureza de cada lote puede determinarse por determinación de la cantidad de componente activo de firma en el lote. Estas firmas son útiles también para monitorizar la presencia de componentes activos en la muestra, cuando la presencia del componente de firma en la muestra es indicativa de un componente activo en la muestra. Por ejemplo, el componente de firma puede utilizarse para seguir el componente activo a lo largo de un procedimiento de procesamiento. Utilizando este método, es posible testar los productos después de cada paso de separación para determinar qué fracción contiene el componente biológicamente activo. La cantidad de componentes activos en la muestra puede cuantificarse también por determinación de la cantidad de componente de firma en la muestra.

Los métodos pueden realizarse también sobre al menos dos muestras a fin de determinar qué muestra tiene la actividad máxima o comparar de algún otro modo la pureza de las muestras. En este caso, se determinan las cantidades relativas de componente de firma en cada una de las al menos dos muestras. El nivel máximo relativo de componente de firma es indicativo de la muestra más activa.

Adicionalmente, la firma activa puede utilizarse para identificar moléculas biológicamente activas por cribado de compuestos o genotecas de compuestos. Las genotecas incluyen, por ejemplo, genotecas de presentación de fago, genotecas combinatorias, genotecas de peptoides y restos de síntesis no peptídicos. La presentación de fago puede ser particularmente eficaz en la identificación de péptidos que interactúan con los componentes de firma, con inclusión de anticuerpos humanos. Resumidamente, se prepara una genoteca de fagos (utilizando v.g. los fagos m13, fd, o lambda), presentando inserciones de 4 a aproximadamente 80 residuos de aminoácidos con utilización de procedimientos convencionales. Las inserciones pueden representar, por ejemplo, una red totalmente degenerada o sesgada. Es posible seleccionar luego inserciones portadoras de fago que se fijan al componente de firma. Este proceso puede repetirse a lo largo de varios ciclos de reelección de fago que se fijan al componente de firma. Las tandas repetidas conducen al enriquecimiento de secuencias particulares portadoras del fago. El análisis de secuencias de DNA puede conducirse para identificar las secuencias de los polipéptidos expresados. Puede determinarse la porción lineal mínima de la secuencia que se fija al componente de firma. Es posible repetir el procedimiento utilizando una genoteca sesgada que contiene inserciones que contienen parte o la totalidad de la porción lineal mínima más uno o más residuos degenerados adicionales aguas arriba o aguas abajo de la misma. Pueden utilizarse también métodos de cribado de levadura de dos híbridos para identificar polipéptidos que se fijan al componente de firma. Genotecas peptídicas y no peptídicas que están basadas en un componente de firma conocido pueden ser generadas fácilmente por los expertos en la técnica. Entidades comerciales tales como ArQule (Woburn, MA) fabrican genotecas preparadas por encargo para la generación de compuestos miméticos.

Ejemplos de porciones biológicamente activas de un polisacárido incluyen, pero sin carácter limitante, un tetrasacárido del dominio de fijación de AT-III de heparina, un tetrasacárido del dominio de fijación de FGF de heparina, $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$; o $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$.

Las firmas que son biológicamente inactivas son oligosacáridos que no están asociados con una función biológica específica conocida. Estos oligosacáridos pueden tener alguna función biológica, pero no la función específica que se analiza. Por ejemplo, el oligosacárido puede causar realmente una inhibición del crecimiento de las células tumorales, pero no tener efecto alguno sobre la cascada de la coagulación. Si la muestra de polisacárido está siendo evaluada con el propósito de identificar la presencia o la cantidad de polisacáridos que son útiles para propósitos anti-coagulación, se considera que el oligosacárido que se detecta es una firma biológicamente inactiva. Por el contrario, si la muestra de polisacárido está siendo evaluada con el propósito de identificar la presencia o cantidad de polisacáridos que son útiles para la prevención de la proliferación de las células tumorales, se considera que el oligosacárido que se detecta es una firma biológicamente activa.

Las firmas que son biológicamente inactivas pueden utilizarse para algunos de los mismos propósitos que las firmas biológicamente activas, así como para otros propósitos. Las firmas biológicamente inactivas pueden utilizarse también para monitorizar la variabilidad lote a lote de una preparación de polisacáridos. Puesto que se están comparando uno a

otro dos lotes, pueden utilizarse tanto firmas inactivas como firmas activas. Los componentes de firma inactivos pueden utilizarse también para monitorizar la presencia de componentes activos en la muestra cuando la presencia del componente de firma en la muestra es indicativa de una muestra que carece de una actividad específica o que tiene niveles inferiores de esta actividad. Así, si la presencia de un componente de firma inactivo es inversamente proporcional a la presencia de un componente activo, entonces la presencia del componente inactivo puede proporcionar información importante acerca de la actividad de la muestra. Por ejemplo, si el componente de firma inactivo es un producto de degradación de un componente activo de un polisacárido, entonces la presencia del componente inactivo indica que algo del componente activo se ha descompuesto y por tanto la muestra es menos activa que lo sería en el caso de que no estuviera presente el componente inactivo.

Una “restricción experimental”, como se utiliza en esta memoria, es un proceso bioquímico realizado sobre una muestra de polisacárido que da como resultado una modificación de la muestra que permite que la detección de la firma. Restricciones experimentales incluyen, pero sin carácter limitante, métodos de separación, v.g. espectrometría de masas, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de permeación de gel, resonancia magnética nuclear; digestión enzimática, v.g., con una exoenzima o una endoenzima; digestión química; modificación química; desprendimiento químico (es decir, eliminación de una unidad de monosacárido); y modificación enzimática, por ejemplo sulfatación en una posición particular con una sulfotransferasa de sulfato de heparano.

La firma puede identificarse por cualquier medio que sea coherente con la restricción experimental utilizada. El peso molecular de un componente de firma, por ejemplo, puede determinarse por varios métodos que incluyen espectrometría de masas. El uso de espectrometría de masas para determinación del peso molecular de los polisacáridos es bien conocido en la técnica. La Espectrometría de Masas ha sido utilizada como una herramienta potente para caracterizar polisacáridos debido a su exactitud (± 1 Dalton) en la información de las masas de fragmentos generadas (v.g. por escisión enzimática), y también debido a que se requieren únicamente concentraciones de muestra del orden de pM. Por ejemplo, se ha descrito la espectrometría de masas por ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS) para la identificación del peso molecular de fragmentos de polisacáridos en publicaciones tales como Rhomberg, A. J. *et al*, *PNAS, USA*, v. 95, p. 4176-4181 (1998); Rhomberg, A. J. *et al*, *PNAS, USA*, v. 95, p. 12232-12237 (1998); y Ernst, S. *et al.*, *PNAS, USA*, v. 95, p. 4182-4187 (1998). Otros tipos de espectrometría de masas conocidos en la técnica, tales como MS con pulverización electrónica, espectrometría de masas con bombardeo de átomos rápidos (FAB-MS) y espectrometría de masas con disociación activada por colisión (CAD) pueden utilizarse también para identificar el peso molecular de los fragmentos de polisacáridos.

Los datos de espectrometría de masas pueden ser un instrumento valioso para averiguar información acerca del componente de firma del polisacárido solo o después que el polisacárido ha sufrido degradación con enzimas o productos químicos. Después que se ha identificado el peso molecular de un polisacárido, puede compararse el mismo con pesos moleculares de otros polisacáridos conocidos (v.g. utilizando los métodos de las Solicitudes de Patente de EE.UU. Núms. 09/557.997 y 09/558.137 presentadas el 24 de abril de 2000). Como se muestra en estas solicitudes de patente, una técnica para comparar pesos moleculares consiste en generar una línea de masas y comparar el peso molecular del polisacárido desconocido con la línea de masas a fin de determinar una subpoblación de polisacáridos que tienen el mismo peso molecular. Una “línea de masas” es una base de datos de información, preferiblemente en la forma de un gráfico o diagrama que almacena información para cada tipo posible de polisacárido que tenga una secuencia única basada en el peso molecular del polisacárido. Dado que los datos de espectrometría de masas indican la masa de un fragmento con exactitud de 1 Da, puede asignarse una longitud únicamente a un fragmento por consulta de una masa en la línea de masas. Adicionalmente, puede determinarse a partir de la línea de masas que, dentro de un fragmento de una longitud particular mayor que un disacárido, existe un mínimo de 4,02 Da diferente en masas que indica que dos grupos acetato (84,08 Da) han reemplazado a un grupo sulfato (80,06 Da). Por tanto, puede determinarse un número de sulfatos y acetatos de un fragmento de polisacárido a partir de la masa proporcionada por los datos de espectrometría de masas, y puede asignarse dicho número al fragmento de polisacárido.

Además del peso molecular, pueden determinarse otras propiedades de un componente de firma. Las relaciones de composición de los sustituyentes o unidades químicas (cantidad y tipo de sustituyentes o unidades químicas totales) pueden determinarse utilizando metodología conocida en la técnica, tal como electroforesis capilar. Un polisacárido puede someterse a una primera restricción experimental tal como degradación enzimática o química para separar el polisacárido en fragmentos más pequeños. Estos fragmentos pueden someterse luego a una segunda restricción experimental, es decir, pueden separarse utilizando electroforesis capilar para determinar la cantidad y tipo de sustituyentes o unidades químicas presentes en el polisacárido. Alternativamente, el polisacárido puede someterse a una sola restricción experimental tal como electroforesis capilar, sin degradación enzimática previa.

En el método de electroforesis capilar en gel, pueden analizarse muestras de reacción por capilares de pequeño diámetro llenos de gel. El pequeño diámetro de los capilares (50 μm) permite la disipación eficiente del calor generado durante la electroforesis. Así, pueden utilizarse altas intensidades de campo sin calentamiento Joule excesivo (400 V/m), reduciendo el tiempo de separación a aproximadamente 20 minutos para cada ejecución de la reacción, aumentando con ello la resolución con respecto a la electroforesis en gel convencional. Adicionalmente, pueden analizarse muchos capilares en paralelo, permitiendo la amplificación de la información de polisacáridos generada.

Pueden utilizarse también otros métodos para evaluación del componente de firma. Por ejemplo, otros métodos incluyen métodos que están basados en parámetros tales como la viscosidad (Jandik, K.A., Gu, K. y Linhardt, R.J., (1994), *Glycobiology*, 4:284-296) o la absorbancia UV total (Ernst, S. *et al.*, (1996), *Biochem. J.*, 315:589-597).

ES 2 324 701 T3

Los fragmentos HLGAG pueden degradarse utilizando enzimas tales como enzimas heparina-lias (heparinasas) o ácido nitroso, y los mismos pueden modificarse también utilizando enzimas diferentes que transfieren grupos sulfato a las posiciones mencionadas anteriormente o eliminan los grupos sulfato de dichas posiciones. Las enzimas modificadoras son exolíticas y no progresivas, lo que significa que las mismas actúan una sola vez sobre el extremo no reductor y se soltarán de la cadena de heparina sin modificar posteriormente el resto de la cadena. Para cada una de las posiciones modificables en la unidad de disacárido existe una enzima modificadora. Una enzima que añade un grupo sulfato se conoce como una sulfotransferasa, y una enzima que elimina grupos sulfato se denomina sulfatasa. Las enzimas modificadoras incluyen 2-O-sulfatasa/sulfotransferasa, 3-O-sulfatasa/sulfotransferasa, 6-O-sulfatasa/sulfotransferasa y N-desacetilasa-N-sulfotransferasa. La función de estas enzimas es evidente por sus nombres, por ejemplo una 2-O-sulfotransferasa transfiere un grupo sulfato a la posición 2-O de un ácido idurónico (el ácido glucurónico 2-O-sulfatado es un suceso raro en las cadenas de HLGAG) y una 2-O-sulfatasa elimina el grupo sulfato de la posición 2-O de un ácido idurónico.

Las enzimas degradantes de HLGAG incluyen, pero sin carácter limitante, heparinasa-I, heparinasa-II, heparinasa-III, D-glucuronidasa y L-iduronidasa, versiones modificadas de heparinasas, variantes y fragmentos funcionalmente activos de las mismas. Las tres heparinasas de *Flavobacterium heparinum* son instrumentos enzimáticos que han sido utilizados para la generación de heparina LMWH (5.000-8.000 Da) y heparina de peso molecular ultra-bajo (~ 3000 Da). La heparinasa I escinde las regiones altamente sulfatadas de HLGAGs en los ácidos urónicos sulfatados en 2-O, mientras que la heparinasa II tiene una especificidad de sustrato más amplia y escinde enlaces glicosídicos que contienen ácidos urónicos tanto sulfatados en 2-O como no sulfatados (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. y Sasisekharan, R. (1995) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 387-444). La heparinasa III, en oposición a la heparinasa I, escinde fundamentalmente regiones infrasulfatadas de HLGAGs, a saber, enlaces glicosídicos que contienen un ácido urónico no sulfatado (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. y Sasisekharan, R. (1995) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 387-444). Investigaciones múltiples acerca de la especificidad de sustrato de las heparinasas han aumentado su utilidad como instrumentos para el establecimiento de las relaciones estructura-función para HLGAGs. Varias patentes y solicitudes de patente describen modificaciones y variantes y fragmentos de heparinasa útiles, con inclusión de la patente US 6.217.863 B1 y las solicitudes pendientes 09/384.959 y 09/802.285. Otras modificaciones y variantes son también útiles. Se requiere una comprensión más detallada para maximizar su utilidad como generadores de LMWH farmacológica. Los descubrimientos de la invención proporcionan algo más de este detalle (como se describe más adelante).

Glucuronidasa e iduronidasa, como sugiere su nombre, escinden en el enlace glicosídico después de un ácido glucurónico y ácido idurónico respectivamente. El ácido nitroso corta aleatoriamente en los enlaces glicosídicos después de una hexosamina N-sulfatada y convierte el anillo de hexosamina de 6 miembros en un anillo de anhidromanitol de 5 miembros.

Los métodos para análisis de polisacáridos por identificación de la presencia de un componente de firma pueden utilizarse para proporcionar una evaluación cualitativa del polisacárido (v.g., si el componente de firma está presente o ausente) o una evaluación cuantitativa (v.g. la cantidad de componente de firma presente que indica cualidades de la muestra tales como actividad, pureza o simplemente para comparar muestras diferentes). El método se realiza en algunos aspectos por identificación de un componente dentro en la muestra de polisacárido y determinación de un valor cuantitativo de la cantidad de componente. En algunas realizaciones, el método implica la identificación y cuantificación de al menos dos componentes.

El valor cuantitativo puede calcularse por cualquier medio, tal como por determinación del área bajo la curva (AUC) cuando la muestra se procesa por electroforesis capilar, el factor de respuesta (RF), o la cantidad porcentual relativa de cada fracción presente en la muestra. Métodos para la realización de estos tipos de cálculos se describen más adelante en detalle en la sección de Ejemplos. Resumidamente, el AUC puede calcularse directamente a partir de un espectro CE. El factor de respuesta es aquella cantidad de firma que proporciona la misma respuesta que un oligosacárido de control. El RF puede calcularse, por ejemplo, en términos de absorbancia y compararse con la absorbancia de una muestra de control. La cantidad porcentual relativa de cada fracción presente en la muestra puede determinarse de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{PRA} = \text{RF} \times \text{AUC}_{\%R}$$

en donde

PRA = cantidad relativa en porcentaje de cada fracción

RF = factor de respuesta

$\text{AUC}_{\%R}$ = AUC relativa en porcentaje $[(100 \times \text{AUC}_C)/\text{AUC}_T]$

AUC_C = área bajo la curva para un componente

AUC_T = la suma del área bajo la curva para todos los componentes.

ES 2 324 701 T3

Los datos pueden procesarse individualmente o por medio de un ordenador. Por ejemplo, puede realizarse de acuerdo con la invención un método implementado por ordenador para generación de una estructura de datos, materializada tangiblemente en un medio legible por ordenador, que representa un valor cuantitativo de un componente de un polisacárido. La determinación cuantitativa se efectúa por realización del cálculo anterior.

Un sistema de ordenador que puede realizar lo anterior como un programa de ordenador puede incluir típicamente una unidad principal conectada a la vez a un dispositivo de salida que presenta la información a un usuario y a un dispositivo de entrada que recibe la entrada de un usuario. La unidad principal incluye generalmente un procesador conectado a un sistema de memoria por un mecanismo de interconexión. El dispositivo de entrada y el dispositivo de salida pueden estar conectados también al procesador y al sistema de memoria por el mecanismo de interconexión.

Pueden estar conectados a un sistema de ordenador uno o más dispositivos de salida. Ejemplos de dispositivos de salida incluyen una presentación por tubo de rayos catódicos (CRT), presentaciones de cristal líquido (LCD), impresoras, dispositivos de comunicación tales como un módem, y salida de audio. Pueden estar conectados también al sistema de ordenador uno o más dispositivos de entrada. Dispositivos de entrada ilustrativos incluyen un teclado convencional, teclado numérico, esfera de control, ratón, pluma y pastilla, dispositivo de comunicación, y dispositivos de entrada de datos tales como sensores. La materia que constituye el objeto descrito en esta memoria no se limita a los dispositivos particulares de entrada o salida utilizados en combinación con el sistema de ordenador o a los descritos en esta memoria.

El sistema de ordenador puede ser un sistema de ordenador de uso general que puede programarse utilizando un lenguaje de programación de ordenador, tal como C++, Java, u otro lenguaje, tal como un lenguaje descriptivo o lenguaje ensamblador. El sistema de ordenador puede incluir también hardware para propósitos especiales programado específicamente tal como, por ejemplo, un Circuito Integrado de Aplicación Específica (ASIC). En un sistema de ordenador de uso general, el procesador es típicamente un procesador disponible comercialmente, del que son ejemplos las series de procesadores x86, Celeron, y Pentium, disponibles de Intel, y dispositivos similares de AMD y Cyrix, los microprocesadores de la serie 680X0 disponibles de Motorola, el microprocesador PowerPC de IBM y los procesadores de la serie Alpha de Digital Equipment Corporation. Están disponibles muchos otros procesadores. Un microprocesador de este tipo ejecuta un programa denominado sistema operativo, del que son ejemplos Windows NT, Linux, UNIX, DOS, VMS y OS8, que controla la ejecución de otros programas de ordenador y proporciona programación, depuración de fallos, control entrada/salida, contabilidad, compilación, asignación de almacenamiento, tratamiento de los datos y gestión de la memoria, así como control de las comunicaciones y servicios análogos. El procesador y el sistema operativo definen una plataforma de ordenador para la cual pueden escribirse programas de aplicación en lenguajes de programación de alto nivel.

Un sistema de memoria incluye típicamente un medio de registro no volátil legible por ordenador y susceptible de escritura, del cual son ejemplos un disco magnético, una memoria flash y cinta. El disco puede ser movable, tal como un "disco flexible", o permanente, conocido como un disco duro. Un disco tiene cierto número de pistas en las cuales se almacenan señales, típicamente en forma binaria, es decir, una forma interpretada como una secuencia de unos y ceros. Señales de este tipo pueden definir un programa de aplicación a ejecutar por el microprocesador, o información almacenada en el disco que debe ser procesada por el programa de aplicación. Típicamente, durante la operación, el procesador hace que los datos sean leídos del medio de registro no volátil a un elemento de memoria de circuito integrado, que es típicamente una memoria volátil de acceso aleatorio tal como una memoria dinámica de acceso aleatorio (DRAM) o memoria estática (SRAM). El elemento de memoria de circuito integrado permite típicamente un acceso más rápido que el disco a la información por el procesador. El procesador manipula generalmente los datos contenidos en la memoria de circuito integrado y copia luego los datos al disco después que se ha completado el procesamiento. Se conocen una diversidad de mecanismos para gestionar el movimiento de los datos entre el disco y el elemento de memoria de circuito integrado, y el objeto descrito en esta memoria no se limita a tales mecanismos. Adicionalmente, el objeto descrito en esta memoria no se limita a un sistema de memoria particular.

El objeto descrito en esta memoria no está limitado a una plataforma de ordenador particular, procesador particular, o lenguaje de programación de alto nivel particular. Adicionalmente, el sistema de ordenador puede ser un sistema de ordenador multiprocesador o puede incluir ordenadores múltiples conectados a una red de ordenadores. Debe entenderse que cada módulo (v.g. 110, 120) en FIG. 1 puede ser un módulo separado de un programa de ordenador, o puede tratarse de programas de ordenador separados. Tales módulos pueden ser operativos en ordenadores separados. Los datos (v.g., 104, 106, 110, 114, y 116) pueden almacenarse en un sistema de memoria o transmitirse entre sistemas de ordenadores. El objeto descrito en esta memoria no está limitado a ninguna implementación particular que utilice software o hardware o microprogramación por cable, o cualquier combinación de los mismos. Los diversos elementos del sistema, sea individualmente o en combinación, pueden implementarse como un producto de programa de ordenador materializado tangiblemente en un dispositivo de almacenamiento legible por la máquina para ejecución por un procesador de ordenador. Diversos pasos del proceso pueden ser realizados por un procesador de ordenador que ejecute un programa materializado tangiblemente en un medio legible por ordenador para realizar funciones trabajando sobre una entrada y generando una salida. Los lenguajes de programación de ordenador adecuados para implementación de un sistema de este tipo incluyen lenguajes de programación de procedimientos, lenguajes de programación orientados al objeto, y combinaciones de ambos.

Una muestra que contiene glucosaminoglucano es una muestra, al menos una fracción de la cual está compuesta de glucosaminoglucanos o HLGAGs. Como se ha expuesto anteriormente, los términos glucosaminoglucano o HL-

ES 2 324 701 T3

GAG incluyen, pero sin carácter limitante, heparina, análogos de heparina, LMWH, heparina biotecnológica, heparina modificada químicamente, o heparina sintética.

5 El término heparinasa se utiliza genéricamente para abarcar variantes funcionalmente activas y fragmentos de las mismas además de las heparinasas naturales. Varias patentes y solicitudes de patente describen modificaciones y variantes y fragmentos de heparinasa útiles, con inclusión de la patente US 6.217.863 B1 y las solicitudes pendientes 09/384.959 y 09/802.285. La heparinasa III causa despolimerización de la heparina. Dependiendo de la concentración de heparinasa III utilizada, y del periodo durante el cual se utiliza (digestión parcial frente a digestión exhaustiva), se obtiene heparina de peso molecular específico, y/o carga. Por ejemplo, aunque no se pretende ser limitantes, ocurre 10 que una digestión parcial de heparina con un equivalente molar de heparinasa III daría como resultado una fracción de mayor peso molecular, y/o mayor carga que lo haría una reacción con un tiempo de digestión más largo. Asimismo, el aumento de la equivalencia molar de heparinasa III dará como resultado una fracción con menor peso molecular y/o menor carga que si se utiliza una equivalencia molar de heparinasa inferior. En algunas realizaciones, pueden utilizarse concentraciones y duración de digestiones de Heparinasa III en combinación con sal, temperatura, y composición del disolvente, como se describe en esta memoria, a fin de obtener heparina de peso molecular, carga y/o actividad 15 biológica específicas.

En una realización, la muestra a analizar o evaluar se degrada químicamente utilizando un método seleccionado del grupo que incluye, pero sin carácter limitante: despolimerización oxidante con H_2O_2 o CU^+ y H_2O_2 , escisión desaminante con nitrito de isoamilo, o ácido nitroso, escisión eliminadora β con éster bencílico de heparina por tratamiento alcalino o por heparinasa.

Una composición de LMWH es una mezcla de moléculas de diversos pesos moleculares. Como se ha descrito arriba, la mezcla homogénea contiene fragmentos que pueden variar en peso molecular pero tienen un peso molecular medio inferior a 8.000 D. Una composición de LMWH de compuestos que tengan un intervalo de pesos moleculares de 4000-6000 Daltons, por ejemplo, es una mezcla de diversas LMWH en la cual el tamaño medio oscila entre 4.000 a 6.000 Da. En algunas realizaciones, el porcentaje de LMWH que está comprendido entre 4.000 y 6.000 Da en la muestra es 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% de los componentes de la mezcla.

30 Las preparaciones LMWH se preparan a partir de fuentes de HLGAG. Una "fuente de HLGAG", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a una composición de glucosaminoglucano semejante a heparina que puede manipularse para producir LMWH utilizando tecnología estándar, con inclusión de degradación enzimática, etc. Como se ha descrito arriba, los HLGAGs incluyen, pero sin carácter limitante heparina aislada, heparina modificada químicamente, heparina preparada por biotecnología, heparina sintética, sulfato de heparano, y LMWH. Así pues, pueden aislarse 35 HLGAGs de fuentes naturales, prepararse por síntesis directa, mutagénesis, etc. Los HLGAGs pueden ser sustancialmente puros en algunas realizaciones. Como se utiliza en esta memoria, el término "sustancialmente puro" significa que los polisacáridos están esencialmente exentos de otras sustancias en una proporción práctica y apropiada para su uso propuesto. En particular, los polisacáridos son suficientemente puros y están suficientemente exentos de otros constituyentes biológicos de sus ambientes hospedadores, de tal modo que son útiles en, por ejemplo, producción de 40 preparaciones farmacéuticas.

Las preparaciones de LMWH como se utilizan en esta memoria son sales de GAGs sulfatados que tienen un peso molecular (MW) medio inferior a 8.000 Da y para las cuales al menos 60% de todas las moléculas tienen un NW inferior a 8.000 Da. Por definición, las preparaciones LMWH se producen a partir de una muestra de HLGAG. 45 El término LMWH no abarca polisacáridos que se sintetizan directamente como LMWHs, tales como SR90107A. SR90107A es un polisacárido sintético que tiene un peso molecular de aproximadamente 1.500 Da. Estos tipos de compuestos, que se preparan directamente como compuestos de peso molecular bajo en lugar de prepararse a partir de una fuente de HLGAGs no se consideran comprendidos dentro de la clase de LMWH. El término LMWH incluye de hecho, sin embargo, los HLGAGs sintéticos que están procesados para producir LMWHs.

50 Se han utilizado varios métodos diferentes para la preparación comercial de LMWHs. El fraccionamiento directo por tamaños se ha utilizado para preparar LMWH (Fraxiparina) en una escala experimental, pero su deficiente rendimiento ha impedido por regla general su utilización en escala industrial. Para propósitos de producción industrial, se han utilizado cierto número de procesos químicos o enzimáticos. Los procesos químicos aprovechan la ventaja de una extensa gama de reacciones tales como despolimerización parcial con ácido nitroso (Fragmina), escisión oxidante con H_2O_2 (Normiflo y Fluxum), escisión oxidante con Cu^{++} y H_2O_2 , o por bencilación seguida por β -eliminación e hidrólisis alcalina (Enoxaparina). Se han descrito también métodos enzimáticos para generar LMWH utilizando despolimerización parcial β -eliminadora por heparinasa I (Logiparina).

60 La posibilidad de identificar el porcentaje de región de fijación de AT no escindida, tal como el decasacárido que tiene la estructura $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, o uno de los tetrasa-cáridos $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; o $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$ (o compuestos afines) en una muestra permite que se formulen composiciones con cantidades específicas de región no escindida de fijación de AT intacta. Esta posibilidad de preparar LMWH con porcentajes conocidos de la región de fijación de AT intacta proporciona un método para cuantificar la actividad de composiciones terapéuticas de LMWH. Así pues, los métodos de la invención hacen posible que 65 una persona con experiencia en la técnica prepare o identifique una composición apropiada de LMWH, dependiendo del individuo y el trastorno a tratar.

ES 2 324 701 T3

Como se utiliza en esta memoria, el término “intacto” significa no escindido y completo. El término “regiones de fijación de AT” hace referencia a una región de HLGAG que interacciona específicamente con AT-III. La región de fijación de AT incluye el compuesto deca-sacárido que tiene la estructura:

5 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ y los tetrasacáridos $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, $\Delta U_{HN,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S}$; y $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$. En algunas realizaciones, la preparación de LMWH es una composición en la cual al menos 20% de la secuencia del polisacárido en la composición es región de fijación de AT intacta. En otras realizaciones, al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, o 55% de la secuencia del polisacárido en la composición es región de fijación de AT intacta. Como se ha expuesto anteriormente, el porcentaje óptimo de AT-10 intacto en una composición
10 para tratamiento variará dependiendo de la condición médica objeto de tratamiento. Un nivel mayor de actividad puede ser deseable para pacientes en peligro de formación de coágulos de sangre que en pacientes sometidos a tratamiento por cáncer, en los cuales no es deseable actividad anticoagulante.

15 En otros aspectos, la preparación LMWH puede tener >15% de disacáridos disulfatados, <75% de disacáridos trisulfatados, 3-5% de disacáridos monosulfatados y >2% de tetrasacárido 4-7.

La cantidad de región de fijación de AT en las preparaciones de LMWH puede manipularse por una diversidad de parámetros experimentales. Los métodos de la invención hacen posible controlar las cantidades de región de fijación de AT en una preparación LMWH, permitiendo el control de calidad de las preparaciones LMWH que utilizan
20 el componente de firma, proporcionando un procedimiento de aislamiento mejorado que dé como resultado el aislamiento de una preparación rica en LMWH, y proporcionando nuevas reglas para las especificidades de escisión de las heparinasas. Las dos primeras de estas propiedades se han expuesto en detalle anteriormente.

El papel de las heparinasas en la preparación de LMWHs con regiones de fijación de AT intactas ha sido descrito en la técnica anterior. Específicamente, una secuencia publicada que contenía un sitio de fijación de AT-III intacto, se describió como $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$ (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. & Linhardt, R. J. (1996) *J Biol Chem* 271, 32040-7). Adicionalmente, se ha demostrado en la técnica anterior que tetrasacáridos que contienen 3-O-sulfato no son escindibles por ninguna de las heparinasas (Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M, Sugahara, K., Khoo, K. H., Morris, H. R. y Dell, A. (1993) *J Biol Chem* 268, 4780-7.), lo que sugiere
30 que los enlaces con una glucosamina sulfatada en 3-O son resistentes a la escisión. Sorprendentemente, se descubrió que estas doctrinas de la técnica anterior eran incorrectas. En los ejemplos, los autores de la presente invención han demostrado concluyentemente por una diversidad de técnicas físico-químicas, que la estructura real de AT-10 es $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ y por consiguiente no contiene un sitio de fijación de AT-III intacto. Teniendo en cuenta la reinterpretación de la estructura de AT-10, los autores de la invención trataron de reexaminar la acción de las heparinasas I-III frente a oligosacáridos de fijación de AT que contienen 3-O-sulfato. Dado que AT-10 (ultra-LMWH, MW = 2769,3 Da) se obtiene por escisión controlada de heparina con heparinasa I, se intentó también examinar las consecuencias funcionales de un oligosacárido, utilizando técnicas bio-analíticas establecidas. Es necesaria una comprensión de este tipo tanto de la acción de las heparinasas como de sus consecuencias funcionales para la generación eficiente y óptima de LMWH para uso clínico.
40

Así, como se muestra en los Ejemplos, se ha descubierto que las heparinasas I y II escinden realmente la región de fijación de AT de los HLGAGs dando como resultado la pérdida de la región de fijación de AT intacta, mientras que la heparinasa III no lo hace. Adicionalmente, se ha descubierto que la sulfatación en 3-O de la glucosamina en el extremo reductor de un enlace glicosídico imparte resistencia a la escisión por las heparinasas I, II y III. El examen
45 de las consecuencias biológicas y farmacológicas de un oligosacárido de heparina que contiene únicamente un sitio de fijación parcial de AT-III muestra que un oligosacárido de este tipo tiene una actividad anti-Xa significativa pero carece de algunos de los atributos funcionales de los glucosaminoglucanos afines a heparina que contiene un sitio AT-III intacto.

Estos métodos son también válidos para una clase más amplia de compuestos. Las doctrinas de la invención pueden utilizarse para desarrollar terapéuticas especializadas de polisacáridos a partir de una gran diversidad de materiales polisacáridos de partida. Una vez que se identifica un componente activo en un polisacárido, dicho componente activo puede utilizarse como firma para el control de calidad de la muestra, y puede utilizarse para generar e identificar composiciones terapéuticas que están mejoradas para una actividad terapéutica particular, y que poseen las regiones
55 que son responsables para la eliminación de dichos efectos.

Las composiciones pueden administrarse terapéuticamente a un individuo. Como se utiliza en esta memoria, un individuo es un humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor.

Los HLGAGs y las LMWHs en particular tienen muchas utilidades terapéuticas. Las composiciones LMWH de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de cualquier tipo de afección en el cual la terapia con LMWH haya sido identificada como una terapia útil. Así, la invención es útil en una diversidad de métodos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* en los cuales son útiles las terapias con LMWH. Por ejemplo, es sabido que las composiciones LMWH son útiles para prevenir la coagulación, inhibir el crecimiento de las células cancerosas y las metástasis, prevenir la angiogénesis,
65 prevenir la neovascularización, y prevenir la psoriasis. Las composiciones LMWH pueden ser utilizadas también en ensayos *in vivo*, tales como una muestra de control de calidad.

Todos estos trastornos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Harrison's Principles of Internal Medicine* (McGraw Hill, Inc., Nueva York).

La descripción siguiente de experimentos realizados es ilustrativa y no limitante del alcance la invención reivindicada.

Ejemplos

Ejemplo 1

Secuenciación de los decaacáridos que contienen 3-O-sulfato con un sitio de fijación de antitrombina-III parcial

Introducción

La heparina y los glucosaminoglucanos de sulfato de heparano representan una clase importante de moléculas que interaccionan con y modulan la actividad de factores de crecimiento, enzimas, y morfogenes. De las muchas funciones biológicas de esta clase de moléculas, una de sus funciones más importantes es su interacción con antitrombina III (AT-III). La fijación de AT-III a una secuencia específica del pentasacárido de heparina, que contenga un 3-O-sulfato extraño en una glucosamina N-sulfatada, 6-O-sulfatada, aumenta 1000 veces la capacidad de AT-III para inhibir proteasas específicas en la cascada de coagulación. De esta manera, los glucosaminoglucanos afines a la heparina (HLGAGs) juegan un papel biológico y farmacológico importante en la modulación de la coagulación de la sangre. Recientemente, se ha desarrollado una metodología de secuenciación (Solicitudes de Patente US Núms. de Serie 09/557.997 y 09/558.137, presentadas en fecha 24 de abril de 2000, de los mismos inventores, y Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42.) que sugiere las relaciones estructura-función de esta importante clase de moléculas. Esta metodología combina un esquema de nomenclatura codificado por propiedades (PEN), para tratar el gran contenido de información (propiedades) de los HLGAGs, con la ionización por desorción láser asistida con matriz-espectrometría de masas (MALDI-MS) y la degradación enzimática y química como restricciones experimentales para secuenciar rápidamente cantidades de picomoles de los oligosacáridos HLGAG. Utilizando el enfoque PEN-MALDI anterior, los autores de la presente invención han encontrado que la secuencia del decaacárido utilizado en este estudio es $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ ($\pm DDD4-7$). Los autores de la presente invención han confirmado sus propios resultados utilizando Secuenciación Integral de Glucanos y resonancia magnética nuclear unidimensional del protón. Adicionalmente, los autores de la presente invención han demostrado que este enfoque es flexible y es capaz de deducir información de secuencia a partir de una mezcla de oligosacáridos. Así pues, esta metodología hace posible tanto el análisis de otras secuencias extrañas en polisacáridos tales como heparina/sulfato de heparano con actividades biológicas importantes, al mismo tiempo que proporciona la base para el análisis estructural de este grupo farmacológicamente importante de heparina/sulfatos de heparano.

Métodos

Abreviaturas: HLGAG, glucosaminoglucanos afines a heparina; AT-III, antitrombina III; AT-10, decaacárido fraccionado de AT-III aislado por digestión parcial de heparina; IGS, Secuenciación Integral de Glucanos; PEN, nomenclatura codificada por propiedades; MALDI-MS, espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz; CE, electroforesis capilar; abreviaturas de las secuencias de HLGAG como sigue, I, ácido α -L-idurónico; G, ácido β -D-glucurónico; ΔU , un ácido $\Delta^{4,5}$ -urónico; 2S,3S, y 6S, sulfatación en 2-O, 3-O, o 6-O respectivamente; NS y N_{AC} , N-sulfatación y N-acetilación de la glucosamina.

Materiales. El decaacárido AT-10 es el mismo sacárido utilizado en estudios previos (Rhombert, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12232-7 y Ernst, S., Rhombert, A. J., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4182-7). Los oligosacáridos se disolvieron en agua desionizada a concentraciones de 10-35 μ M. Las heparinasas I-III de *Flavobacterium heparinum* se purificaron como se ha descrito previamente. Las exoenzimas α -L-iduronato-2-O-sulfatasa, α -L-iduronidasa, β -D-glucuronidasa y N-acetilglucosamina-6-sulfatasa se adquirieron de Oxford Glycosciences. Una solución acuosa al 40% de nitrito de sodio se adquirió de Aldrich Chemical. Los estándares de disacáridos para el análisis de composición se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Análisis de la composición. El análisis de la composición de los oligosacáridos se completó por digestión exhaustiva de una muestra 30 μ M de AT-10 seguida por electroforesis capilar (CE) como se ha descrito previamente (Rhombert, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4176-81). De modo resumido, se añadieron a 1 nmol de oligosacárido 200 nM de heparinasas I, II y III en acetato de sodio 25 mM, NaCl 100 mM, y tampón de acetato de calcio 5 mM, de pH 7,0. Se dejó que la reacción transcurriera a 30°C durante una noche y se analizó luego por CE en polaridad invertida con un tampón corriente de tris-fosfato 50 mM y sulfato de dextrano 10 μ M de pH 2,5.

Productos de digestión. Se diseñaron digestiones con heparinasa I cortas o exhaustivas. Para digestión corta, se incubó heparinasa I 50 nM con el sustrato durante 10 minutos antes del análisis. Las digestiones exhaustivas se completaron con enzima 200 nM durante una noche. Las reacciones enzimáticas se realizaron por adición de 1 μ l de solución de enzima en un tampón que contenía ovoalbúmina 10 μ M, sulfato de dextrano 1 μ M, acetato de calcio 5 mM y tampón de etilendiamina 10 mM a pH 7,0 para 4 μ l de solución acuosa de sustrato; se dejó que la digestión

transcurriera a la temperatura ambiente como se ha descrito anteriormente (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) *Science* **286**, 537-42 y Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4176-81). Se completó la escisión parcial con ácido nitroso utilizando una modificación de procedimientos publicados (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. y Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2698-703). Las digestiones con exoenzimas se completaron simultánea o secuencialmente. Las concentraciones finales de enzima están comprendidas en el intervalo de 20-40 miliunidades/ml, y la digestión se llevó a cabo a 37°C.

Espectrometría de masas. Los análisis espectrales de masas se realizaron en un equipo Reflectron PerSeptive Biosystems Voyager Elite de tiempo de vuelo en el modo lineal con extracción retardada. Se prepararon muestras de los materiales digeridos tomando 0,5 μ l de la mezcla de reacción y añadiéndolos a 4,5 μ l de solución matriz (12 mg/ml de ácido cafeico en acetonitrilo al 30%) que contenía un exceso molar de dos veces del péptido básico (RG)₁₉R (masa calculada del ión (M+H)⁺ = 4.226,8). La adición del péptido básico para formar específicamente quelatos con los oligosacáridos HLGAG y los parámetros de recogida de los espectros de masa permiten el análisis directo de la muestra sin necesidad de repurificación de la muestra (Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 417681). Las muestras se aplicaron por puntos sobre la diana y se recogieron los espectros de masas utilizando los parámetros reseñados previamente (Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4176-81). Se observan en cada espectro de masas los iones (M+H)⁺ del péptido básico y el ión (M+H)⁺ de un complejo 1:1 péptido:sacárido, y se determina la masa del sacárido por sustracción del valor *m/z* medido del ión (M+H)⁺ del péptido del correspondiente al complejo 1:1 (Juhasz, P. y Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* **270**, 131-47). Todos los espectros obtenidos de una placa se calibraron externamente utilizando un estándar de (RG)₁₉R y su complejo con un hexasacárido derivado con ácido nitroso de la secuencia I₂₅H_{NS,6S}I₂₅H_{NS,6S}I₂₅Man_{6S} (masa calculada de 1655,4) con parámetros instrumentales idénticos. Esta metodología requiere sulfatación suficiente del sacárido para asegurar una complejación eficiente del complejo. Como tal, los sacáridos pequeños infrasulfatados (es decir, mono- y disacáridos) no se observan con esta metodología (Juhasz, P. y Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* **270**, 131-47).

Secuenciación Integral de Glucanos. La secuenciación integral de glucanos (IGS) utilizando separación electrofóretica se llevó a cabo como se ha descrito (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. y Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2698-703). Las condiciones de escisión parcial con ácido nitroso se modificaron utilizando HCl 25 mM y nitrito de sodio 2,5 mM y tiempos de parada de 5, 10, 20, 30, 120 y 240 minutos.

Espectroscopia ¹H NMR. La espectroscopia ¹H NMR se realizó utilizando las condiciones descritas previamente (Nadkarni, V. D., Toida, T., Van Gorp, C. L., Schubert, R. L., Weiler, J. M., Hansen, K. P., Caldwell, E. E. y Linhardt, R. J. (1996) *Carbohydr Res* **290**, 87-96). Se sometió AT-10 a cromatografía de intercambio iónico para separar las impurezas paramagnéticas. Una columna (1 cm x 10 cm) de AG 50W-X8 (Bio-Rad Japan, Tokio) se convirtió en la forma sodio por tratamiento con 5 ml de NaOH 0,1M y se lavó con agua durante 12 horas antes de su utilización. La muestra para los experimentos NMR se aplicó a la columna, se eluyó con 20 ml de agua y se liofilizó. La muestra (~1 mg) se liofilizó luego tres veces a partir de 99,8% D₂O (Merck, Alemania) y se disolvió en 0,5 ml de D₂O 100% (Aldrich Japan, Tokio) para espectroscopia NMR en un tubo de 5 mm. La espectroscopia ¹H-NMR 1D de AT-10 se realizó en un espectrómetro JEOL GSX500A equipado con una sonda sintonizable de 5 mm en gradiente de campo a 298 K.

Resultados

Introducción a la Metodología de la Secuenciación

Se ha desarrollado recientemente una técnica de espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS) que hace posible la determinación de la masa de oligosacáridos HLGAG complejos (desde di- a deca-sacáridos) con una exactitud mejor que ± 1 Da (Juhasz, P. y Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* **270**, 131-47 and Juhasz, P. y Biemann, K. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4333-7). Debido a la exactitud de la medida resultante de la peso molecular de los HLGAGs individuales, es posible una asignación única tanto de la longitud de un fragmento como del número y clase de sustituyentes, especialmente si el oligosacárido es un tetradecasacárido o más pequeño (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) *Science* **286**, 53742). Adicionalmente, MALDI-MS puede detectar fragmentos de oligosacáridos generados por degradación enzimática o química de un oligosacárido (Rhomberg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 12232-7; Ernst, S., Rhomberg, A. J., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4182-7; y Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4176-81). Finalmente, la sensibilidad de MALDI-MS es tal que pueden detectarse fácilmente cantidades tan pequeñas como 100 femtomoles de material.

Además de la técnica experimental MALDI-MS, se desarrolló una nomenclatura codificada por propiedades (PEN) para representar las 32 unidades de disacáridos utilizando un sistema de codificación hexadecimal (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) *Science* **286**, 537-42). El desarrollo de PEN es necesario para manejar el gran contenido de información (propiedades) de los HLGAGs. Cada uno de los números hexadecimales se deduce basándose en una lógica interna que se manifiesta en sí misma en términos de la distribución de los sulfatos en una unidad de bloque de construcción particular y no está asignado de modo aleatorio simplemente para identificar cada unidad de disacárido. Este sistema es importante para los HLGAGs en el sentido de que permite la manipulación

ES 2 324 701 T3

rápida de secuencias utilizando operaciones matemáticas o binarias simples, proporcionando con ello un instrumento de manipulación del gran contenido de información de los polisacáridos complejos. Adicionalmente, la diversidad estructural inherente en los HLGAGs surge necesariamente de las diferencias de propiedades (localización de los grupos sulfato y acetato cargados) haciendo de este modo del PEN un esquema de asignación natural para los HLGAGs. Esto está en contraste directo con los códigos alfabéticos utilizados para representar los nucleótidos del DNA y los aminoácidos o proteínas que sirven como meros identificadores y no codifican información alguna (propiedades) y no capturan por tanto la heterogeneidad química de estos biopolímeros.

El sistema de codificación hexadecimal comprende los alfanuméricos 0-9 y A-F. Dado que la unidad de disacárido tiene cuatro posiciones, a saber, 2-O, N-, 3-O y 6-O que pueden modificarse, es inmediato asignar cada una de las cuatro posiciones de dígitos binarios del código hexadecimal a una de estas posiciones químicas. Adicionalmente, dado que existen únicamente dos modificaciones posibles en cada posición (2-O, 3-O y 6-O pueden estar sulfatados o libres, y la posición N puede estar sulfatada o acetilada *), el uso de un sistema binario captura estas modificaciones como estados simples encendidos o apagados. Por ejemplo, si, dentro de una unidad de disacárido dada, la posición 2-O está sulfatada, entonces se le asigna el valor binario de 1. Inversamente, si la posición 2-O en un disacárido dado no está sulfatada, entonces se le asigna el valor binario de 0.

Para identificar un disacárido con un carácter alfanumérico, se han asignado las 4 posiciones binarias de la manera siguiente: se asignó la posición 2-O a la posición binaria situada más a la izquierda, seguido por las posiciones 6-O, 3-O y N- en este orden. En cada caso, como se ha reseñado anteriormente, se utilizó el código binario 1 para representar posiciones sulfatadas y se utilizó 0 para representar posiciones no sulfatadas en el caso de 2-O, 6-O y 3-O, y acetilación en el caso de la posición N.

Para codificar el estado isomérico del ácido urónico (a saber, ácido idurónico frente a ácido glucurónico), se designaron las unidades de disacáridos como +/- . De este modo, es posible asignar los códigos hexadecimales positivos a las unidades que contienen ácido idurónico y los códigos hexadecimales negativos a las unidades que contienen ácido glucurónico. Así, las unidades de disacáridos con el mismo código hexadecimal pero signos opuestos poseen el mismo patrón de sulfatación, difiriendo únicamente en el estado isomérico del ácido urónico. La Tabla 1 reseña el uso de PEN para las unidades de disacáridos presentes en este estudio.

TABLA 1

Derivación de PEN para las Unidades de Disacáridos Utilizadas en este Estudio

I/G	2X	6X	3 X	N X	HE X	DISAC.	MASA
0	0	1	0	0	4	I-H _{NAC, 6S}	459,4
0	0	1	0	1	5	I-H _{NS, 6S}	497,4
0	1	1	0	1	D	I _{2S} -H _{NS, 6S}	577,5
1	0	1	0	1	-5	G-H _{NS, 6S}	497,4
1	0	1	1	1	-7	G-H _{NS, 3S, 6S}	577,4

Los códigos hexadecimales derivados para las unidades de disacáridos existentes en AT-10 se muestran en la Tabla 1. La columna 1 es la posición binaria que codifica el estado isomérico del ácido urónico. Las columnas 2 a 5 codifican las modificaciones en las posiciones 2-O, 6-O, 3-O y N- de la unidad de disacárido. La columna 6 muestra los códigos hexadecimales representados por los dígitos binarios en las columnas 2 a 5. La columna 7 muestra la unidad de disacárido representada por el código en la columna 6. La columna 8 muestra las masas teóricas calculadas de la unidad de disacárido presente internamente en una secuencia. Para las modificaciones químicas o enzimáticas de estos disacáridos, se utiliza la nomenclatura siguiente: ácido urónico con un enlace insaturado Δ^{4-5} (ΔU) = ±; unidad de disacárido del extremo reductor con un marcador de masa = ' ; unidad de disacárido con un anillo anhidromanosa de cinco miembros = ¹.

* Existen algunas secuencias HLGAG raras con posición N-insustituída, que pueden justificarse en el sistema PEN por adición de bits suplementarios. Sin embargo, en los estudios de los autores de esta invención, los experimentos iniciales que incluían análisis de composición (véase más adelante) no mostraban la presencia de disacáridos que contuvieran amina libre.

ES 2 324 701 T3

De este modo, la estrategia para la asignación de secuencias de los oligosacáridos HLGAG por PEN-MALDI implica esencialmente los pasos siguientes. En primer lugar, se utiliza MALDI-MS del oligosacárido intacto para asignar la longitud y el número total de sulfatos y acetatos presentes en el oligosacárido. Se utiliza luego el análisis de la composición para determinar el número y tipo de los bloques de construcción de los disacáridos. Con esta información, se construye una lista maestra de todas las secuencias posibles que contienen dichas unidades de disacárido. De esta manera, no se excluye secuencia alguna del análisis, por extraña que pueda ser una secuencia dada. La masa de fragmentos de oligosacáridos generados por digestión enzimática o degradación química se aplica como restricciones experimentales, y se eliminan las secuencias que no satisfacen estas restricciones. De manera iterativa, moviéndose desde las restricciones experimentales a la lista maestra de secuencias posibles cada vez menor, puede llegarse rápidamente a una solución de secuencia única utilizando un mínimo de material. Es importante que pueden utilizarse caminos múltiples utilizando restricciones experimentales separadas para convergir en una sola secuencia, asegurando la exactitud de la asignación.

15 *Análisis de AT-10*

AT-10 y todos los oligosacáridos derivados del mismo por tratamiento enzimático o químico se detectan con MALDI-MS como complejos no covalentes con el péptido básico (RG)₁₉R (Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4176-81 y Juhasz, P. y Biemann, K. (1995) *Carbohydr Res* 270, 131-47). Utilizando esta metodología, se observan dos especies, un ión (M+H)⁺ de (RG)₁₉R y un ión (M+H)⁺ para el complejo péptido:sacárido. La masa molecular de un oligosacárido se obtiene por sustracción del valor (M+H)⁺ del péptido del valor (M+H)⁺ del complejo 1:1 sacárido:péptido. La Tabla 2 enumera todos los fragmentos posibles observados en este estudio, sus valores de masa calculados y derivados experimentalmente, y la estructura deducida de los fragmentos después de la asignación de secuencias de AT-10. La Figura 1 muestra que el componente principal de AT-10 tiene un valor *m/z* de 6.999,3. Cuando se sustrae el valor *m/z* del péptido protonizado, se encuentra que el valor experimental para la masa de este oligosacárido es 2770,2, que puede asignarse únicamente a un decaacárido con 13 sulfatos y un grupo acetato. El espectro de masas de AT-10 indica la presencia de otra especie (a la que se hace referencia en lo sucesivo como el contaminante) de masa 2690,1 (después de sustracción de la contribución del péptido), que corresponde a un oligosacárido con 12 sulfatos y un grupo acetato.

TABLA 2

Valores m/z para los picos en los espectros de masas y sus estructuras deducidas

Complejo (M+H) ⁺	Sacárido (Observado)	Estructura Deducida	Masa (Calculada)
6999,3	2770,2	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS1]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig. 1)	2769,3
6919,2	2690,1	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS2]_{,6S}I/GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig. 1)	2689,2
6899,6	2673,0	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS3]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$ (Fig. 4)	2672,2
6435,8	2209,2	$I_{2S}H_{NS}[RS4]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig. 4)	2209,8
6419,7	2192,2	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS5]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig. 2a)	2191,8
6339,8	2113,2	$I_{2S}H_{NS}[RS6]_{,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$ (Fig. 4)	2112,7
5899,9	1671,4	$U_{2S}H_{NS}[RS7]_{,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}d^*$ (marcado en masa, Fig. 2c)	1670,4
5859,8	1633,2	$I_{2S}H_{NS}[RS8]_{,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig. 4)	1632,3
5842,1, 5842,2, 5843,6	1614,6, 1614,4, 1615,1	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS9]_{,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ (Fig. 2a,b,c)	1614,3
5383,1, 5382,5	1155,6, 1154,0	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS10]_{,6S,6S}$ (Fig. 2a,c)	1154,9
5301,7	1073,9	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS11]_{,6S}I/GH_{NS,6S}$ (Fig. 2b)	1074,9
5284,5	1057,9	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS12]_{,6S}I_{2S}Man_{6S}$ (Fig. 4)	1057,8
5241,5	1013,8	$IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}d^*$ (marcado en masa, Fig. 3)	1013,9
5186,5	958,8	$IH_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$ (Fig. 3)	957,8
5007,8	780,8	$H_{NAC,6S}GMan_{3S,6S}$ (Fig. 3)	780,7
4805,2, 4805,3, 4805,2	577,7, 577,5 576,7	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS13]_{,6S}$ (Fig. 2a,b,c)	577,5

* d- representa el marcador de masa semicarbazida ($\Delta = 56,1$ Daltons)

En la columna 1 se muestra el valor *m/z* del complejo protonizado 1:1 del sacárido y el péptido básico (RG)₁₉R. La columna 2 muestra la masa observada del sacárido obtenido por sustracción del valor del péptido protonizado observado en el espectro del complejo protonizado 1:1. Las estructuras químicas deducidas de los sacáridos para los picos correspondientes en los espectros de masas se muestran en la columna 3. En la columna 4 se muestran las masas teóricas calculadas para las estructuras deducidas. Obsérvese que la masa observada (col. 2) está siempre dentro de ± 1 Dalton de la masa calculada (col. 4).

ES 2 324 701 T3

El análisis de composición utilizando CE indica la presencia de 4 bloques de construcción disacáridos, correspondientes a $\Delta U_{2S-H_{NS,6S}} (\pm D)$, $\Delta U-H_{NAc,6S} (\pm 4)$, $\Delta U-H_{NS,6S} (\pm 5)$, y $\Delta U-H_{NS,3S,6S} (\pm 7)$, en la relación relativa de 2,90:1,00:1,05:0,15, respectivamente. Así, el análisis de composición de esta muestra confirmó que existen dos especies, una principal (~85%) y la otra menos importante (~15%). AT-10 tiene que ser un decaacárido constituido por los bloques de construcción $\Delta U_{2S-H_{NS,6S}} (\pm D)$, $\Delta U-H_{NAc,6S} (\pm 4)$, y $\Delta U-H_{NS,3S,6S} (\pm 7)$ en una relación de 3:1:1. Colectivamente, los datos CE y MALDI-MS se utilizaron para construir una lista maestra de posibles secuencias para AT-10. Los autores de la invención han encontrado que existen 320 secuencias que pueden justificar los datos CE y MS (Tabla 2). Estas 320 secuencias constituyen la lista maestra de la que se eliminaron secuencias sobre la base de las restricciones experimentales hasta convergencia en una solución única.

Adicionalmente, el análisis de composición confirmó que existe un contaminante presente que era estructuralmente similar a AT-10, excepto por la presencia de $\Delta U-H_{NS,6S} (\pm 5)$. A partir de los datos CE, se determinó que la composición del contaminante era $\Delta U_{2S-H_{NS,6S}} (\pm D)$, $\Delta U-H_{NAc,6S} (\pm 4)$, $\Delta U-H_{NS,3S,6S} (\pm 7)$, y $\Delta U-H_{NS,6S} (\pm 5)$ en la relación relativa de 2:1:1:1 por sustracción sucesiva.

Una vez construida la lista maestra de posibilidades de secuencia, se utilizó una combinación de PEN-MALDI, IGS (Turnbull, J. E., Hopwood, J. J. y Gallagher, J. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2698-703), y análisis NMR para secuenciar AT-10 y analizaron luego la secuencia del contaminante.

Secuenciación de AT-10 por MALDI-MS

De la lista de 320 secuencias posibles generadas a partir de los datos de composición, se han utilizado una serie de restricciones experimentales, que incluyen el uso de heparinasa I y ácido nitroso, respectivamente, para asignar la secuencia de AT-10.

La digestión corta (incompleta) de AT-10 con la heparinasa I da como resultado cinco fragmentos de peso molecular 577,7, 1073,9, 1155,6, 1614,6 y 2192,2 (Figura 2a). El fragmento con masa 577,7 corresponde a $\pm D$. El fragmento 1155,6 corresponde a un tetrasacárido hexasulfatado que debe tener una de las estructuras siguientes: $\pm DD$, $\pm D-D$, $\pm D7$, $\pm D-7$, $\pm 7D$ o $\pm 7-D$. El fragmento con 1614,6 corresponde a un hexasacárido heptasulfatado y monoacetilado, y el fragmento con 2192,2 corresponde a un octasacárido decaulfatado y monoacetilado. El último pico, a 1073,9 fue asignado inequívocamente al contaminante (véase más adelante para análisis). Cuando se investigó la lista de 320 secuencias respecto a estos fragmentos formados por digestión simulada con heparinasa I, se redujo la lista a 52 secuencias (Tabla 2).

La tasa de escisión del sustrato por heparinasa I es dependiente del tamaño (Linhardt, R. J., Turnbull, J. E., Wang, H. M., Loganathan, y Gallagher, J. T. (1990) *Biochemistry* 29, 2611-7). Para identificar la totalidad de los enlaces sulfatados en 2-O que contenían iduronato en AT-10, se trató la misma con heparinasa I en condiciones que dieron como resultado la escisión completa de todos los enlaces susceptibles. En estas condiciones, el hexasacárido y el tetrasacárido del contaminante, se mantenían intactos (Figura 2b). Sin embargo, el tetrasacárido hexasulfatado (masa de 1155,6 de la Figura 2a) se escindía. Por tanto, este sacárido tiene la secuencia $\pm DD$. De las 52 asignaciones de secuencia posibles para AT-10, únicamente 28 pueden satisfacer los datos exhaustivos de los materiales digeridos con heparinasa I.

A continuación, se trató AT-10 con semicarbazida para producir una semicarbazona en la posición anomérica. De esta manera se introdujo un marcador de masa ($\Delta = 56,1$) para diferenciar fragmentos derivados del extremo reductor en oposición al extremo no reductor. El tratamiento de AT-10 marcado con heparinasa I produjo cinco fragmentos (Figura 2c). Por una comparación de AT-10 no derivatizado tratado con heparinasa I (Figura 2a), el hexasacárido heptasulfatado y monoacetilado aparece marcado y por tanto tiene que derivarse del extremo reductor de AT-10. La aplicación de esta restricción a las 28 secuencias restantes elimina todas ellas excepto 12 (Tabla 3).

TABLA 3

Convergencia de la secuencia de AT-10

5

10

15

20

25

30

35

40

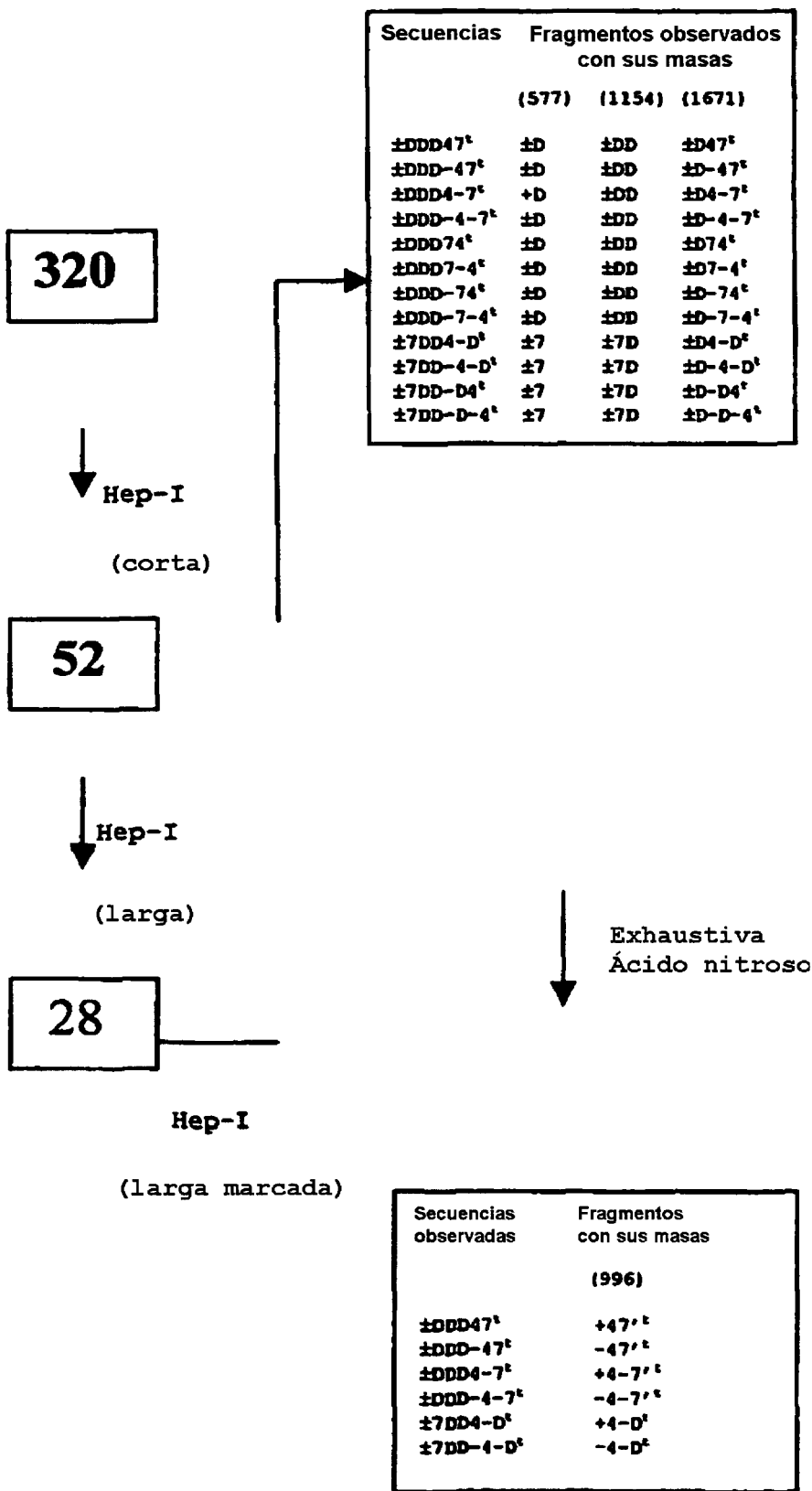
45

50

55

60

65



ES 2 324 701 T3

La estrategia por pasos utilizada para secuenciar la muestra de decaacárido se presenta en la Tabla 3. La aplicación de restricciones experimentales para eliminar las secuencias de la lista maestra de 320* secuencias se utilizó para converger en la secuencia final. En los recuadros de la izquierda se muestra el número de secuencias que satisfacían las restricciones experimentales. Los recuadros a la derecha muestran las secuencias que satisfacen las restricciones experimentales junto con los posibles fragmentos formados para las masas representadas entre paréntesis en la parte superior de la tabla.

La inspección de las 12 secuencias que quedaban en la Tabla 3 indica que la diferencia primaria estriba en la identidad del hexaacárido del extremo reductor. Por esta razón, por degradación de AT-10 con ácido nitroso y utilización cuidadosa de las exoenzimas, se determinó la secuencia del tetrasacárido del extremo reductor. En primer lugar, se trató exhaustivamente con ácido nitroso AT-10 marcado y fueron fácilmente detectables dos especies (Figura 3). La primera, con una masa de 1013,8, corresponde a un tetrasacárido de anhidromanosa marcado con cuatro sulfatos y un acetato. La otra, con una masa de 958,8, corresponde al mismo tetrasacárido sin marcar. Ambos podrían asignarse a una de las secuencias siguientes: ± 47 , $\pm 4-7$, $\pm 4-D$. Así, sobre la base de esta información, pudieron eliminarse la mitad de las secuencias posibles, dejando únicamente seis soluciones de secuencia posibles para AT-10 (Tabla 3).

Para asignar únicamente el estado isomérico de las dos unidades de disacárido en el extremo reductor de AT-10, se utilizaron las restricciones experimentales siguientes: se incubó el producto de digestión exhaustiva con ácido nitroso con la enzima exolítica α -iduronidasa, que corta específicamente el ácido idurónico en el extremo no reductor. Un desplazamiento en el espectro de 178,0 confirmó el ácido urónico como 4 y su estado isomérico como +, es decir, $I_{H_{NS,6S}}$ o +4. Únicamente tres secuencias podrían proporcionar los fragmentos observados, a saber, $\pm 7DD4-D$, $\pm DDD4-7$ y $\pm DDD47$.

Para diferenciar entre estas tres últimas alternativas e identificar el disacárido del extremo reductor, el producto tratado con iduronidasa se trató primeramente con 6-O-sulfatasa y N-desacetilasa a fin de separar la hexosamina, dejando únicamente el disacárido del extremo reductor. El tratamiento de esta muestra con β -glucuronidasa dio como resultado la degradación a monosacáridos. Esto identificó el disacárido del extremo reductor como -7 (G- $H_{NS,3S,6S}$). Por tanto, la secuencia deducida del decaacárido fraccionado de AT-III es $\pm DDD4-7$ ($\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$). Debe observarse el hecho de que esta secuencia no está de acuerdo con la asignación de secuencia para un decaacárido producido de manera idéntica (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. y Linhardt, R. J. (1996) *J Biol Chem* 271, 32040-7). Por esta razón, los autores de la invención trataron de confirmar su asignación de secuencia utilizando otras metodologías analíticas.

35 *Secuenciación de AT-10 por IGS*

Se secuenció también AT-10 utilizando la técnica recientemente establecida, Secuenciación Integral de Glucanos (IGS), que emplea una separación electroforética de los sacáridos marcados en el extremo reductor con un fluoróforo. La escisión parcial con ácido nitroso y digestión con exoenzima del sacárido produce una escalera de la cual puede deducirse la secuencia. De acuerdo con los datos PEN-MALDI, el análisis electroforético de la muestra marcada con fluoróforo produjo un solo decaacárido principal, pero adicionalmente, era también evidente el contaminante menor. Los productos de la escisión parcial con ácido nitroso eran deca-, octa-, hexa-, y tetrasacáridos, sin que se observara producto disacárido alguno. Este resultado define las posiciones de todos los restos NS y NAc, con un solo disacárido acetilado en N en la posición próxima al extremo reductor. Los desplazamientos en gel debidos al tratamiento de estos productos con combinaciones diferentes de exoenzimas demostraron residuos iduronato en tres posiciones, dos de las cuales estaban sulfatadas en 2-O, y la presencia en tres posiciones de residuos glucosamina sulfatados en 6-O. El extremo no reductor estaba claramente sulfatado en 2-O, pero la confirmación de la presencia de un 6-O-sulfato en el residuo glucosamina del extremo no reductor, y los detalles del patrón de sulfatación en el monosacárido del extremo reductor no se obtuvieron en este análisis. Estos datos definen la estructura de AT-10 como $\Delta U_{2S}H_{NS,\pm 6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NAC/NS,\pm 3S,\pm 6S}$. Este dato, deducido de un enfoque de secuenciación independiente, es totalmente coherente con el análisis PEN-MALDI.

55 *Análisis de la Secuencia del Contaminante de AT-10*

Los datos del espectro de masa también pueden usarse conjuntamente con el análisis de la composición CE para llegar a una estructura propuesta para el contaminante 12-sulfatado y 1-acetilado de AT-10. Como se ha indicado arriba, el producto de digestión con heparinasa I (Figura 2a) proporcionaba un pico para m/z de 1073,9 que corresponde a un tetrasacárido pentasulfatado ($\pm D\pm 5$, $\pm 7\pm 5$, o $\pm 5\pm 7$), que es asignable únicamente al contaminante.

65 *Para obtener todos los decaacáridos posibles con la composición de 3 \pm Ds, un ± 4 y un ± 7 , es necesario disponer las unidades de disacárido anteriores de todas las maneras posibles, a fin de formar un decaacárido. Asimismo, cada unidad de disacárido puede ser un + o un - correspondiente a iduronato o glucuronato. El número de secuencias posibles = 5C_3 (disposición de 3Ds en 5 posiciones) * 2C_1 (disposición de las 4 en las dos posiciones restantes) * 2^4 (para justificar el + o - en todas las posiciones excepto el extremo no reductor, dado que el sacárido se deriva de heparinasa) = $10*2*16 = 320$.

ES 2 324 701 T3

Este fragmento tetrasacárido no se derivaba del extremo reductor del contaminante, dado que no se encontró en ningún caso un sacárido marcado que contuviera ± 5 . Adicionalmente, un producto de digestión con heparinasa I del decaacárido marcado sitúa 4-7 en el extremo reductor, tanto para el contaminante como para AT-10. Para localizar la posición del tetrasacárido D5 o D-5 observado en el producto de digestión con heparinasa I, se trató el decaacárido con iduronato 2-O antes del tratamiento con heparinasa I. En estas condiciones, la masa del tetrasacárido pentasulfatado se reducía en 80 Da (desde una masa de 1073,9 a 993,9, resultante de la pérdida de sulfato). Por tanto, este tetrasacárido tiene que derivarse del extremo no reductor del contaminante. En conjunto, esta información sugiere que la secuencia del contaminante es $\pm D5D4-7$ o $\pm D-5D4-7$.

La asignación para AT-10 y el contaminante se confirmó cuando el decaacárido se degradó incompletamente con ácido nítrico (Figura 4). Se observa claramente AT-10 con una anhidromanosa en el extremo reductor (masa de 2673,0) así como fragmentos resultantes de la escisión con ácido nítrico (masas de 2209,2, 2113,2 y 1633,2) de AT-10. Adicionalmente, puede obtenerse únicamente una especie con masa 1057,9 a partir de $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}$, proporcionando una firma única de masa del extremo no reductor de AT-10. Es importante que todas las especies podrían asignarse a AT-10 o al contaminante.

Interpretación del Espectro NMR de AT-10

El espectro NMR de AT-10 se muestra en la Figura 6. Coherentemente con el análisis de los autores de la invención, las señales pequeñas de $\alpha H-1$, $\alpha H-2$ y $\alpha H-3$ de $H_{NS,3S,6S}$ (a 5,45, 3,45 y 4,50 ppm, respectivamente) permiten asignar la unidad del monosacárido del extremo reductor como $H_{NS,3S,6S}$. En este caso, el protón anomérico de residuo $H_{NS,3S,6S}$ del extremo reductor tiene que dividirse en configuraciones α y β . La configuración α del protón anomérico del residuo H_{NS} es dominante ($\sim 95\%$) en los disolventes próticos, tales como óxido de deuterio, basándose en el efecto anomérico. Adicionalmente, pudo detectarse la presencia de dos restos I_{2S} . Es interesante que las señales anoméricas de los dos I_{2S} que resuenan usualmente alrededor de 5,20 ppm, estaban desplazadas. Esto es muy probablemente consecuencia de un cambio en la conformación del resto interno I_{2S} de ${}^1C_4 a {}^2S_0$. Asimismo, pudo confirmarse que el oligosacárido contiene tres $H_{NS,6S}$ y un solo residuo G no sulfatado basándose en los valores de integración de los protones H-2 de $H_{NS,6S}$ y los residuos G observados a 3,28 y 3,38 ppm, respectivamente. La presencia de una sola señal N-acetilmetilo del residuo $H_{Nac,6S}$ a 2,1 ppm demuestra claramente que el oligosacárido contiene un solo residuo $H_{Nac,6S}$. La presencia de señales correspondientes a los protones H-6 de los residuos H_{NY} sulfatados en 6-O ($Y = Ac$ o S) aproximadamente a 4,3 y 3,9 ppm, confirma que todos los residuos H_{NY} del oligosacárido están O-sulfatados en C-6. En conjunto, estos datos permiten la asignación de secuencia de la especie principal en la muestra de AT-10 como $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{Nac,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

Sumario

Se ha demostrado en este ejemplo que pueden utilizarse varias técnicas analíticas rigurosas para convergir en la estructura de un oligosacárido HLGAG complejo. Adicionalmente, se demostró que la asignación de secuencias utilizando los dos procedimientos de secuenciación, *a saber*, IGS y PEN-MALDI es la misma. Esto es sumamente evidente en el tratamiento parcial y exhaustivo del decaacárido con ácido nítrico (Figura 3). Es importante que, por el presente análisis, es posible ahora asignar las secuencias siguientes a los deca, octa, hexa, y tetrasacáridos observados por la electroforesis en gel y MALDI-MS, *es decir*, DDD4-7, DD4-7, D4-7, y un tetrasacárido 4-7 resistente al ácido nítrico. En el ejemplo que sigue, se exploraron las consecuencias funcionales de un sitio de fijación de AT-III parcialmente intacto y la acción enzimática de las heparinasas frente al sitio de fijación de AT-III.

Adicionalmente, se demostró que el método PEN-MALDI es suficientemente sensible y discriminador para permitir a los autores de la invención determinar la información de secuencia para una mezcla de oligosacáridos. Es esencial subrayar el hecho de que la convergencia a una solución única para AT-10 utilizando PEN-MALDI es posible utilizando restricciones experimentales ortogonales múltiples (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42), minimizando así la dependencia de una sola restricción experimental, *v.g.*, la escisión con ácido nítrico. Finalmente, el ejemplo presentado ilustra el valor de PEN-MALDI para obtener información definitiva de secuencia para oligosacáridos biológica y farmacológicamente relevantes.

Ejemplo 2

Escisión del Sitio de Fijación de Antitrombina III en la Heparina por las Heparinasas y su Implicación en la Generación de Heparina de Peso Molecular Bajo

Introducción

La heparina ha sido utilizada como anticoagulante clínico durante más de 50 años, lo que la convierte en uno de los agentes farmacológicos más eficaces conocidos. Gran parte de la actividad de la heparina puede atribuirse a su capacidad para fijarse a la antitrombina III (AT-III). La heparina de peso molecular bajo (LMWH), derivada de heparina por su descomposición controlada, mantiene gran parte de la actividad antitrombótica de la heparina sin muchos de sus graves efectos secundarios. La significación clínica de LMWH ha puesto de manifiesto la necesidad de comprender

y desarrollar medios químicos y enzimáticos para generarla. Las herramientas enzimáticas primarias utilizadas para la producción de heparina de peso molecular bajo son las heparinasas de *Flavobacterium heparinum*, específicamente las heparinasas I y II. Utilizando compuestos modelo pentasacáridos y hexasacáridos, se ha demostrado que las heparinasas I y II, pero no la heparinasa III, escinden el sitio de fijación de AT-III. Adicionalmente, se demuestra en esta memoria que la sulfatación en 3-O de la glucosamina en el extremo reductor de un enlace glicosídico imparte resistencia a la escisión por las heparinasas I, II y III. Finalmente, se examinan las consecuencias biológicas y farmacológicas de un oligosacárido de heparina. Se demuestra que un oligosacárido de este tipo carece de algunos de los atributos funcionales de HLGAG que contienen un sitio AT-III intacto.

Métodos

Materiales. Penta 1 y 2 fue un obsequio generoso del Dr. Robert Rosenberg, Departamento de Biología, MIT. Se generó Hexa 1 utilizando digestión de heparina con heparinasa I (Ernst, S., Langer, R., Cooney, C. L. y Sasisekharan, R. (1995) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 387-444). La heparina se adquirió de Celsus Laboratories Cincinnati, OH y se calcularon las concentraciones molares de los stocks basándose en un peso molecular medio de 13.000 Da. La enoxaparina se adquirió de Avantis Pharmaceuticals (Chicago, IL).

Productos de Digestión. Se completaron las digestiones con heparinasa I como se ha descrito. (Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R. (1999) *Science* 286, 537-42 and Rhomberg, A. J., Ernst, S., Sasisekharan, R. y Biemann, K. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4176-81). Las reacciones con heparinasa II o III se completaron esencialmente del mismo modo a la temperatura ambiente en ovoalbúmina 10 μ M, sulfato de dextrano 1 μ M, y etilendiamina 10 mM, pH 7,0. Las digestiones cortas se completaron con enzima 50 nM durante 10 minutos, mientras que las digestiones exhaustivas se completaron con enzima 200 nM durante una noche. Se recogieron los espectros de masas utilizando los parámetros arriba indicados (véase también Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 12 de sept. 2000; 97(19):10359-64) y se calibraron externamente utilizando señales para (RG)₁₉R protonizado y su complejo con un hexasacárido derivado con ácido nitroso de la secuencia I₂₅H_{NS,6S}I₂₅H_{NS,6S}I₂₅Man_{6S}.

Experimentos de Titulación por Fluorescencia en Equilibrio. Las titulaciones de AT-III humana con el decasacárido AT-10 o heparina se completaron a 25°C utilizando una máquina Fluorolog 2 (Spex Instruments) (Meagher, J. L., Beechem, J. M., Olson, S. T. y Gettins, P. G. (1998) *J Biol Chem* 273, 23283-9 y Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Las medidas se completaron en fosfato de sodio 20 mM, que contenía EDTA 0,1 mM y 0,1% de PEG 8.000, ajustado a pH 7,4 ó 6,0. Con el tampón de pH 7,4, se añadió cloruro de sodio a una concentración final de 100 mM.

Se recogieron los espectros de emisión por fluorescencia desde 300 a 400 nm con una longitud de onda de excitación de 280 nm y un tiempo de integración de 5 s. Resumidamente, los experimentos de titulación se condujeron como sigue - se añadieron partes alícuotas de decasacárido o heparina a una solución 1 μ M de AT-III, se dejó que la solución alcanzara el equilibrio durante un minuto, y se recogió un espectro de emisión. Se añadieron partes alícuotas sucesivas de sacárido y se ajustó la señal de fluorescencia para justificar la dilución de la proteína.

Medidas Biológicas de la Actividad de Decasacárido. Se determinó *in vitro* la actividad anticoagulante como se ha descrito previamente (Hoppensteadt, D. A., Jeske, W. P., Walenga, J. M., Fu, K., Yang, L. H., Ing, T. S., Herbert, J. M. y Fareed, J. (1999) *Thromb Res* 96, 115-24 y Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R. A., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A., Mendes, A. y Nader, H. B. (1999) *Biochim Biophys Acta* 1428, 273-83), de acuerdo con la farmacopea de los Estados Unidos. Los ensayos de inhibición de la generación de trombina (FIIA) y factor Xa (FXa) se completaron esencialmente como se ha descrito. De manera resumida, el decasacárido AT-10, Enoxaparina LMWH o el pentasacárido sintético de fijación de AT-III (Penta 1) utilizado en este estudio se disolvió en solución salina estéril a las concentraciones designadas. Se añadió a esta muestra un volumen igual de plasma deficiente en fibrinógeno, diluido en relación 1:8 en Tris-HCl 100 mM (pH 8,5). En una muestra separada, se añadió la misma concentración de oligosacárido de heparina y actina en una relación 1:1 a Spectrozyme TH o FXa. De esta manera, se midió la generación intrínseca de IIa y Xa. Adicionalmente, para justificar la inhibición de la trombina y la generación extrínseca de FXa, se diluyó tromboplastina C en relación 1:6 con Spectrozyme TH o FXa. Para todas las muestras, se midió la densidad óptica a 405 nm y se expresan los resultados como % de inhibición comparada con un control de solución salina sin suplemento. Para estos ensayos, el reactivo trombina (Fibrindex) se obtuvo de Ortho Diagnostic Systems, Inc. (Raritan, NJ), y el factor Xa se obtuvo de Enzyme Research (South Bend, IN). Spectrozyme TH y FXa se obtuvieron de American Diagnostica (Greenwich, CT).

Se utilizaron también datos de sangre entera para determinar la actividad anticoagulante de AT-10. Los ensayos de tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT) y tiempo de protrombina (PT) se condujeron de manera similar a la que se ha consignado previamente (Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R. A., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A., Mendes, A. y Nader, H. B. (1999) *Biochim Biophys Acta* 1428, 273-83). El reactivo APTT se obtuvo de Organon Teknika (Durham, NC) y el Reactivo HepTest se obtuvo de Haemachem (St. Louis, MO).

Resultados

Acción Enzimática de las Heparinasas Frente al Sitio de Fijación de AT-III

5 Previamente, se investigó la especificidad de sustrato de las heparinasas I y II frente a AT-10 (Romberg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12232-7 y Ernst, S., Rhornberg, A. J., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4182-7). Estos estudios, sin embargo, se llevaron a cabo suponiendo una estructura publicada (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. y Linhardt, R. J. (1996) *J Biol Chem* 271, 32040-7). Teniendo en cuenta la estructura ahora determinada de AT-10 descrita en esta memoria (véase también Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 12 sept. 2000; 97(19):10359-64), se examinó de nuevo la acción enzimática de las heparinasas I, II y III frente a los oligosacáridos que contienen un sulfato en posición 3-O que es importante para la fijación de AT-III con afinidad alta. Para estos estudios, se utilizaron tres oligosacáridos, dos pentasacáridos (Penta 1 y Penta 2, Figura 5) y un hexasacárido (Hexa 1, Figura 5). Debe observarse el hecho de que los pentasacáridos se derivan por síntesis, mientras que Hexa 1 se deriva por tratamiento de heparina con heparinasa I. Como resultado, al contrario que Penta 1 o Penta 2, Hexa 1 contiene un ácido $\Delta^{4,5}$ -urónico en el extremo no reductor. Adicionalmente, Penta 1 y Penta 2 difieren uno de otro únicamente por la presencia (Penta 1) o ausencia (Penta 2) de un sulfato en posición 3-O en el residuo glucosamina interno (Figura 5). La estrategia empleada en esta memoria implica esencialmente tratamiento de cada uno de los sacáridos con heparinasa I, II o III, respectivamente, en condiciones de digestión exhaustivas, seguido por la identificación de los productos resultantes por espectrometría de masas. La masa calculada de los sustratos sacáridos y los productos, su identidad, y la masa observada se enumera en la Tabla 4.

TABLA 4

Estructuras químicas y valores m/z de los oligosacáridos HLGA

Complejo (M+H) ⁺	Sacárido (masa)	Estructura Química	Masa (Calculada)
5842,0	1615,2	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS14]_{6S}IH_{Nac.6S}GH_{NS,3S,6S}$	1614,3
5735,1	1508,3	$H_{NS}[RS15]_{6S}GH_{NS,3S,6S}IH_{Nac.6S}GH_{NS,3S,6S,OMe}$	1508,2
5655,1	1428,3	$H_{NS}[RS15]_{6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$	1428,1
5316,3	1089,5	$\Delta UH_{NS}[RS17]_{6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$	1088,9
5266,3, 5264,2	1036,5, 1036,1	$\Delta UH_{Nac}[RS18]_{6S}GH_{NS,3S,6S}$	1036,9
5064,1	837,3	$H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$	836,7
5143,4, 5144,0	916,7, 917,3	$H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$	916,8
4818,0, 4818,0, 4818,7, 4818,7	591,3, 591,3, 591,9, 592,0	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS19]_{6S,OMe}$	591,5
4807,2, 4805,9	577,4, 577,8	$\Delta U_{2S}H_{NS}[RS20]_{6S}$	577,5

45 En la columna 1 de la Tabla 4 se muestra el valor m/z del complejo protonizado 1:1 del sacárido y el péptido básico (RG)₁₉R. La columna 2 muestra la masa observada del sacárido obtenido por sustracción de la masa del péptido básico protonizado del complejo protonizado 1:1. Las estructuras químicas de los sacáridos para los picos correspondientes en los espectros de masas se muestran en la columna 3. La columna 4 muestra las masas teóricas calculadas para las estructuras químicas. Obsérvese que la masa observada está comprendida dentro de ± 1 Da de la masa calculada.

50 En el caso de Penta 1, únicamente las heparinasas I y II, pero no la heparinasa III, escinden el oligosacárido en un trisacárido pentasulfatado de masa 916,7 y un disacárido trisulfatado de masa 591,3 (Figura 6), lo que es indicativo de la escisión en el enlace glicosídico que contiene I_{2S} (enlace A.2 en la Figura 5). Los datos presentados en la Figura 6 muestran que los enlaces que contienen 3-O son resistentes a la escisión por heparinasa I, II o III. Esta resistencia parece ser independiente de la longitud. Sobre la base de la comprensión previa de la estructura de AT-10 (Toida, T., Hileman, R. E., Smith, A. E., Vlahova, P. I. y Linhardt, R. J. (1996) *J Biol Chem* 271, 32040-7), se informó que la heparinasa II podría escindir un sacárido que contenga sulfato en posición 3-O con tal que el mismo fuera de longitud suficiente (Rhomborg, A. J., Shriver, Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12232-7). Teniendo en cuenta la estructura recién determinada para el deca-sacárido AT-10 (véase también Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 12 de sept. 2000; 97(19):10359-64), así como los datos presentados en la Figura 6, tienen que reinterpretarse los hallazgos previos, y en esta memoria se llega a la conclusión de que la heparinasa II no escinde los enlaces con una glucosamina sulfatada en la posición 3-O próxima al extremo reductor. Adicionalmente, la resistencia de este enlace a la acción de las heparinasas I, II y III es debida totalmente a la presencia de un sulfato en posición 3-O como se muestra por el tratamiento con heparinasa I, II y III de Penta 2 (Figura 7). En este caso, todas las heparinasas escinden eficientemente el sustrato. Como en el caso de Penta 1, la heparinasa I escinde en el enlace que contiene I_{2S}, produciendo un trisacárido de masa 837,3 y un disacárido de masa 591,9 (escisión en el enlace B.2 en la Figura 5).

Inversamente, tanto heparinasa II como heparinasa III escinden en el enlace no sulfatado que contiene G, escindible fácilmente ahora (enlace B.1 en la Figura 5). La heparinasa III escinde únicamente este enlace, dando un tetrasacárido de masa 1428,3 y un monosacárido (no observado). La heparinasa II escinde en los enlaces B.2 y B.1, reduciendo Penta 2 a un monosacárido y dos disacáridos, uno de los cuales se observa y tiene una masa de 592,0 (Figura 7).

5

Para explorar adicionalmente la especificidad de sustrato de las heparinasas hacia los sacáridos sulfatados en 3-O, se utilizó Hexa 1, un hexasacárido derivado de heparinasa I que contiene sulfato en posición 3-O (Figura 8). Se seleccionó también Hexa 1 como sustrato para este estudio debido a que el mismo representa una truncación en el extremo no reductor de AT-10 y contiene el mismo resto $\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ en el extremo reductor. Se encontró que Hexa 1 es sensible a la escisión por las heparinasas II y III, pero no a la escisión por la heparinasa I. Debe observarse que la escisión de Hexa 1 por heparinasa II o III *no* tiene lugar en el enlace que contiene G sino, en lugar de ello, en el enlace que contiene I (escisión en C.1 pero no en C.2 en la Figura 5). En el caso de la escisión por heparinasa II, los productos son un tetrasacárido de masa 1036,5 y un disacárido de masa 577,4. Para la escisión con heparinasa III, se observan los mismos productos, *es decir*, un tetrasacárido de masa 1036,1 y un di-sacárido de masa 577,8. Estos resultados confirman la opinión de los autores de la invención de que los enlaces con un sulfato en 3-O próximo al extremo reductor están protegidos contra la acción de las heparinasas, con inclusión de la heparinasa II. Con el tratamiento de Hexa 1 tanto por heparinasa II como por heparinasa III, se forma un tetrasacárido resistente a las heparinasas, con la secuencia $\Delta\text{UH}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$. El hecho de que este tetrasacárido es resistente a la escisión ulterior con heparinasa es coherente con observaciones previas (Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M., Sugahara, K., Khoo, K. H., Morris, H. R. y Dell, A. (1993) *J Biol Chem* 268, 4780-7). Coherentemente también con la especificidad de sustrato conocida de la heparinasa I, Hexa 1, que no contiene enlace $\text{I}_{2\text{S}}$ alguno, no es escindido por esta enzima.

A la vista de estos estudios, es evidente ahora que las heparinasas I y II pueden escindir el sitio AT-III en el enlace $\text{H}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}$, donde el enlace fácilmente escindible se designa con una flecha (A.2 de Penta 1 y B.2 de Penta 2, Figura 5). Adicionalmente, con la estructura de nueva asignación para AT-10, se encuentra que los enlaces con un sulfato en posición 3-O en la glucosamina del extremo reductor, *a saber*, $\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$ no son escindibles por las heparinasas II o III (A. 1 de Penta 1 y B.1 de Penta 2, Figura 5). Adicionalmente, se encuentra que esta inhibición es debida enteramente a la modificación inusual 3-O sulfato. Finalmente, considerado junto con los estudios previos de los autores de la invención de la acción enzimática de la heparinasa I, la estructura de AT-10 refuerza el hecho de que la heparinasa I actúa de una manera exóptica, y progresiva sobre los oligosacáridos de heparina/heparano (Ernst, S., Rhomberg, A. J., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4182-7).

Fijación de AT-III al Decasacárido AT-10: El análisis de la secuencia de AT-10 de los autores de la invención comunicado en esta memoria y en Shriver, Z., Raman, R., Venkataraman, G., Drummond, K., Turnbull, J., Toida, T., Linhardt, R., Biemann, K. y Sasisekharan, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 12 de sep 2000; 97(19):10359-64 reveló que este decaacárido no contiene una secuencia de pentasacárido de fijación a AT-III intacta sino que contiene en su lugar únicamente la unidad de trisacárido del extremo no reductor. Los autores de la invención trataron de extender esta asignación de secuencia y proporcionar un contexto funcional a este resultado por medida de la afinidad de fijación a AT-III de AT-10. A pH 7,4, $I = 0,15$, AT-10 tiene muy poca afinidad para AT-III (Figura 9). Inversamente, en las mismas condiciones, la heparina de la mucosa intestinal de porcino fijaba AT-III con un valor K_D aparente de 36 nM. Para medir exactamente la afinidad de AT-10 para AT-III, se completó la titulación en su lugar a pH 6,2, condiciones que se sabe favorecen la fijación de AT-III a los sacáridos. En estas condiciones, AT-10 fijaba AT-III con un valor K_D aparente de $0,8 \mu\text{M}$, mientras que el valor K_D para la heparina de longitud total disminuía a 10 nM. EL valor K_D medido para AT-10 es comparable con sacáridos similares que tienen un extremo reductor truncado, con valores K_D medidos de $0,3\text{-}2 \mu\text{M}$ (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Así pues, los resultados de los experimentos de titulación son coherentes con que AT-10 contenga una secuencia de fijación del pentasacárido AT-III parcialmente intacta (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Las tres unidades de sacárido en el extremo no reductor de la secuencia del pentasacárido, *a saber*, $\text{H}_{\text{NAC},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$, son fundamentalmente responsables de la fijación del estado nativo de AT-III, mientras que la unidad de disacárido del extremo reductor, $\text{I}_{2\text{S}}\text{H}_{\text{NS},6\text{S}}$, que está ausente en AT-10, es importante para la fijación de la AT-III activa, alterada conformacionalmente. El valor K_D medido para AT-10 ($0,8 \mu\text{M}$ a pH 6,0, $I = 0,05$) es ~ 100 veces mayor que el de la heparina de longitud total, lo que confirma que AT-10 no contiene una secuencia de pentasacárido AT-III intacta. La disminución en la afinidad de AT-III observada para AT-10 no puede deberse simplemente a una cuestión de tamaño dado que, en estudios previos, se ha demostrado que el pentasacárido sólo tiene una afinidad similar a la de la heparina de longitud total (Desai, U. R., Petitou, M., Bjork, I. y Olson, S. T. (1998) *J Biol Chem* 273, 7478-87). Una vez medida la interacción de fijación entre AT-III y el decaacárido, se trató a continuación de definir las consecuencias funcionales de un oligosacárido HLGAG que contenga únicamente un sitio de fijación parcial de AT-III.

Actividad biológica de AT-10: Como podría esperarse para un oligosacárido que no contiene un sitio AT-III intacto, la actividad biológica de AT-10 es menor que la de la enoxaparina (utilizada aquí como ejemplo de una LMWH) o la del pentasacárido, Penta 1 (Figura 10). Coherentemente con el mecanismo conocido de inhibición mediada por la heparina de la actividad de trombina por AT-III, ni el decaacárido ni el pentasacárido tienen actividad anti-IIa importante (Figura 10a). En el caso del pentasacárido, está falta de actividad es debida enteramente a que su tamaño es insuficiente para actuar como molde para la formación de un complejo AT-III/IIa. Para el decaacárido, esta restricción de tamaño es también una explicación probable (dado que estudios bioquímicos rigurosos han implicado que oligosacáridos con al menos 18 unidades de monosacárido son importantes para la formación eficiente del complejo) (Petitou, M., Herault, T. P., Bernat, A., Driguez, P. A., Duchaussoy, P., Lormeau, J. C. y Herbert, J. M. (1999) *Nature* 398, 417-22), aunque la falta de un sitio AT-III intacto puede contribuir también a su reducida actividad anti-IIa.

60

65

ES 2 324 701 T3

Estos resultados se confirman y amplían por examen de la actividad anti-Xa del factor Xa de tres usos del suero (Figura 10b) o el factor Xa purificado (Figura 10c). Como se ha expuesto anteriormente, la inhibición del factor Xa por AT-III requiere fijación del motivo pentasacárido sólo concomitante con un cambio conformacional en AT-III. En el ensayo anti-Xa, tanto enoxaparina como el pentasacárido tienen actividad notablemente mayor que el decaacárido. Los valores CI_{50} de enoxaparina y el pentasacárido sintético son 66 nM y 39 nM, respectivamente, mientras que el de AT-10 es diez veces mayor a 280 nM. Estos valores son coherentes con la menor afinidad de AT-10 para AT-III en comparación con heparina, que se determinó en los experimentos de titulación por fluorescencia de AT-III (Figura 9). Que el decaacárido posee actividad anti-Xa no es sorprendente, dado que la unidad del trisacárido no reductor (presente en el decaacárido) es fundamentalmente responsable de la fijación inicial de heparina a AT-III. La unidad de disacárido del extremo reductor, *es decir*, $I_{2S}H_{NS,6S}$ (ausente en AT-10) se espera que se fije a la antitrombina III alterada conformacionalmente, estabilizándola. Las medidas HepTest (Figura 10d) proporcionan resultados similares, *a saber*, que enoxaparina y el pentasacárido tienen actividad significativamente mayor que el decaacárido AT-10. Consideradas como un todo, las actividades anti-IIa y anti-Xa del decaacárido comparado con el pentasacárido y la enoxaparina están satisfactoriamente de acuerdo con los experimentos de titulación de AT-III así como con la farmacología conocida del mecanismo de la heparina en la inhibición de la cascada de coagulación.

En resumen, se demuestra en este ejemplo que las heparinasas I y II escinden el sitio de fijación de AT-III dejando atrás la unidad de trisacárido en el extremo reductor del oligosacárido. Se demuestra también que la heparinasa III no escinde el sitio AT-III debido a la presencia de un sulfato en posición 3-O en el residuo glucosamina interno. Así pues, la utilización de las heparinasas I o II para la generación de LMWHs requiere precauciones extremadas para asegurar la retención de los sitios antitrombina III intactos en los fragmentos LMWH. De hecho, los resultados presentados en esta memoria demuestran que las heparinasas I o II pueden ser agentes ideales para la *neutralización* de dosis farmacológicas de heparina.

Ejemplo 3

Desarrollo de un Método de Análisis de la Composición y Caracterización Estructural de las Heparinas

Introducción

Para purificar UFH e identificar sus componentes, se digirió exhaustivamente UGH y se analizó utilizando electroforesis capilar y espectrometría de masas MALDI. La electroforesis capilar (CE) es un método muy sensible con elevado poder de resolución para el análisis de la composición de disacáridos de las heparinas. Se desarrolló un método de análisis de la composición (CAM) que utiliza CE para cuantificar los bloques de construcción disacáridos de UFH y LMWH. Este método utiliza menos de un microgramo de heparina, es eficiente en tiempo (cada operación CE tiene una duración de 25 minutos), es independiente de la concentración, y es sumamente reproducible. Una ventaja de este método es su eficacia como proceso de control de calidad que puede ayudar a minimizar la variación lote a lote en la composición de LMWH diferentes.

Así pues, se ha utilizado CE en combinación con espectrometría de masas MALDI fuera de línea para identificar un tetrasacárido único en el producto de digestión exhaustiva de UFH, y LMWH. Este tetrasacárido, que forma parte del dominio de pentasacárido de fijación a AT-III de los glucosaminoglucanos, es resistente a la degradación ulterior con heparinasa I, II, o III. Se demuestra a continuación que la utilización de este tetrasacárido único en la medida directa del anti-factor Xa de la heparina mediaba la actividad anticoagulante.

Métodos

Productos Químicos y Materiales: Se adquirió UFH de Celsus Laboratories (Cincinnati, OH) y se calcularon las concentraciones molares de los stocks sobre la base de un peso molecular medio de 13.000 Da. Los estándares de disacáridos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las heparinasas I y III son heparinasas recombinantes. La heparinasa II procede de *Flavobacterium heparinum*, purificada como se ha descrito previamente. (Shriver *et al.*, Journal of Biological Chemistry 1998, 273, 22904-22912).

Análisis de la composición: Se sometió UFH a despolimerización exhaustiva con un cóctel de enzimas constituido por Heparinasa I, Heparinasa II, y Heparinasa III. Se digirieron 9 μ l de UFH de concentración 10 μ g/ μ l en agua con 1 μ l de cóctel de enzimas constituido por 100 nM en cada caso de heparinasa I, II, y III en acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 100 mM, tampón de acetato de calcio 5 mM, pH 7,0 durante 12 h a 37°C. La muestra para CE se preparó por dilución de 1 μ l del producto de digestión con 9 μ l de agua. Las muestras se analizaron por CE en polaridad invertida con un tampón corriente de tris/fosfato 50 mM, sulfato de dextrano 10 μ M, pH 2,5. Se inyectaron 57 nl de cada muestra en la CE y los tiempos de ejecución fueron de 25 minutos. Cada muestra se digirió por duplicado y el experimento se repitió dos veces para cada muestra, dando como resultado cuatro lecturas por muestra. Se recogieron la totalidad de los 8 picos resultantes, y se comprobó la pureza de las muestras recogidas por reinyección en CE, midiéndose sus masas por espectrometría de masas MALDI fuera de la línea. La identidad de los picos 1-7 se confirmó ulteriormente por adaptación de su tiempo de migración con el de disacáridos estándar disponibles comercialmente. Por ejemplo, el espectro CE del pico 1 se recogió del análisis CE del producto de digestión enzimático total de UFH y se generó un espectro de masas MALDI del pico 1. Los espectros de masas se recogieron utilizando parámetros como los reseñados previamente y se calibraron externamente utilizando señales para (RG)₁₉R protonizado y su complejo con un hexasacárido derivado de ácido nitroso de la secuencia $I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}$.

ES 2 324 701 T3

Resultados

Como se observa en la Figura 11A, se ven 8 picos en el espectro CE. Cada uno de los picos marcados 1 a 8 tiene un tiempo de migración idéntico en las diferentes muestras. Después de la recogida de cada pico y la comparación de la pureza de cada muestra por re-inyección en CE, se midió su masa por espectrometría de masas MALDI fuera de la línea. El pico 1 tiene la misma masa que el disacárido de heparina trisulfatado $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$. El $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 1 en condiciones CE idénticas. Esto identifica el pico 1 como $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$. De manera similar, se establecieron las identidades de los 7 picos de 2 a 7 en el producto de digestión de análisis de la composición de UFH. Los resultados se muestran las Figuras 3A y 3B - 6A y 6B. La identidad de cada pico se confirmó ulteriormente por adaptación de su tiempo de migración con el de disacáridos estándar disponibles comercialmente. Los picos 2, 3, y 4 son disacáridos disulfatados, y los picos 5, 6 y 7 son disacáridos monosulfatados.

Se generó una traza del espectro de masas CE y MALDI del pico 2. Este pico tiene la misma masa que $\Delta U_{2S}H_{NS}$. Asimismo, el $\Delta U_{2S}H_{NS}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 2 en condiciones CE idénticas. Esto confirma que el pico 2 es $\Delta U_{2S}H_{NS}$.

Se generó una traza del espectro de masas CE y MALDI del pico 3. Dicho pico tiene la misma masa que $\Delta UH_{NS,6S}$. Asimismo, el $\Delta UH_{NS,6S}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 3 en condiciones CE idénticas. Esto confirma que el pico 3 es $\Delta UH_{NS,6S}$.

Se generó una traza de la CE del pico 5. Dicho pico tiene la misma masa que ΔUH_{NS} . Asimismo, el ΔUH_{NS} comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 5 en condiciones CE idénticas. Esto confirma que el pico 5 es ΔUH_{NS} .

Se generó una traza de la CE del pico 6. Dicha traza tiene la misma masa que $\Delta U_{2S}HN_{NAC}$. Asimismo, el $\Delta U_{2S}H_{NAC}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 6 en condiciones CE idénticas. Esto confirma que el pico 6 es $\Delta U_{2S}H_{NAC}$.

Se generó una traza de la CE del pico 7. Dicha traza tiene la misma masa que $\Delta UH_{NAC,6S}$. Asimismo, el $\Delta UH_{NAC,6S}$ comercial de Sigma tiene el mismo tiempo de migración que el pico 7 en condiciones CE idénticas. Esto confirma que el pico 7 es $\Delta UH_{NAC,6S}$.

Además de los siete disacáridos, se identificó también un tetrasacárido (pico 8) en el material obtenido por digestión exhaustiva de heparina con heparinasa I, II, y III. Se aisló este tetrasacárido, y se determinó su masa por espectrometría de masas MALDI. El material tenía el mismo tiempo de migración en CE que el tetrasacárido $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$ que formaba parte del decaacárido $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$, cuya estructura se determinó previamente. Esto condujo a la confirmación del pico 8 como el tetrasacárido $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Este pico es resistente a la degradación ulterior con las heparinasas I, II, o III.

Además de los picos 1-8, había una pequeña cantidad de disacáridos no sulfatados que migraban de modo mucho más lento que los sacáridos sulfatados, como se muestra en la Figura 11B. Se estima que los disacáridos no sulfatados constituyen <2% de UFH como se muestra en la Tabla 5 (más adelante).

La Figura 12 muestra la traza CE de la digestión exhaustiva del pentasacárido de AT-10 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S} \Delta U_{2S}H_{NS,6S} \Delta U_{2S}H_{NS,6S} IH_{NAC,6S} GH_{NS,3S,6S}$. El tetrasacárido 8 en la digestión exhaustiva de la heparina tiene la misma masa, y el mismo tiempo de migración que $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$. Esto confirma el pico 8 como $\Delta UH_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}$.

Ejemplo 4

Respuesta UV de los disacáridos 1-7

Introducción

Se determinó el factor de respuesta (RF) a UV de cada uno de los disacáridos (1-7) para identificar ulteriormente los componentes de los disacáridos procedentes del material obtenido por la digestión exhaustiva. El RF para un disacárido se define como la cantidad de dicho disacárido en ng que proporciona la misma respuesta que 1 ng de $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$.

Métodos

Determinación del Factor de Respuesta: Se calculó RF para los diferentes disacáridos por medida de la respuesta a UV de 57 ng de cada disacárido y normalización de la misma con la de $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$ como se muestra en la Tabla 5.

ES 2 324 701 T3

Resultados

Cada uno de los siete disacáridos (1-7) tiene una magnitud diferente de respuesta A_{232} a UV. Se disponía de una cantidad insuficiente del tetrasacárido 8 ($\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$) para permitir la medida de la absorbancia A_{232} a UV para este tetrasacárido. Es de esperar que los tetrasacáridos tengan menor absorbancia A_{232} a UV que los disacáridos y por ello se ha supuesto que $\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$ tenga la misma respuesta que el menos sensible de los disacáridos, a saber, 1 ($\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$).

TABLA 5

Compuesto	Respuesta para 57 ng de disacáridos	Factor de respuesta (RF)
1 ($\Delta U_{2S}, H_{NS,6S}$)	10421,1	1
2 ($\Delta U_{2S}, H_{NS}$)	13551,45	0,769
3 ($\Delta U_{H_{NS,6S}}$)	14595,3	0,714
4 ($\Delta U_{2S}, H_{NAC,6S}$)	13551,45	0,769
5 ($\Delta U, H_{NS}$)	23956,35	0,435
6 ($\Delta U_{2S}, H_{NAC}$)	32363,55	0,322
7 ($\Delta U, H_{NAC,6S}$)	22903,35	0,455
8 ($\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$)	10421,1 (suposición)	1

En la Tabla 5, se calculó el factor de respuesta (RF) para los picos 1-8. La segunda columna da la absorbancia UV a 232 nm para la inyección de 57 nl de concentración 1 ng/nl, es decir 57 ng de los disacáridos (1-7) comerciales estándar. No pudo medirse la absorbancia UV a 232 nm para la concentración conocida de 8 por falta de disponibilidad de muestra en cantidad suficiente. Se supone que 8 tiene la misma respuesta que la del menos sensible de los 7 disacáridos, a saber, 1. La tercera columna da el RF para cada uno de los 7 picos, definiéndose el RF para un disacárido como la fracción de 1 ng del mismo que proporciona la misma respuesta que 1 ng de 1 ($\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$).

Ejemplo 5

Determinación de los sacáridos no sulfatados en la heparina

Introducción

Aunque la heparina se ha clasificado como un glucosaminoglucano sulfatado, la misma contiene una cantidad menor de sacáridos no sulfatados. Se llevaron a cabo procedimientos para determinar la cantidad de sacáridos no sulfatados en la heparina. Después de esta determinación, puede utilizarse el valor RF calculado por los picos 1-8 para estimar el porcentaje en peso de los bloques de construcción sulfatados de heparina a partir del AUC medida por CE.

Métodos

Un peso conocido de heparina sometida a digestión exhaustiva con el cóctel de enzimas se inyectó en la CE. El área bajo la curva (AUC) medida para los picos 1-8 en la Figura 11 se convierte en el peso de sacáridos sulfatados utilizando la respuesta para cantidades conocidas de los picos 1-8. La diferencia entre la cantidad total de sacáridos de heparina inyectada en la CE, y la cantidad total de disacáridos y tetrasacáridos sulfatados, da la cantidad de sacáridos no sulfatados en la digestión completa de UFH. Multiplicando el AUC % relativo por el RF se obtiene la concentración relativa corregida o el AUC % relativo de los picos 1-8 en términos de $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$.

Resultados

La Tabla 6 muestra la estimación de los sacáridos no sulfatados en la heparina. Como se muestra en la Tabla 6, se determinó que los sacáridos no sulfatados constituyen menos del 2% de la heparina. Los sacáridos no sulfatados no se tienen en cuenta en la construcción de la tabla de análisis de la composición de la heparina como se explica más adelante. La columna 1 de la Tabla 7 da el valor de AUC medido para los picos 1-8. La columna 2 da el % relativo de AUC. Por multiplicación del % relativo de AUC por el RF se obtiene la concentración relativa corregida o el % relativo de AUC de los picos 1-8 en términos de $\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$. Éstos se normalizan luego para obtener el porcentaje en peso de los picos de disacáridos 1-7 y el pico de tetrasacárido 8. Como se demuestra en esta memoria, la construcción de esta tabla de análisis de composición es independiente de la concentración o el peso del producto de digestión con heparina analizado por la CE.

TABLA 6

Compuesto	AUC	Respuesta para 57 ng de muestra	Cantidad de sacárido en ng
1 ($\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$)	7294,5	10421,1	39,9
2 ($\Delta U_{2S, H_{NS}}$)	1040,8	13551,45	4,4
3 ($\Delta U_{H_{NS, 6S}}$)	1437,9	14595,3	5,3
4 ($\Delta U_{2S, H_{NAC, 6S}}$)	379,3	13551,45	1,6
5 ($\Delta U_{H_{NS}}$)	685,1	23956,35	1,7
6 ($\Delta U_{2S, H_{NAC}}$)	502,9	32363,55	0,9
7 ($\Delta U_{H_{NAC, 6S}}$)	482,3	22903,35	1,1
8 ($\Delta U_{H_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}}$)	184,7	10421,1 (suposición)	1
Cantidad total de los sacáridos sulfatados de 1-8			55,9
Cantidad de sacáridos no sulfatados			57-55,9 = 1,1 ng (1,9%)

La Tabla 6 muestra una estimación de la cantidad de sacáridos no sulfatados en la digestión exhaustiva de UFH con las heparinasas I, II, y III. Los picos 1-7 se muestran como disacáridos conocidos, como se explica en las Figuras 2-6. El pico 8 es el tetrasacárido $\Delta U_{H_{NAC, 6S}GH_{NS, 3S, 6S}}$ que es resistente a la degradación ulterior por las heparinasas I, II o III. La segunda columna da el área bajo la curva (AUC) medida para cada uno de los picos para una inyección de 57 nl de concentración 1 ng/nl del producto de digestión por análisis de la composición de UFH. La tercera columna da la absorbancia UV a 232 nm para la inyección de 57 nl de concentración 1 ng/nl de cada uno de los siete disacáridos comerciales estándar (1-7). La columna 4 da el peso de los diversos sacáridos sulfatados en ng. La diferencia entre su suma (55,9 ng) y la cantidad de heparina inyectada ($57 \times 1 = 57$ ng) da la cantidad de sacáridos no sulfatados presentes en el producto de digestión por análisis de la composición de UFH.

ES 2 324 701 T3

Ejemplo 6

Comprobación de la instrumentación y terminación de la digestión

5 Introducción

Para comprobar la reproducibilidad del instrumento y averiguar si la digestión por análisis de la composición es realmente completa para las concentraciones de enzima utilizadas, se digirieron por duplicado muestras de UFH y se analizaron dos veces por CD. Los resultados se compararon luego para determinar si existía variabilidad entre las operaciones.

Métodos

15 Se digirió UFH como se describe en el Ejemplo 1A, métodos con 1 μ l o 5 μ l de cóctel de enzimas (EC). Cada muestra se digirió por duplicado, y el producto obtenido en cada digestión se analizó dos veces por CE.

Resultados

20 La comparación del análisis duplicado de la misma muestra (UFH 1/1 con UFH 1/2, UFH 2/1 con UFH 2/2, y UFH 3/2 con UFH 3/2 (sic)) indica que existe una reproducibilidad instrumental satisfactoria. La comparación de UFH 1/1 o UFH 1/2 con UFH 2/1 o UFH 2/2 demuestra que existe una variación mínima de operación a operación. La comparación de UFH digerida con 1 μ l de EC con UFH digerida con 5 μ l de EC ilustra que el aumento de la cantidad de enzima no cambia apreciablemente el perfil de disacáridos. Esto confirma que se consigue una digestión exhaustiva utilizando 1 μ l de EC como se muestra en la Figura 11. El análisis de composición de LMWH realizado por CE de acuerdo con el protocolo reseñado en la Figura 11 y la Tabla 7 puede utilizarse para comparar rigurosamente diferentes lotes de LMWH.

30 TABLA 7

Compuesto	AUC	% Relativo de AUC	Factor de Respuesta (RF)	Concentración relativa corregida	% en Peso
1 ($\Delta U_{2S, H_{NS, 6S}}$)	7294,5	60,7	1	60,7	70,9
2 ($\Delta U_{2S, H_{NS}}$)	1040,8	8,7	0,769	6,7	7,8
3 ($\Delta U_{H_{NS, 6S}}$)	1437,9	12,0	0,714	8,6	10,0
4 ($\Delta U_{2S, H_{NAc, 6S}}$)	379,3	3,2	0,769	2,5	2,9
5 ($\Delta U, H_{NS}$)	685,1	5,7	0,435	2,5	2,9
6 ($\Delta U_{2S, H_{NAc}}$)	502,9	4,2	0,322	1,4	1,6
7 ($\Delta U, H_{NAc, 6S}$)	482,3	4,0	0,455	1,8	2,1
8 ($\Delta U_{H_{NAc, 6S} GH_{NS, 3S, S}}$)	184,7	1,5	1	1,5	1,8

60 La Tabla 7 muestra los valores de Análisis de la Composición para UFH. Se midió el área bajo la curva (AUC) para cada pico del espectro CE de UFH digerida con el cóctel de enzimas como se muestra en la Figura 11. Se utilizó el factor de respuesta calculado para cada sacárido como se muestra en la Tabla 6 para calcular su concentración relativa corregida en el producto de digestión enzimáticamente. La última columna da el porcentaje en peso de cada uno de los bloques de construcción de UFH. Los sacáridos no sulfatados, que constituyen <2% de UFH, no se tienen en cuenta en la construcción de esta tabla de análisis de la composición. Como se demuestra en esta memoria, la construcción de esta tabla de análisis de la composición mostrada por este método, es independiente de la concentración o el peso del producto de digestión de heparina analizado por la CE.

Ejemplo 7

Determinación de la eficiencia de la acción anticoagulante anti-factor Xa de la heparina mediada por AT-III: Correlación entre $I_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$ y la actividad anti-Xa

5

Introducción

La cuantificación del tetrasacárido $\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$ por CAM tiene un papel adicional en la estimación de la eficacia de la acción anticoagulante anti-factor Xa de la heparina mediada por AT-III. $\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$ forma parte del pentasacárido de fijación de AT-III. La cuantificación de $\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$ es una medida de la determinación de la cantidad de pentasacárido de fijación de AT-III presente en la heparina y por tanto ayuda a la medida directa de la anticoagulación mediada por el anti-factor Xa de la heparina que es dependiente del dominio del pentasacárido de fijación de AT-III de la heparina.

15

Métodos

Se fraccionó UFH por tamaños mediante una columna de exclusión de tamaños P10. Se realizó el análisis de la composición sobre las fracciones resultantes para estimar su contenido de $\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$. Estas fracciones se ensayaron también respecto a su actividad anti-factor Xa.

20

Resultados

Una gráfica de actividad anti-factor Xa de diferentes fracciones en función de su $\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$ da como resultado una línea recta con $r = 0,91$, como se muestra en la Figura 11. Esto indica que la acción anticoagulante mediada por el anti-factor Xa de las heparinas puede medirse directamente por su contenido de $\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$. Los datos se presentan también en la Tabla 8.

30

TABLA 8

35

Muestra	1 $\Delta U_{2S,H_{NS,6S}}$	2 $\Delta U_{2S,H_{NS}}$	3 $\Delta U_{H_{NS,6S}}$	4 $\Delta U_{2S,H_{NAC}}$	5 $\Delta U_{H_{NS}}$	6 $\Delta U_{2S,H_{NAC}}$	7 $\Delta U_{H_{NAC,6S}}$	8 $\Delta U_{H_{NAC,6S}GH_{NS,3S,6S}}$
UFH 1/1 1 μ l EC	70,9	7,8	10,0	2,9	2,9	1,6	2,1	1,8
UFH 1/2 1 μ l EC	71,0	7,7	10,2	3,0	2,8	1,5	2,0	1,8
UFH 2/1 1 μ l EC	71,5	7,5	10,1	2,9	2,7	1,5	2,1	1,7
UFH 2/2 1 μ l EC	71,3	7,5	10,3	2,8	2,8	1,5	2,0	1,8
UFH 3/1 5 μ l EC	72,0	7,3	10,0	2,8	2,8	1,6	1,8	1,7
UFH 3/2 5 μ l EC	72,2	7,5	9,9	2,7	2,7	1,6	1,7	1,7

50

La Tabla 8 muestra un análisis de la composición de UFH realizado por CE de acuerdo con el protocolo reseñado en la Figura 11, y la Tabla 7 puede utilizarse para comparar rigurosamente diferentes lotes de LMWH. Se digirió UFH con 1 μ l o 5 μ l de cóctel de enzimas (EC). Cada muestra se digirió por duplicado y cada producto de digestión se analizó por duplicado por CE. En todas las muestras, los picos de los sacáridos 1-8 tenían el mismo tiempo de migración. La comparación de los análisis duplicados de la misma muestra (UFH 1/1 con UFH 1/2, UFH 2/1 con UFH 2/2, y UFH 3/1 con UFH 3/2) demuestra que existe una reproducibilidad instrumental satisfactoria. La comparación de UFH 1/1 o UFH 1/2 con UFH2/1 o UFH 2/2 demuestra que existe una variación mínima de operación a operación. La comparación de UFH digerida con 1 μ l de EC con UFH digerida con 5 μ l de EC ilustra que el aumento de la cantidad de enzima no cambia apreciablemente el perfil de disacáridos, lo que demuestra que se alcanza una digestión exhaustiva utilizando 1 μ l de EC como se representa en la Figura 11.

65

ES 2 324 701 T3

Ejemplo 8

Generación de Fracciones de LMWH y caracterización de la actividad biológica

5 *Métodos*

Se prepararon las fracciones de LMWH MS 57-1 a MS 57-4 y MS 59-1 a MS 59-4 por tratamiento de UFH con 200 μg de heparinasa III (como se ha descrito arriba) y paso del producto resultante a través de una columna P10.

10 Se prepararon las fracciones de LMWH MS 56-1 a MS 56-4 por tratamiento de UFH con 1000 μg de heparinasa III, y paso del producto resultante a través de una columna P10.

Se generaron las fracciones de LMWH MS60-1 a MS60-3, y MS 55-1 a MS 55-4 por tratamiento de la Fracción 2 con 200 μg de heparinasa III, y paso del producto resultante a través de una columna P10.

15 Se prepararon las fracciones de LMWH MS66-1 y MS66-2 por tratamiento de la Fracción 2 con 1000 μg de heparinasa III, y paso del producto resultante a través de una columna P10.

20 La fracción 1 es la heparina de peso molecular alto que se precipita por tratamiento de UFH con acetato de bario a la temperatura ambiente, como se describe en la referencia de Volpi arriba descrita.

25 (Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 9. Generación de Heparina de MW/Carga/Propiedades biológicas Seleccionadas

Método	Muestra	Peso (mg)	MW	PD	Anti-Xa UI/mg	Anti-IIIa UI/mg	Xa/IIa	% Peso 1	% Peso 8	% Peso 2	% Peso 3	% Peso 4	% Peso 5	% Peso 6	% Peso 7
			Medio												
	Fracción 2	300	<8000		400,0	75	5,3	70,0	4,5	7,8	11,1	3,2	2,4	1,4	0
	Fracción 1	150	8000-		105,6	54,5		87,2	0	9,0	1,6	0,4	1,8	0	0
			14,000				2,0								
UFH, 200 µg	MS57-1	130	8743 ± 177	1,1	292,9	72,3	4,0	77,8	3,5	3,0	10,7	1,4	0,3	0,2	3,0
	MS57-2	140	6010 ± 138	1,1	186	33,33	5,6	75,5	3,5	4,0	10,7	1,6	0,5	0,4	3,8
HepIII, P10	MS57-3	60	3000-5000		70,8	0		73,9	2,8	4,9	10,2	1,8	1,2	0,6	5,0
	MS57-4	10	<3000		42,6	0		73,9	1,5	4,4	10,0	1,3	2,0	0,9	0,4
	MS59-1	130	8800		255	29,2	8,7	73,1	4,3	5,8	11,5	2,5	0	0,5	2,4
	MS59-2	130	6500		255	54,5	4,7	77,8	3,8	3,2	10,3	1,3	0,4	0,3	3,4
	MS59-3	70	3000-5000		54	0		75,3	2,3	4,6	10,2	1,9	0,8	0,8	3,8
	MS59-4	30	<3000		15	0		71,3	1,9	5,7	9,4	1,9	1,8	2,0	6,2
UFH, 1000 µg	MS56-1	60	9204 ± 192	1,2	261,4	50	5,2	78,8	4,7	3,3	9,3	1,7	0,2	0,3	2,2
	MS56-2	40	6000 ± 146	1,2	123,8	75	1,7	70,7	3,8	7,0	10,5	2,8	1,2	1,0	2,9
HepIII, P10	MS56-3	100	3000-5 000		126,9	36,4	3,5	76,4	3,0	4,1	11,0	1,5	0,5	0,3	3,6
	MS56-4	80	<3000	31	0	78,7	0	5,0	12,0	2,1	0	0	0		
Fracción 2, 200 µg	MS60-1	110	7224 ± 139	1,2	347,4	58,33	6,0	68,8	5,0	6,0	13,1	2,8	0,4	0,5	3,0
	MS60-2	140	5736 ± 238	1,1	353,6	75	1,5	69,9	3,8	6,2	13,0	2,1	0,8	0,7	3,8
	MS60-3	140	< 5000		51	0		65,9	0	5,7	12,7	2,2	3,7	1,7	8,4
HepIII, P10	MS55-1	140	6505 ± 100	1,1	335	60,0	5,6	68,6	6,5	5,5	13,9	3,3	0,3	0,3	2,1
	MS55-2	130,0	5964 ± 87	1,1	201,2	54,6	3,7	74,4	4,9	3,7	11,3	2,6	0	0	3,5
	MS55-3	50,0	3000-5000		11,6	0		76,1	2,3	4,4	9,8	1,7	0,8	0,6	4,2
Fracción 2, 1000 mg	MS55-4	30	<3000		15,6	0		73,4	0	5,0	9,8	2,0	1,8	1,0	6,5
	MS66-1	150	6470 ± 142	1,2	250,1	100	2,5	75,0	3,6	7,5	8,6	8,6	3,8	1,0	0,3
HepIII, P10	MS66-2	150	5592 ± 159	1,1	206,0	20,8	6,0	74,0	3,6	7,8	9,2	3,4	1,1	1,0	0,2

ES 2 324 701 T3

La fracción 2 es la segunda fracción de un MW inferior que se precipita por mantenimiento de la heparina tratada con acetato de bario a 4°C. Esta es la fracción utilizada de acuerdo con los métodos de la invención.

5 Se midieron los perfiles de absorción subcutánea e *in vivo* de MS 55-2. El perfil de absorción de MS 55-2 se comparó con el de la LMWH disponible comercialmente, Ardeparina, y Enoxaparina. Se ensayó también la actividad anti-Xa de las diversas especies de heparina en cuanto a su actividad biológica *in vitro*.

Resultados

10 La Tabla 9 proporciona el análisis de composición y funcional de las preparaciones de LMWH producidas de acuerdo con la invención y de la fracción de control 1. La Tabla enumera el peso molecular, la actividad *in vitro*, y la composición de las diversas fracciones.

15 MS 55-2 exhibía farmacocinética muy similar a la de Enoxaparina, como resulta evidente en las fases de absorción y eliminación comparables, así como en T_{max} . La biodisponibilidad y las concentraciones de los picos eran comparables entre las tres LMWHs testadas por inyección subcutánea. Cuando se administra por la ruta IV, la actividad inicial anti-Xa es mucho mayor para MS 55-2 en comparación con Ardeparina. De nuevo, la biodisponibilidad entre las dos LMWHs era prácticamente idéntica. Tanto Ardeparina como MS 55-2 exhibían una disminución exponencial en la
20 actividad anti-Xa, y por tanto la eliminación sigue farmacocinética de primer orden.

Se observó que la actividad anti-Xa de MS 55-2 era 205 UI/ng. Ésta es mayor que la de las LMWHs tales como Enoxaparina (135 UI/ng), Ardeparina (93 UI/ng) que están disponibles actualmente en los Estados Unidos. Los
25 resultados se muestran también en la Figura 13.

Se considera que la memoria descriptiva escrita que antecede es suficiente para permitir que un experto en la técnica lleve a la práctica la invención. La presente invención no debe considerarse limitada en alcance por los ejemplos proporcionados, dado que los ejemplos tienen por objeto servir como simple ilustración de un aspecto de la invención y otras realizaciones funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones de
30 la invención, además de las mostradas y descritas en esta memoria, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede, y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 324 701 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis de una muestra que comprende:

- a) aplicar una restricción experimental a un polisacárido contenido en una muestra para producir un polisacárido modificado que tiene un componente de firma,
- b) detectar la presencia del componente de firma en la muestra como indicación de que el polisacárido está presente en la muestra, y
- c) determinar la presencia o ausencia del componente de firma para analizar la muestra;

en donde el componente de firma se selecciona de $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;

$\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$; $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GMan_{3S,6S}$; $I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GMan_{3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}$; $IH_{NAc,6S}GMan_{3S,6S}$;
 $H_{NAc,6S}GMan_{3S,6S}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$;
 $\Delta UH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS}$; $\Delta UH_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$; ΔUH_{NS} ; $\Delta U_{2S}H_{NAc}$; $\Delta UH_{NAc,6S}$ o $\Delta UH_{NS,3S,GS}$.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el componente de firma tiene una actividad biológica conocida.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el componente de firma es biológicamente inactivo.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la restricción experimental aplicada a la muestra es electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de permeación de gel, o resonancia magnética nuclear.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra es un lote de polisacárido y el componente de firma se utiliza para monitorizar la pureza del lote por determinación de la cantidad de componente de firma en el lote.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método de análisis es un método para monitorizar la presencia de componentes activos en la muestra, en donde la presencia del componente de firma en la muestra es indicativa de un componente activo en la muestra.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el método del análisis es un método para monitorizar la presencia de componentes activos en la muestra, en donde la presencia del componente de firma en la muestra es indicativa de una muestra que carece de una actividad específica.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método de análisis es un método para determinar la cantidad de componentes activos en la muestra por determinación de la cantidad de componente de firma en la muestra.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método se lleva a cabo sobre al menos dos muestras y en donde se determinan las cantidades relativas de componente de firma en cada una de las al menos dos muestras, en donde el nivel máximo relativo de componente de firma es indicativo de la muestra más activa.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente el uso del componente de firma para identificar moléculas biológicamente activas.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el componente de firma se utiliza para cribar una genoteca.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el componente de firma es una porción biológicamente activa de un polisacárido.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la porción biológicamente activa de polisacárido es un tetrasacárido del dominio de fijación de AT-III de la heparina o un tetrasacárido del dominio de fijación de FGF de la heparina.

ES 2 324 701 T3

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la restricción experimental aplicada a la muestra es digestión con una exoenzima, digestión con una endoenzima, digestión química, modificación química, o modificación con una enzima.

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polisacárido contenido en la muestra se compara con una base de datos de referencia de polisacáridos de tamaño idéntico que el polisacárido, en donde los polisacáridos de la base de datos de referencia se han sometido también a las mismas restricciones experimentales que el polisacárido contenido en la muestra, en donde la comparación proporciona un análisis de composición del polisacárido de la muestra.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra es un producto farmacéutico, una muestra biológica, o una muestra de sangre.

17. Un método para evaluar la calidad de una muestra de polisacárido que comprende los pasos de:

identificar un componente en la muestra de polisacárido, y

determinar un valor cuantitativo de la cantidad de componente, en donde el valor cuantitativo del componente es indicativo de la calidad de la muestra de polisacárido;

y en donde el componente se selecciona de $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$;

$\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta UH_{NAc,6S}GH_{NS,3S}$; $\Delta UH_{NS,6S}GH_{NS,3S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GMan_{3S,6S}$; $I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $I_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GMan_{3S,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $I_{2S}H_{NS,6S}IH_{NAc,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}IH_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}I_{2S}Man_{6S}$; $I_{2S}H_{NS,6S}GMan_{3S,6S}$;
 $H_{NAc,6S}GMan_{3S,6S}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$;
 $\Delta UH_{NS,6S}I_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,6S}$; $H_{NS,6S}GH_{NS,3S,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S,OMe}$; $\Delta U_{2S}H_{NS,6S}$;
 $\Delta U_{2S}H_{NS}$; $\Delta UH_{NS,6S}$; $\Delta U_{2S}H_{NAc,6S}$; ΔUH_{NS} ; $\Delta U_{2S}H_{NAc}$; $\Delta UH_{NAc,6S}$ o $\Delta UH_{NS,3S,6S}$.

18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el método implica identificar al menos dos componentes en la muestra de polisacárido y determinar un valor cuantitativo de la cantidad de cada uno de los al menos dos componentes para evaluar la calidad de la muestra de polisacárido.

19. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el valor cuantitativo se calcula como el área bajo la curva cuando la muestra se procesa por electroforesis capilar.

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el valor cuantitativo se calcula como el factor de respuesta.

21. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el valor cuantitativo se calcula como la cantidad porcentual relativa de cada fracción presente en la muestra.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el paso de calcular la cantidad porcentual relativa de cada fracción presente en la muestra se determina de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$PRA = RF \times AUC_{\%}R$$

en donde

PRA = cantidad relativa en porcentaje de cada fracción

RF = factor de respuesta

$AUC_{\%}R$ = AUC relativa en porcentaje $[(100 \times AUC_C)/AUC_T]$

AUC_C = área bajo la curva para un componente

AUC_T = la suma del área bajo la curva para todos los componentes.

23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el cálculo se realiza por ordenador y se utiliza para generar una estructura de datos, materializada tangiblemente en un medio legible por ordenador, que representa un valor cuantitativo de un componente de un polisacárido.

ES 2 324 701 T3

24. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 17, en donde el polisacárido es un glucosaminoglucano, una heparina de peso molecular bajo, heparina, sulfato de heparano, una heparina preparada biotecnológicamente, una heparina modificada químicamente, o una heparina sintética.

5 25. Un método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el polisacárido es un glucosaminoglucano afín a la heparina.

10 26. Un método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el polisacárido es una heparina de peso molecular bajo.

10 27. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 17, en donde el componente de firma es uno de los picos que corresponden a uno cualquiera de $\Delta\text{UH}_{\text{NAc},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S},6\text{S}}$; $\Delta\text{UH}_{\text{NAc},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$; o $\Delta\text{UH}_{\text{NS},6\text{S}}\text{GH}_{\text{NS},3\text{S}}$.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

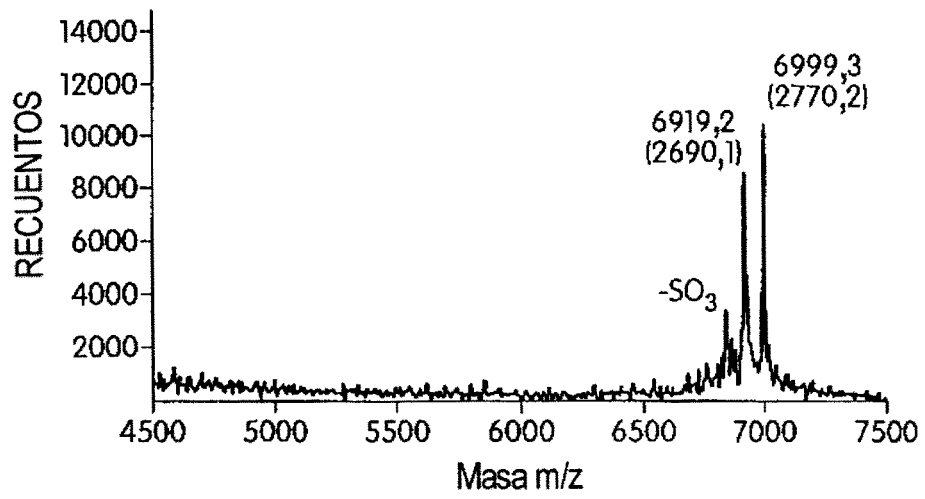


Fig. 1

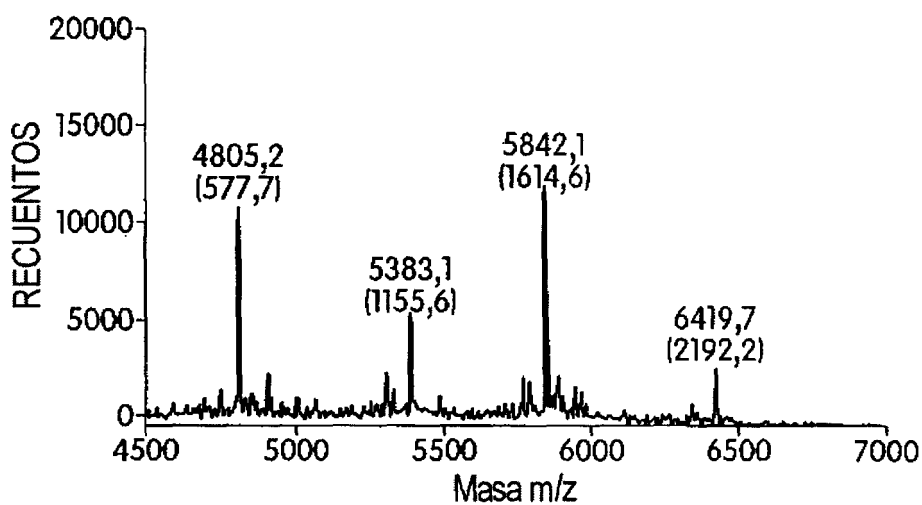


Fig. 2A

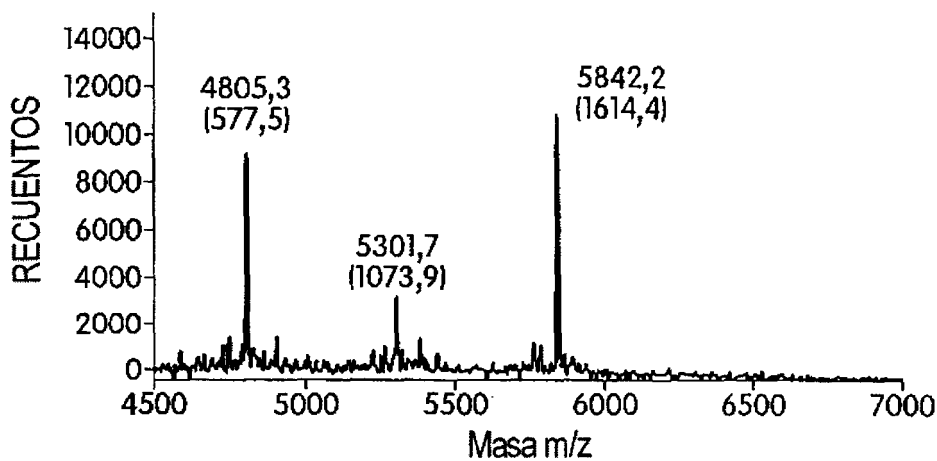


Fig. 2B

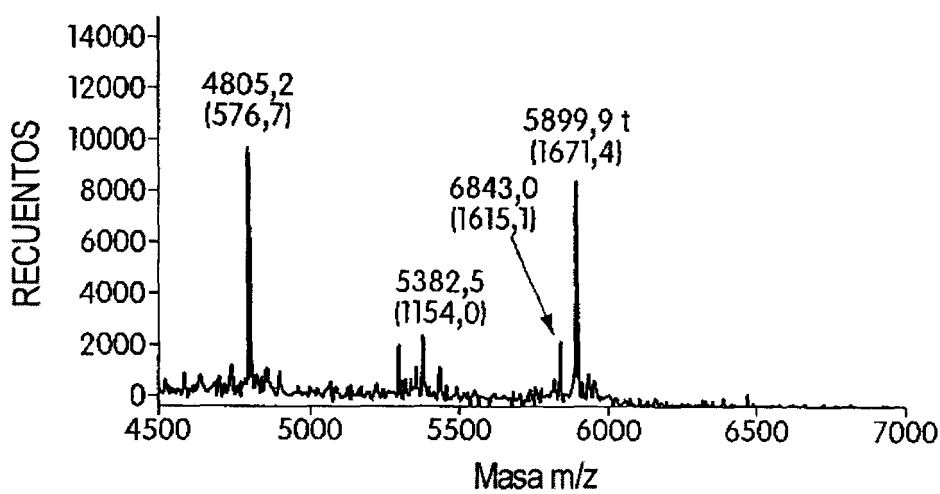


Fig. 2C

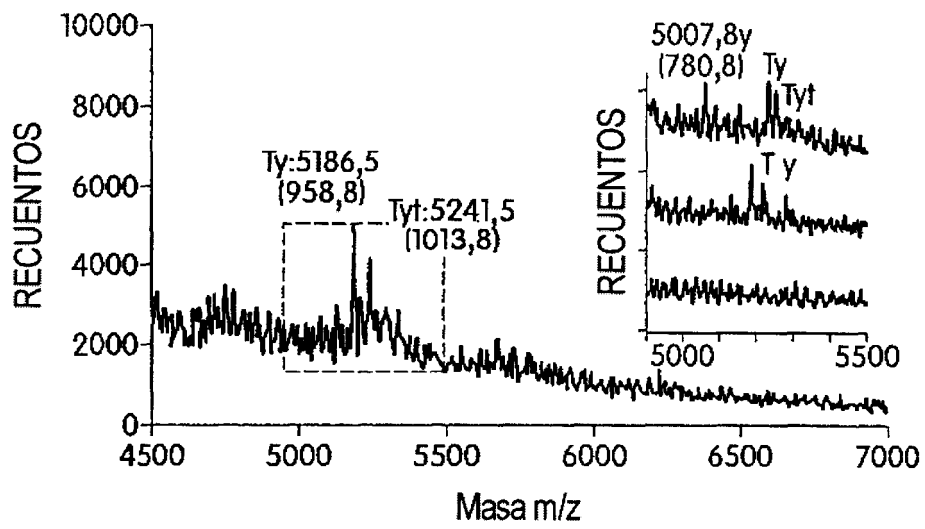


Fig. 3

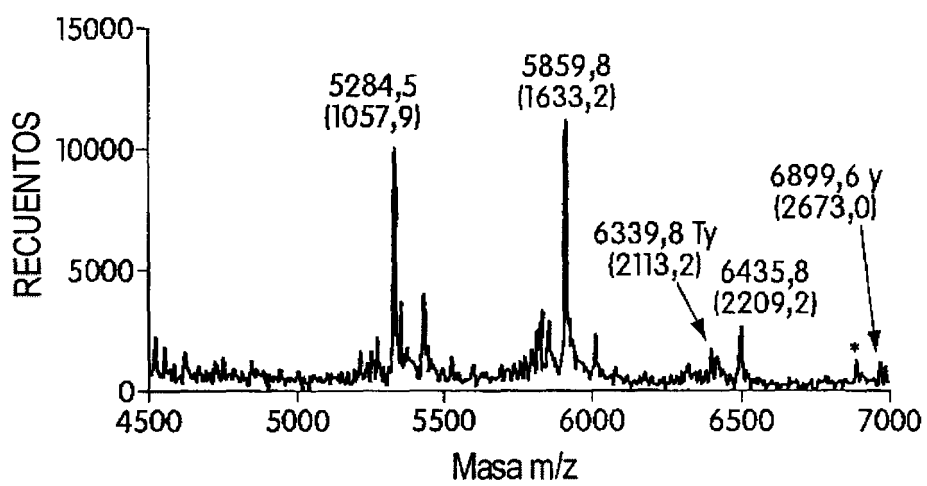


Fig. 4

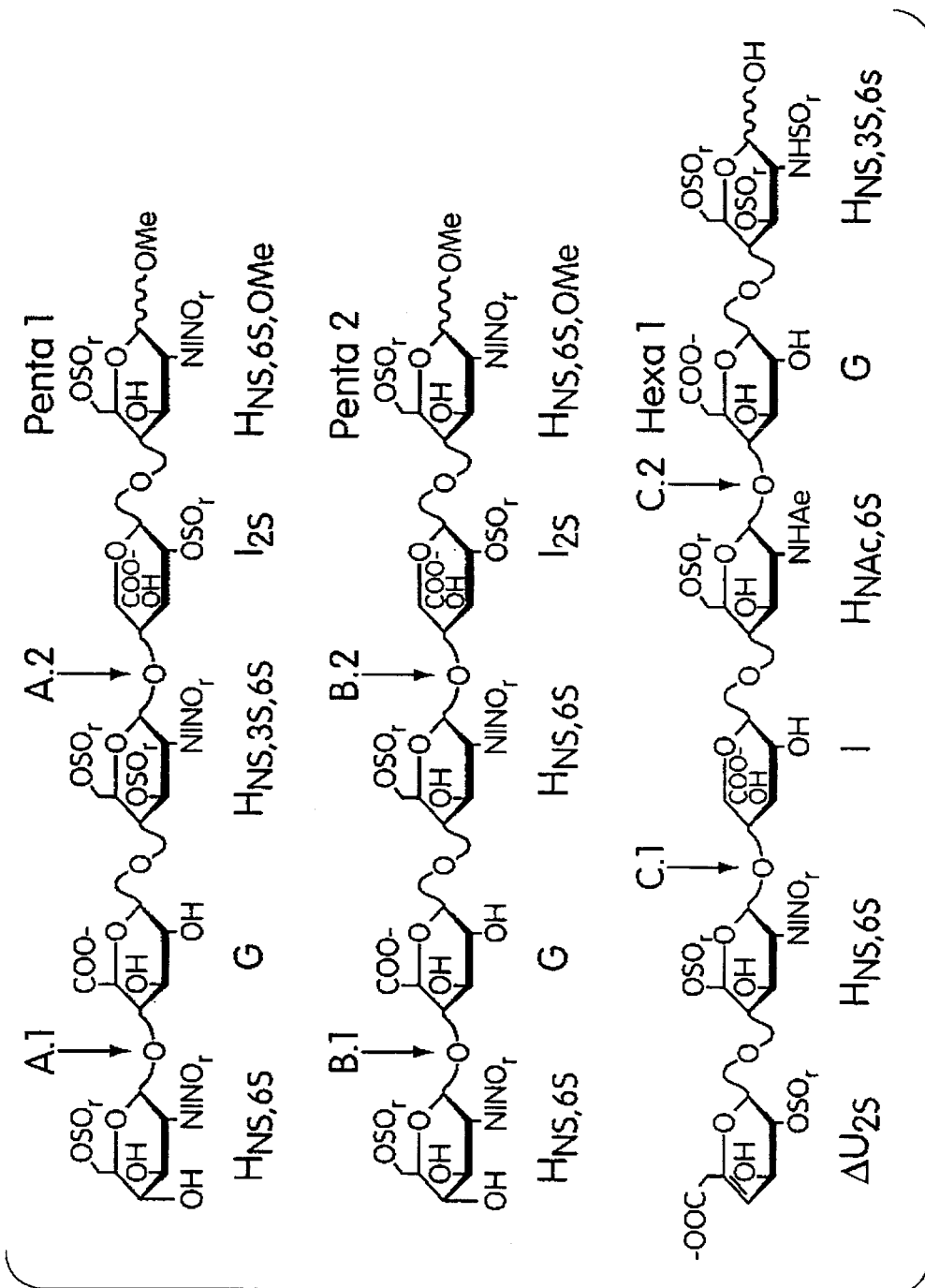


Fig. 5

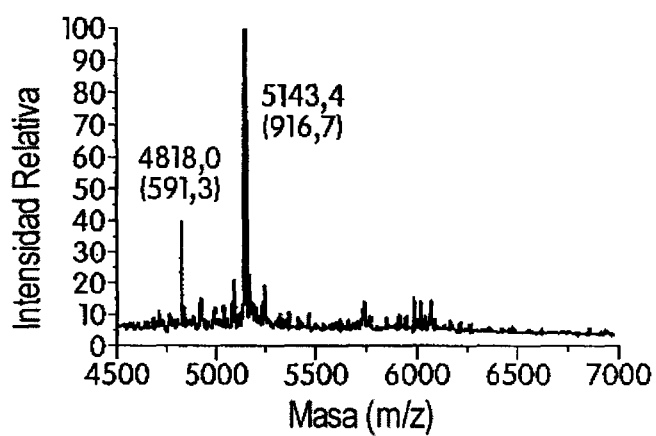


Fig. 6A

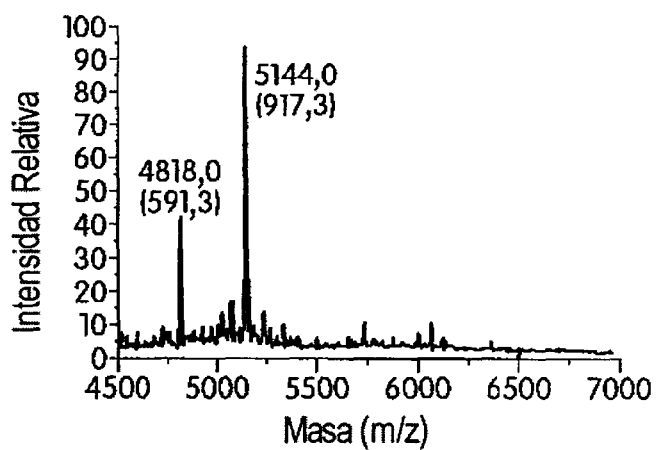


Fig. 6B

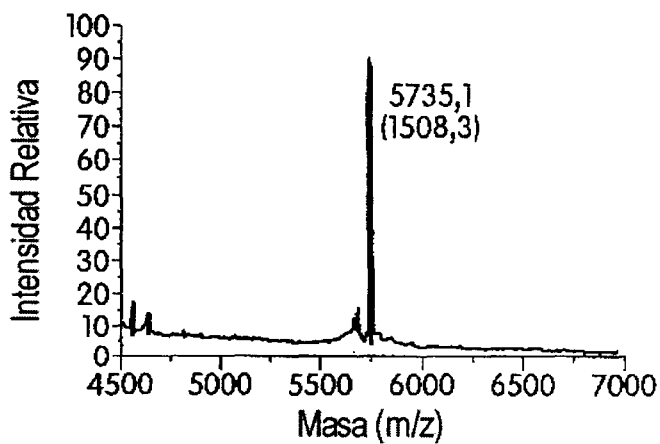


Fig. 6C

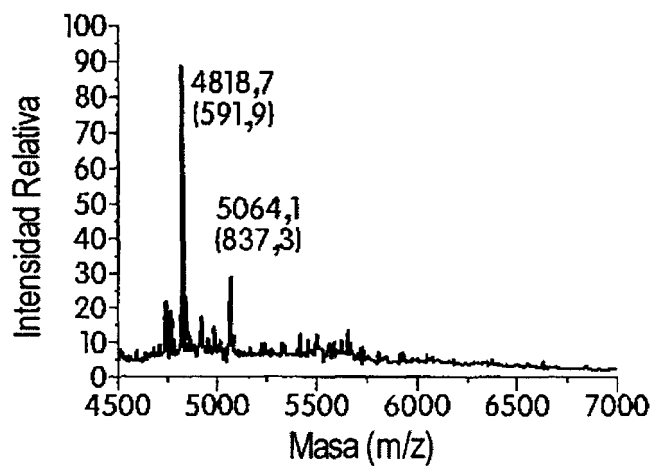


Fig. 7A

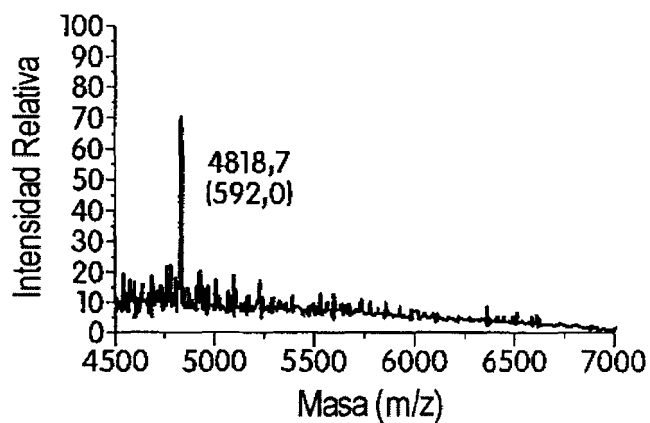


Fig. 7B

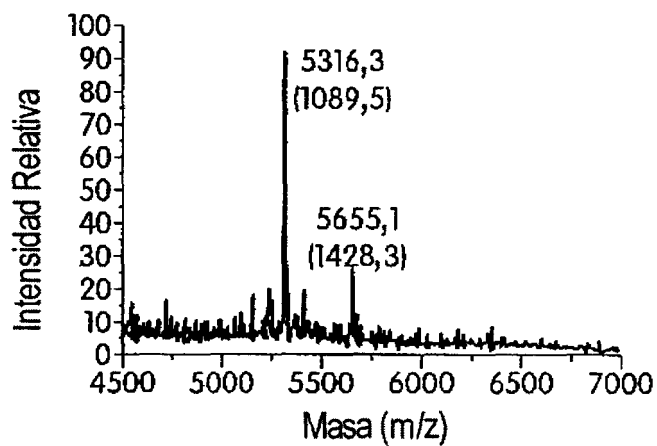


Fig. 7C

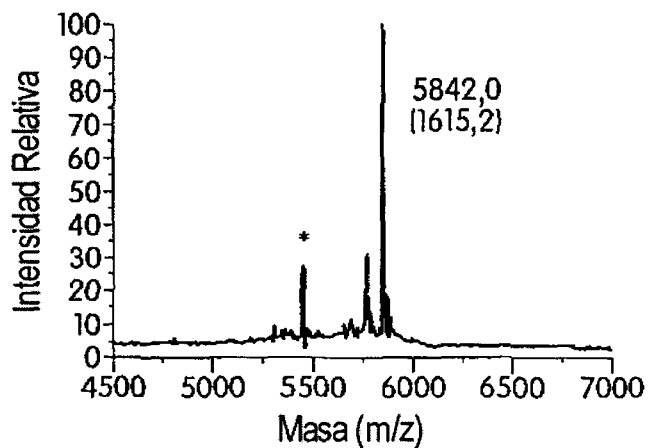


Fig. 8A

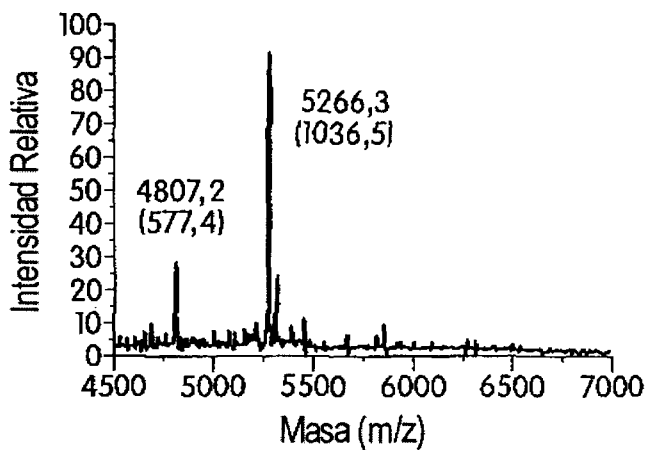


Fig. 8B

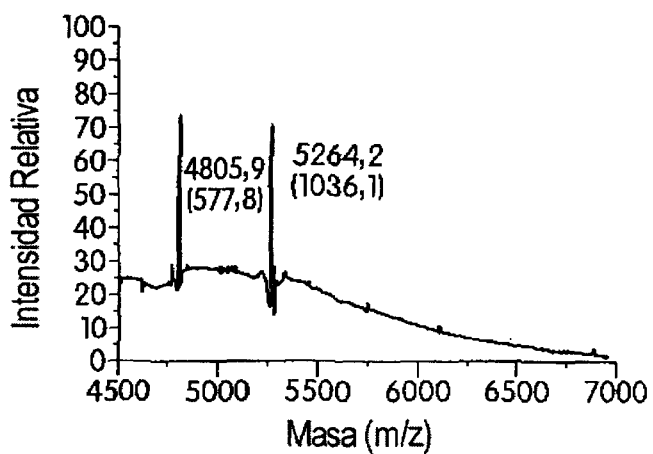


Fig. 8C

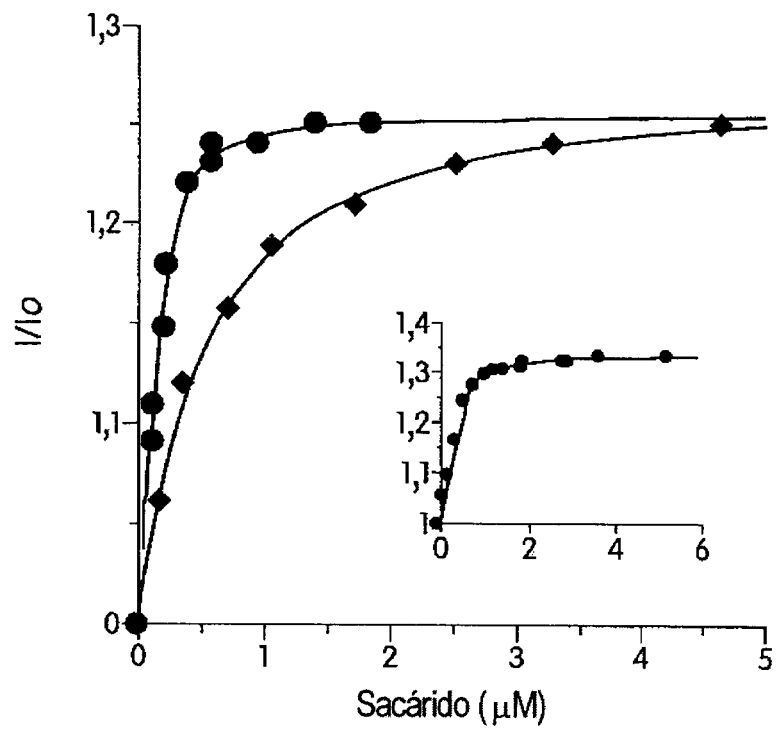


Fig. 9

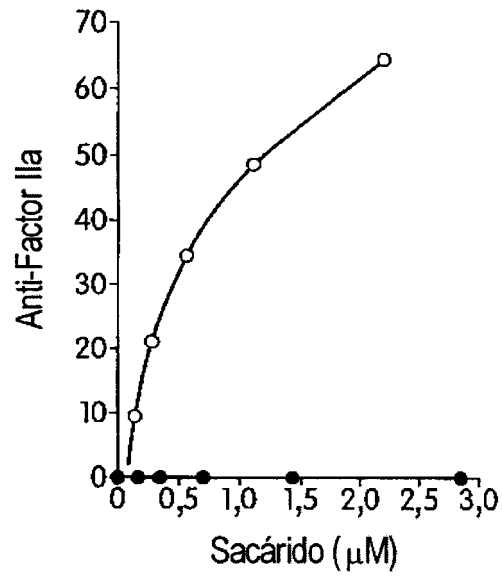


Fig. 10A

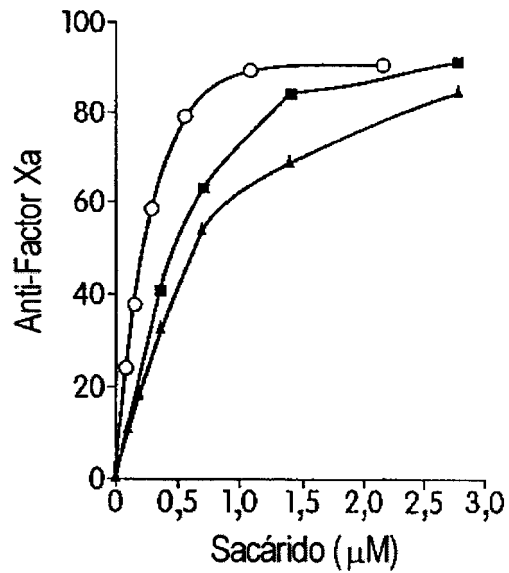


Fig. 10B

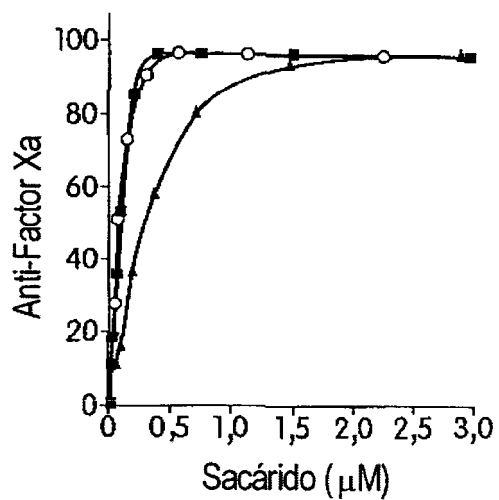


Fig. 10C

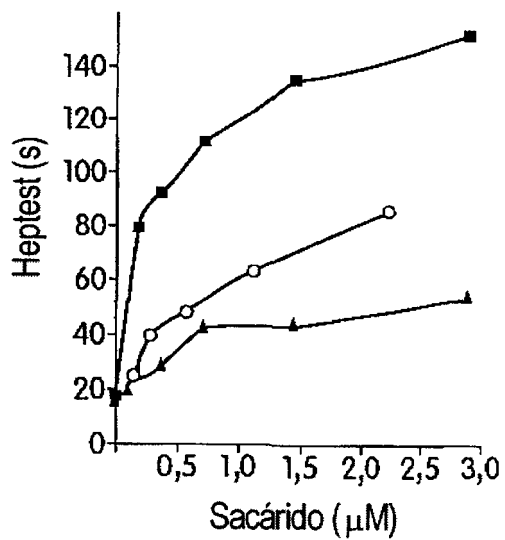


Fig. 10D

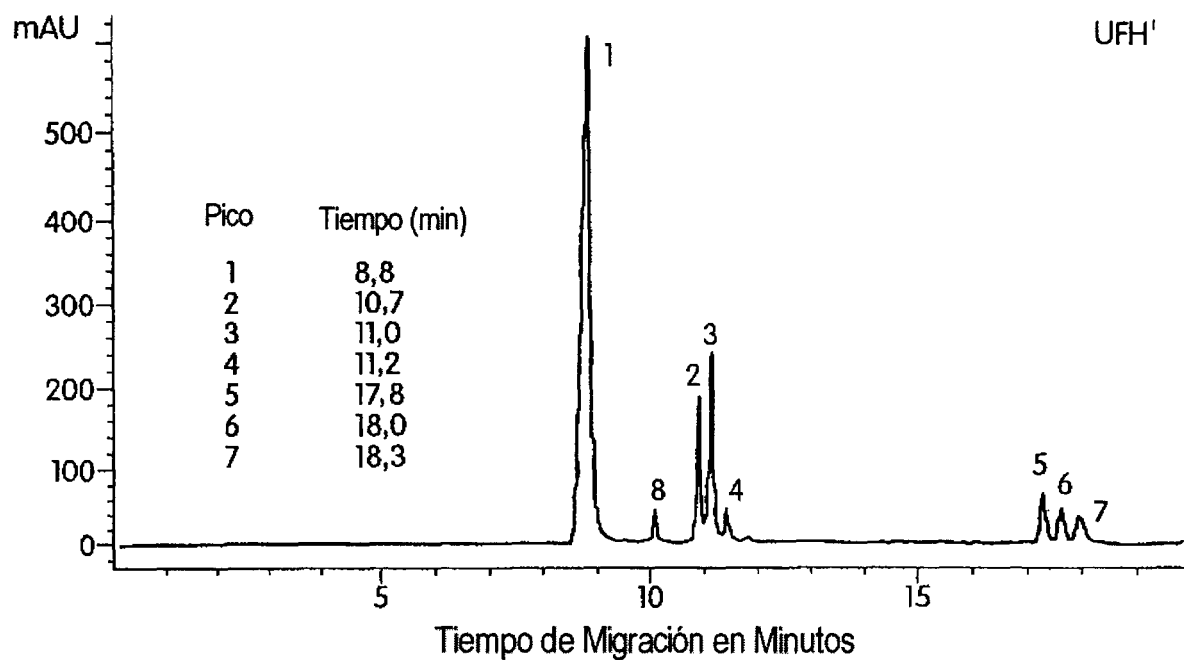


Fig. 11A

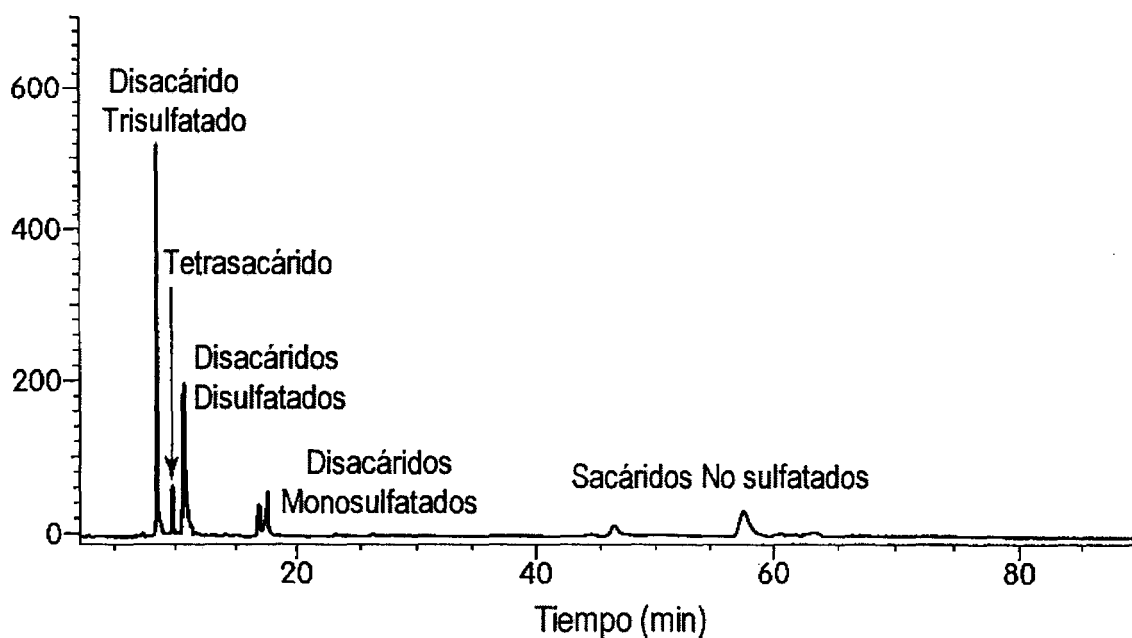


Fig. 11B

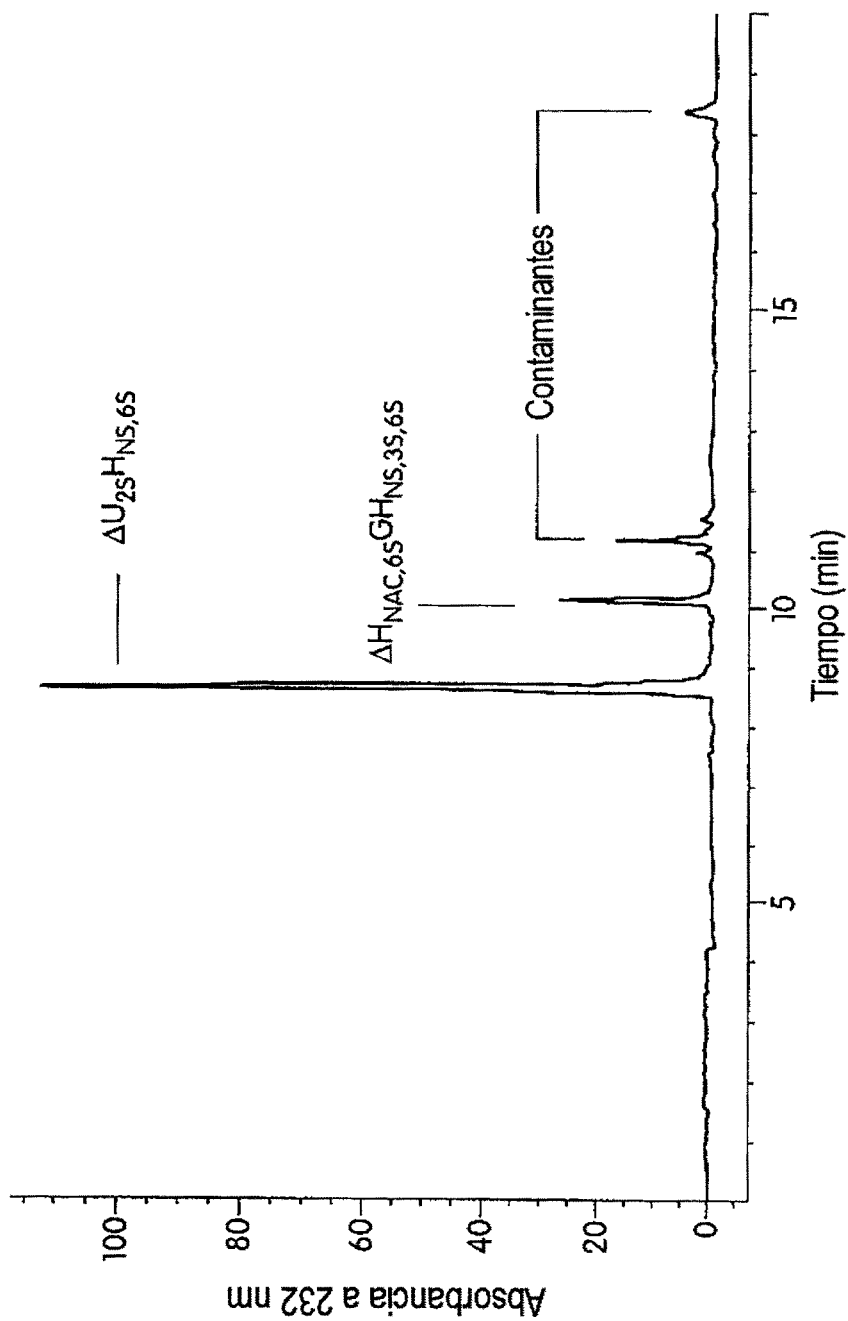


Fig. 12

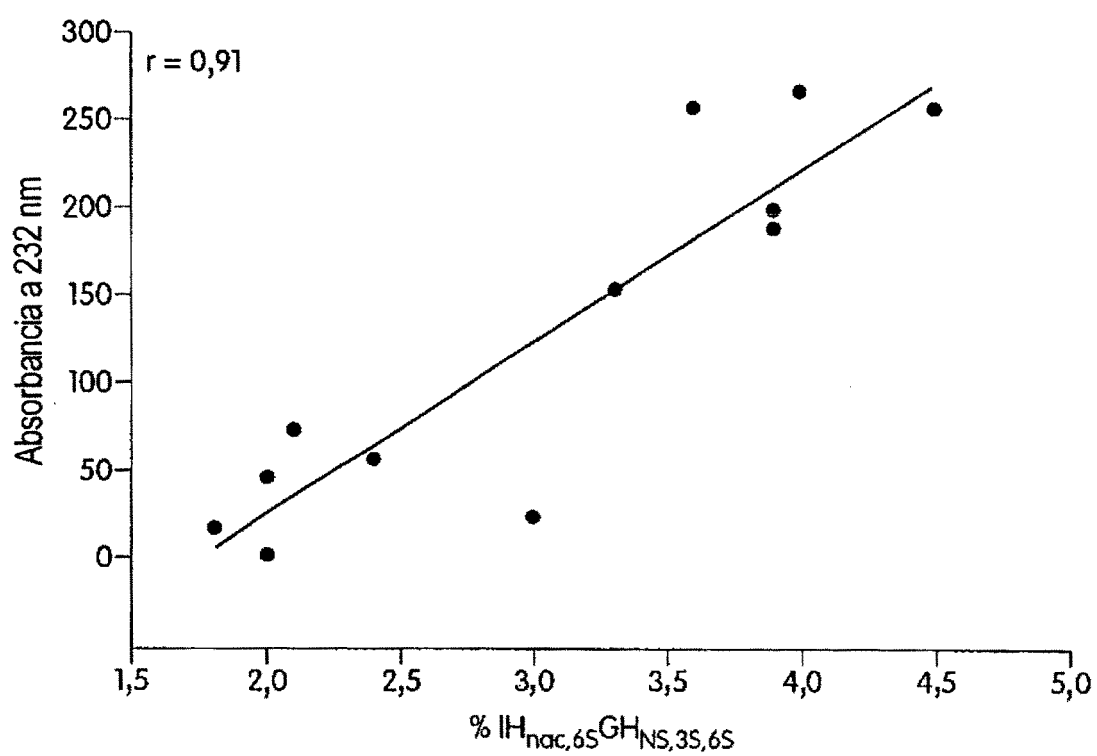


Fig. 13