

TAFOXIPARINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA PREECLAMPSIA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el uso de la tafoxiparina derivada de heparina en el tratamiento de la preeclampsia (PE). El tratamiento puede ser monoterapia o terapia de combinación, donde la tafoxiparina se puede utilizar en combinación con un agente (fármaco) utilizado como terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La preeclampsia es una enfermedad vascular específica del embarazo caracterizada por la hipertensión materna *de novo* y el daño orgánico. Anualmente afecta al menos a 8.5 millones de mujeres en todo el mundo y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal (Steegers, E.A., et al., *Pre-eclampsia. Lancet, 2010. 376 (9741): págs. 631-644*). La preeclampsia (PE) se refiere a menudo como el representante emblemático de las “enfermedades de placentas isquémicas” o “complicaciones vasculares de placentas” y es una causa importante de morbilidad y mortalidad materna y perinatal. La PE es dos veces más común en madres primerizas que en mujeres que ya han dado a luz. La morbilidad materna incluye hipertensión grave sin o con convulsiones (eclampsia), accidentes cerebrovasculares, desprendimiento de placenta, edema pulmonar, disfunciones hepáticas y renales. Los riesgos fetales incluyen la restricción del crecimiento en casi el 25% de los casos, parto prematuro y muerte, ya sea en el útero o como resultado de la prematuridad (casi 2 de cada 100 casos) (Jean-Christophe Gris et al. *Addition of enoxaparin to aspirin for the secondary prevention of placental vascular complications in women with severe pre-eclampsia. Thrombosis and Haemostasis 106.6(2011).*

Las manifestaciones agudas de la PE se resuelven después del parto, pero dejan a las mujeres con daño vascular permanente (Melchiorre, K., et al., *Preeclampsia is associated with persistent postpartum cardiovascular impairment. Hypertension, 2011. 58(4): págs. 709-715*).

La preeclampsia se asocia con un mayor riesgo de hipertensión crónica futura, enfermedad cardiovascular (CVD), enfermedad cerebrovascular y muerte (Bellamy, L., et al., *Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. BMJ, 2007. 335(7627): pág. 974*). El riesgo de morir por la enfermedad cardíaca isquémica después de la preeclampsia se ha estimado a 2.5 veces mayor que el de las mujeres sin preeclampsia (Bellamy, L., et al., *Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. BMJ, 2007. 335(7627): pág. 974*). Además, diversos estudios epidemiológicos han sugerido que la descendencia de las madres con preeclampsia e hipertensión gestacional también tienen un mayor riesgo de hipertensión a largo plazo y CVD (Geelhoed, J.J., et al., *Preeclampsia and gestational hypertension are associated with childhood blood pressure independently of family adiposity measures: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. Circulation, 2010. 122(12): págs. 1192-1199*). Se desconoce el mecanismo exacto por el cual la preeclampsia y otros trastornos hipertensivos del embarazo confieren riesgos cardiovasculares a largo plazo. Se ha encontrado que la disfunción endotelial materna persiste durante al menos un año después del parto (Chen, C.W., I.Z. Jaffe, and S.A. Karumanchi, *Pre-eclampsia and cardiovascular disease. Cardiovasc Res, 2014. 101(4): págs. 579-586*).

Las opciones de tratamiento disponibles de la preeclampsia son sintomáticas, al proporcionar fármacos antihipertensivos, complementados con infusión de magnesio en casos severos. La práctica clínica actual es para proporcionar una dosis baja de ácido acetilsalicílico (ASA) como profilaxis en sujetos de alto riesgo. El objetivo más importante del tratamiento es evitar los partos prematuros.

5 Se han investigado diversas LMWHs (heparinas de bajo peso molecular), tal como, dalteparina y enoxaparina, como una terapia en la preeclampsia. Sin embargo, debido a problemas de seguridad en relación con la actividad anticoagulante, así como a resultados inconsistentes con respecto a la eficacia, hasta la fecha no han demostrado su utilidad en la práctica clínica de la terapia de preeclampsia.

La WO 2003/055499 describe el uso de ciertos glicosaminoglicanos sulfatados para la prevención y
10 tratamiento de progreso lento del término del trabajo de parto. La WO 2013/147689 describe el uso de una heparina modificada químicamente o heparán sulfato en la inducción del trabajo de parto. La WO 2013/147690 describe el uso de una heparina modificada químicamente o heparán sulfato en la detención del trabajo de parto. La WO 2013/169194 describe el uso de una heparina modificada químicamente o heparán sulfato en el tratamiento de la hemorragia posparto (PPH). La WO 2013/095279
15 describe un glicosaminoglicano modificado químicamente novedoso y se describe como útil para la prevención y el tratamiento del trabajo de parto prolongado (distocia), pérdida de proteínas tal como el síndrome de Gorham Stout, sepsis y enteropatía con pérdida de proteínas. La WO2014/202982 describe un proceso de fabricación novedoso para la preparación de un glicosaminoglicano modificado químicamente.

La preeclampsia (PE) se asocia con una serie de complicaciones perinatales y neonatales a corto y
20 largo plazo, es decir, complicaciones para el bebé, incluyendo la muerte. Las complicaciones a corto plazo pueden ser restricción del crecimiento fetal (FGR), oligohidramnios, muerte fetal intrauterina (IUFD), nacimiento prematuro, puntaje de Apgar bajo, FHR no confiable durante el trabajo de parto o necesidad de admisión en la NICU. Las complicaciones a largo plazo pueden ser parálisis cerebral, IQ bajo, pérdida de audición, discapacidad visual, resistencia a la insulina, diabetes mellitus, enfermedad de las arterias
25 coronarias o hipertensión (*Poon L.C. et al: The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention; Int J Gynecol Obstet* 2019; 145 (Suppl. 1): 1–33DOI: 10.1002/ijgo.12802).

Un problema con el uso de LMWHs en la terapia de preeclampsia es el factor de limitación de la dosis y las cuestiones de seguridad. Una mujer con preeclampsia (PE) que se necesita someter a una
30 cesárea aguda no puede recibir heparina de bajo peso molecular debido al riesgo de sangrado, y la anestesia general sigue siendo un factor de riesgo para estas mujeres.

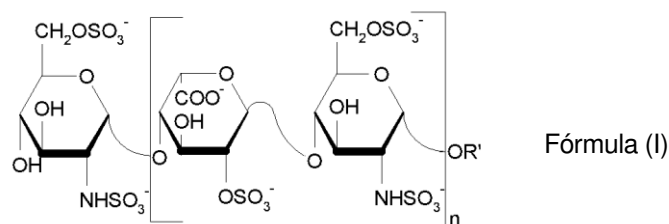
Actualmente no existen fármacos terapéuticos ni profilácticos disponibles para la preeclampsia (PE) y, por lo tanto, para las consecuencias a corto y largo plazo en la PE. En consecuencia, existe una gran necesidad médica de opciones de tratamiento profiláctico y terapéutico (de intervención) nuevas, seguras y
35 efectivas para la preeclampsia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

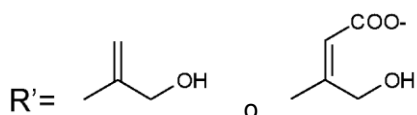
Un objetivo de la presente invención es encontrar una nueva terapia para la preeclampsia (PE). Más particularmente, un objetivo de la invención es el uso de la tafoxiparina derivada de heparina para el tratamiento profiláctico, así como terapéutico (de intervención) de la preeclampsia (PE).

Un aspecto de la presente invención es la tafoxiparina derivada de heparina:

- (i) que tiene una actividad antifactor IIa de menos de 10 UI/mg;
- (ii) que tiene una actividad antifactor Xa de menos de 10 UI/mg;
- (iii) que tiene un peso molecular promedio en peso (Mw) de 4.6 a 6.9 kDa; y
- (iv) que tiene un sacárido que se encuentra predominantemente de (Fórmula I):



en donde



n es un número entero de 2 a 20, de modo que las cadenas de polisacárido tienen de 2 a 20 unidades de disacárido correspondientes a pesos moleculares entre 1.2 y 12 kDa;

(v) en donde las cadenas de polisacáridos están esencialmente libres de ácidos idurónicos y/o glucurónicos no sulfatados químicamente intactos de las secuencias de pentasacáridos que median el efecto anticoagulante; y

(vi) en donde los glicosaminoglicanos modificados químicamente tienen una distribución de polisacáridos y su correspondiente peso molecular expresado como % acumulativo del peso de acuerdo con la tabla:

Masa molecular [kDa]	Peso acumulativo [%]
>10	4-15
>8	10-25
>6	22-45
>3	>70

para uso en el tratamiento de la preeclampsia.

En un aspecto de la invención, las cadenas de polisacárido que se encuentran predominantemente en la tafoxiparina derivada de heparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención tienen entre 6 y 12 unidades de disacárido con pesos moleculares de 3.6-7.2 kDa.

En un aspecto de la invención, la tafoxiparina derivada de heparina como se describe en la presente produce señales a 5.95 ppm y 6.15 ppm en un espectro de ¹H-NMR.

En un aspecto de la invención, la tafoxiparina derivada de heparina como se utiliza de acuerdo con la invención comprende glucosaminas insaturadas en el extremo no reductor presentadas como señales en el intervalo de 5.0 a 6.5 ppm en un espectro de ¹H-NMR con una intensidad (proporción %) de menos del 4% en relación con la señal a 5.42 ppm de heparina natural.

Un aspecto de la invención es la tafoxiparina derivada de heparina como se describe en la presente, para utilizarse en terapia de combinación con una terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

Los ejemplos de agentes (fármacos) que pueden ser útiles como agentes para cuidado estándar (fármacos) en la terapia de combinación de acuerdo con la presente invención, son ácido acetilsalicílico (ASA), agentes antihipertensivos, corticosteroides o un agente de magnesio tal como sulfato de magnesio.

Los ejemplos de agentes antihipertensivos que pueden ser útiles como agentes para cuidado estándar (fármacos) en terapia de combinación de acuerdo con la presente invención son diuréticos, bloqueadores de canales de calcio, antagonistas de receptores adrenérgicos, inhibidores de renina, o bloqueadores de receptores del endotelio. Los ejemplos de diuréticos que pueden ser útiles como agentes antihipertensivos en una terapia de combinación de acuerdo con la presente invención son diuréticos de asa tales como, bumetanida, ácido etacrínico, furosemida o torsemida; diuréticos de tiazida tales como epitizida, hidroclorotiazida, clorotiazida, bendroflumetiazida, metilclotiazida o politiazida; diuréticos de tipo tiazídico tales como, indapamida, clortalidona, metalozono, xipamida o clopamida; diuréticos ahorradores de potasio tales como amilorida, triamtereno, espironolactona o eplerenona.

Los ejemplos de bloqueadores del canal de calcio que pueden ser útiles como agentes antihipertensivos en una terapia de combinación de acuerdo con la presente invención son amlodipina, cilnidipina, clevidipina, felodipina, isradipina, lercanidipina, levamlodipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, diltiazem, o verapamilo.

Los ejemplos de inhibidores de la ACE (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) que pueden ser útiles como un agente antihipertensivo en una terapia de combinación de acuerdo con la presente invención son captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perindopril, quinapril, ramipril, trandolapril y benazepril.

Los ejemplos de antagonistas del receptor angiotensina II que pueden ser útiles como agentes antihipertensivos en una terapia de combinación de acuerdo con la presente invención son azilsartán, candesartán, candesartán cilexetilo, eprosartán, irbesartán, losartán, olmesartán, telmisartán, valsartán o fimasartán.

Los ejemplos de antagonistas del receptor adrenérgico que pueden ser útiles como agentes antihipertensivos en una terapia de combinación de acuerdo con la presente invención son bloqueadores beta, tales como acebutolol, atenolol, bisoprolol, betaxolol, carteolol, carvedilol, labetalol, metoprolol, nadolol, nebivolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propranolol o timolol; y bloqueadores alfa, tales como doxazosina, fentolamina, indoramina, fenoxibenzamina, prazosina, terazosina o tolazolina.

Otros ejemplos adicionales de agentes que pueden ser útiles como agentes antihipertensivos en una terapia de combinación de acuerdo con la presente invención son los inhibidores de renina tales como aliskiren o bloqueadores del receptor de endotelio tales como bosentán.

Un aspecto de la presente invención es la tafoxiparina derivada de heparina para utilizarse en el tratamiento de la preeclampsia (PE).

Un aspecto de la invención es la tafoxiparina derivada de heparina para utilizarse como tratamiento profiláctico de la preeclampsia (PE).

Un aspecto de la invención es la tafoxiparina derivada de heparina para utilizarse en el tratamiento

terapéutico (de intervención) de la preeclampsia (PE).

Un aspecto de la invención es la tafoxiparina derivada de heparina para utilizarse como monoterapia en el tratamiento de la preeclampsia (PE).

Un aspecto de la invención es la tafoxiparina derivada de heparina para utilizarse en combinación con una terapia para cuidado estándar (SOC) de la preeclampsia (PE).

Un aspecto de la presente invención es la tafoxiparina derivada de heparina para utilizarse como se describe en la presente, en donde dicha tafoxiparina se administra como terapia complementaria a un sujeto que ya está recibiendo una terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

Un aspecto de la invención es la tafoxiparina derivada de heparina para utilizarse como se describe en la presente, en donde dicha tafoxiparina se administra antes de administrar una terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

Un aspecto de la invención es la tafoxiparina derivada de heparina para utilizarse como se describe en la presente, en donde dicha tafoxiparina se administra simultáneamente con la administración de una terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente se inicia a una mujer embarazada con riesgo de desarrollar preeclampsia (PE).

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente se inicia en el momento en que se diagnostica a una mujer embarazada que tiene preeclampsia.

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente se inicia con una prueba de embarazo positiva en una mujer.

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente se inicia con una mujer que ha sido diagnosticada como que padece el síndrome HELLP.

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente se inicia con una mujer que está siendo diagnosticada que padece de eclampsia.

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente se inicia con una mujer que es obesa.

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente se inicia con una mujer que ha sido diagnosticada como prediabética.

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente se inicia con una mujer que ha sido diagnosticada como diabética.

En un aspecto de la invención, una terapia de preeclampsia (PE) como se describe en la presente finaliza en el momento del parto.

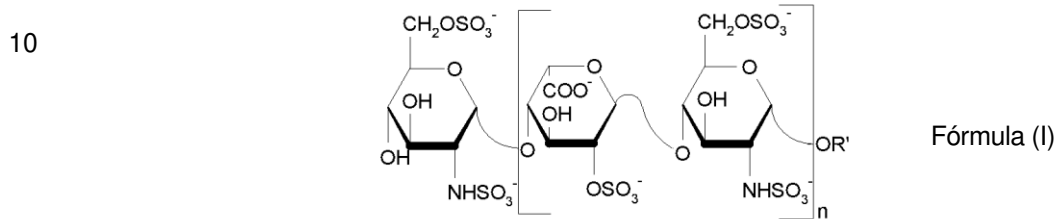
Un aspecto de la presente invención es la terapia posparto de preeclampsia (PE) (terapia después del parto del bebé). Dicha terapia se puede iniciar en cualquier momento después del parto con una duración de dicha terapia de hasta una semana, hasta dos semanas, hasta tres semanas, hasta cuatro semanas, hasta cinco semanas, hasta seis semanas, hasta siete semanas, hasta ocho semanas, hasta nueve semanas, hasta diez semanas, o con una duración de dicha terapia posparto de preeclampsia (PE) como lo determinado por el médico responsable de dicha mujer.

Un aspecto de la invención es la tafoxiparina derivada de heparina que se utiliza para mejorar el

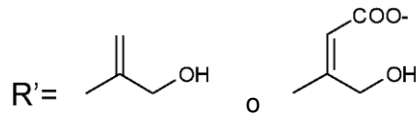
intercambio de circulación de placenta con circulación materna (arterias espirales) en una mujer diagnosticada con preeclampsia (PE), o en una mujer que está en riesgo de desarrollar preeclampsia (PE).

Un aspecto de la invención es un método para el tratamiento de la preeclampsia (PE), mediante el cual una cantidad terapéuticamente efectiva de la tafoxiparina derivada de heparina:

- (i) que tiene una actividad antifactor IIa de menos de 10 UI/mg;
- (ii) que tiene una actividad antifactor Xa de menos de 10 UI/mg;
- (iii) que tiene un peso molecular promedio en peso (Mw) de 4.6 a 6.9 kDa; y
- (iv) que tiene un sacárido que se encuentra predominantemente de (Fórmula I):



en donde



n es un número entero de 2 a 20, de modo que las cadenas de polisacárido tienen de 2 a 20 unidades de disacárido correspondientes a pesos moleculares entre 1.2 y 12 kDa;

(v) en donde las cadenas de polisacáridos están esencialmente libres de ácidos idurónicos y/o glucurónicos no sulfatados químicamente intactos de las secuencias de pentasacáridos que median el efecto anticoagulante; y

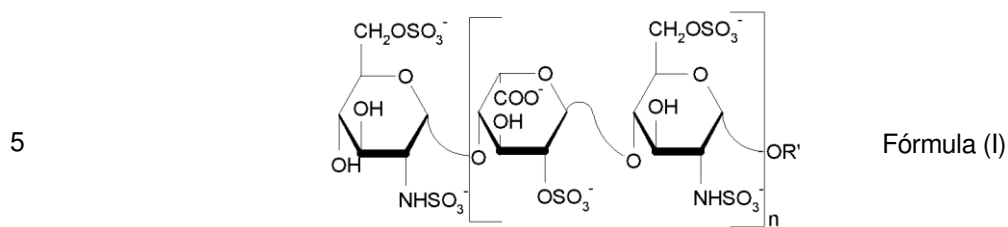
(vi) en donde los glicosaminoglicanos modificados químicamente tienen una distribución de polisacáridos y su correspondiente peso molecular expresado como % acumulativo del peso de acuerdo con la tabla:

Masa molecular [kDa]	Peso acumulativo [%]
>10	4-15
>8	10-25
>6	22-45
>3	>70

se administra a una mujer que necesita dicho tratamiento.

Un aspecto de la invención es el uso de la tafoxiparina derivada de heparina:

- (i) que tiene una actividad antifactor IIa de menos de 10 UI/mg;
- (ii) que tiene una actividad antifactor Xa de menos de 10 UI/mg;
- (iii) que tiene un peso molecular promedio en peso (Mw) de 4.6 a 6.9 kDa; y
- (iv) que tiene un sacárido que se encuentra predominantemente de (Fórmula I):



en donde



n es un número entero de 2 a 20, de modo que las cadenas de polisacárido tienen de 2 a 20 unidades de disacárido correspondientes a pesos moleculares entre 1.2 y 12 kDa;

(v) en donde las cadenas de polisacáridos están esencialmente libres de ácidos idurónicos y/o glucurónicos no sulfatados químicamente intactos de las secuencias de pentasacáridos que median el efecto anticoagulante; y

(vi) en donde los glicosaminoglicanos modificados químicamente tienen una distribución de polisacáridos y su correspondiente peso molecular expresado como % acumulativo del peso de acuerdo con la tabla:

20

Masa molecular [kDa]	Peso acumulativo [%]
>10	4-15
>8	10-25
>6	22-45
>3	>70

25 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la preeclampsia (PE).

De acuerdo con la presente invención, la tafoxiparina se puede utilizar como monoterapia o en terapia de combinación con un agente utilizado como terapia para cuidado estándar (SOC) de la preeclampsia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 La Figura 1A (Ejemplo 1) muestra gráficas de concentración-contracción para un paciente (paciente No. 13) en la presencia de concentraciones crecientes de angiotensina II. El eje X refleja la concentración del vasoconstrictor de angiotensina II y el eje Y refleja la respuesta contráctil.

La Figura 1B (Ejemplo 1) muestra gráficas de concentración-contracción para un paciente (paciente No. 13) en la presencia de concentraciones crecientes de endotelina 1. El eje X refleja la concentración del vasoconstrictor de la endotelina 1 y el eje Y refleja la respuesta contráctil.

35 La Figura 2A (Ejemplo 2) muestra gráficas de concentración-contracción para un paciente (paciente No. 14), provocados por la adición de concentraciones crecientes de la angiotensina II. El eje X refleja la concentración del vasoconstrictor de angiotensina II y el eje Y refleja la respuesta contráctil.

La Figura 2B (Ejemplo 2) muestra gráficas de concentración-contracción para un paciente (paciente

No. 14), provocados por la adición de concentraciones crecientes de endotelina 1. El eje X refleja la concentración del vasoconstrictor de la endotelina 1 y el eje Y refleja la respuesta contráctil.

La Figura 3 (Ejemplo 3) muestra respuestas contráctiles para tafoxiparina (10 µg/ml) y para el comparador LMWH tinzaparina (10 µg/ml), provocadas por la adición de concentraciones crecientes de angiotensina II. El eje X refleja la concentración del vasoconstrictor de la angiotensina II y el eje Y refleja la respuesta contráctil.

La Figura 4 (Ejemplo 4) muestra las respuestas contráctiles para tafoxiparina (100 µg/ml) y para el comparador LMWH tinzaparina (100 µg/ml), provocadas por la adición de concentraciones crecientes de angiotensina II. El eje X refleja la concentración del vasoconstrictor de la angiotensina II y el eje Y refleja la respuesta contráctil.

La Figura 5 (Ejemplo 5) muestra respuestas contráctiles para tafoxiparina (10 µg/ml) y para el comparador LMWH tinzaparina (10 µg/ml), provocadas por la adición de concentraciones crecientes de endotelina 1 (ET-1). El eje X refleja la concentración del vasoconstrictor de endotelina 1 (ET-1) y el eje Y refleja la respuesta contráctil.

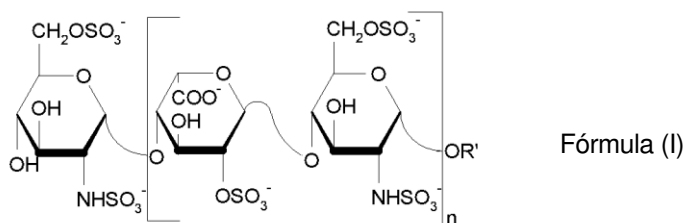
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES

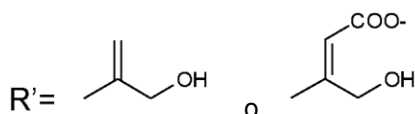
La tafoxiparina es un derivado de heparina con el código de compuesto de la compañía DF01. La INN (Denominación Común Internacional) para DF01 es tafoxiparina de sodio. El número de registro CAS (CAS RN) para tafoxiparina es RN 1638190-65-4. La DF01 es una forma despolimerizada de heparina esencialmente sin actividad anticoagulante.

Más específicamente, la tafoxiparina es un derivado de heparina:

- (i) que tiene una actividad antifactor IIa de menos de 10 UI/mg;
- (ii) que tiene una actividad antifactor Xa de menos de 10 UI/mg;
- (iii) que tiene un peso molecular promedio en peso (Mw) de 4.6 a 6.9 kDa, tal como 5.0-6.9 kDa; y
- (iv) que tiene un sacárido que se encuentra predominantemente de (Fórmula I):



en donde



n es un número entero de 2 a 20, de modo que las cadenas de polisacárido tienen de 2 a 20 unidades de disacárido correspondientes a pesos moleculares entre 1.2 y 12 kDa;

- (v) en donde las cadenas de polisacáridos están esencialmente libres de ácidos idurónicos y/o

glucurónicos no sulfatados químicamente intactos de las secuencias de pentasacáridos que median el efecto anticoagulante; y

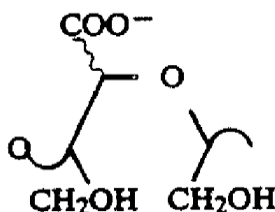
(vi) en donde los glicosaminoglicanos modificados químicamente tienen una distribución de polisacáridos y su correspondiente peso molecular expresado como % acumulativo del peso de acuerdo con la tabla:

Masa molecular [kDa]	Peso acumulativo [%]
>10	4-15
>8	10-25
>6	22-45
>3	>70

Las cadenas de polisacáridos que se encuentran predominantemente en la tafoxiparina tienen entre 6 y 12 unidades de disacáridos con pesos moleculares de 3.6-7.2 kDa.

La tafoxiparina puede tener glucosaminas insaturadas en el extremo no reductor presentadas como señales en el intervalo de 5.0 a 6.5 ppm en un espectro de $^1\text{H-NMR}$ con una intensidad (proporción %) de menos del 4% en relación con la señal a 5.42 ppm de la heparina natural, y también puede estar produciendo señales a 5.95 ppm y 6.15 ppm en un espectro de $^1\text{H-NMR}$.

La tafoxiparina derivada de heparina puede comprender residuos de glicol dividido de acuerdo con la estructura química:



El término “tratamiento o terapia”, tal como se utiliza en la presente, toma el término habitual dentro del campo médico y farmacéutico, e incluye tanto el tratamiento terapéutico como el tratamiento profiláctico.

Siempre que se utilice en la presente el término “tratamiento terapéutico” o “terapia de intervención”, significa el tratamiento de una mujer embarazada que ha sido diagnosticada o que está siendo diagnosticada que tiene (que padece de) preeclampsia (PE). Este tratamiento (terapia) puede ser una monoterapia con tafoxiparina, o una terapia de combinación que comprende la administración de tafoxiparina y un agente (fármaco) utilizado como terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

Siempre que el término “terapia profiláctica”, “tratamiento profiláctico” o “tratamiento preventivo”, como se utiliza en la presente, significa que la tafoxiparina se administra a una mujer embarazada que corre el riesgo de desarrollar preeclampsia (PE) pero que aún no ha sido diagnosticada de tener (que padece de) preeclampsia (PE). Esta terapia profiláctica (terapia preventiva) puede ser una monoterapia con tafoxiparina, o una terapia de combinación que comprenda tafoxiparina y un agente (fármaco) utilizado como terapia para cuidado estándar (SOC) de la preeclampsia (PE).

El término “monoterapia”, como se utiliza en la presente, significa terapia con tafoxiparina sola, administrada a una mujer a la que se diagnostica o ha sido diagnosticada con preeclampsia (PE), o una mujer que está en riesgo de desarrollar preeclampsia (PE). La monoterapia puede ser terapia terapéutica

(tratamiento) o terapia preventiva (prevención).

El término “terapia de combinación”, como se utiliza en la presente, significa terapia con tafoxiparina en combinación con un agente (fármaco) utilizado como una terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE). La terapia de combinación se puede utilizar administrando dicha terapia de combinación a una mujer que es diagnosticada o ha sido diagnosticada con preeclampsia (PE), o una mujer que está en riesgo de desarrollar preeclampsia (PE). La terapia de combinación puede ser terapia terapéutica (tratamiento) o terapia preventiva (prevención). Antes se puede administrar la tafoxiparina en terapia de combinación de acuerdo con la presente invención, después (adicional) o simultáneamente a la administración de un agente (fármaco) utilizado como terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

El término “tafoxiparina (utilizada) como terapia adicional” tal como se utiliza en la presente, se define como una terapia de combinación en donde la tafoxiparina se administra a una mujer embarazada que ya está recibiendo terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE). La terapia adicional puede ser terapéutica (es decir, tratamiento) o preventiva (es decir, profiláctica).

El término “tafoxiparina administrada antes de la administración de un agente (fármaco) utilizado como terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE)” se define como una terapia de combinación en donde la tafoxiparina se administra antes de la administración de un agente (fármaco) utilizado como terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

El término “terapia adicional”, como se utiliza en la presente, abarca que la tafoxiparina se puede administrar antes de administrar un agente (fármaco) utilizado como terapia para cuidado estándar, o alternativamente, la tafoxiparina se puede administrar después de haber administrado un agente (fármaco) utilizado como terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE).

El término “administración simultánea”, como se utiliza en la presente, significa que la tafoxiparina y un agente (fármaco) utilizados como terapia para cuidado estándar de la preeclampsia (PE) se administran simultáneamente a una mujer que necesita la terapia para la preeclampsia.

Cuando se utiliza ácido acetilsalicílico (ASA) como terapia para cuidado estándar, en un aspecto de la invención se puede utilizar en una mujer que ha sido diagnosticada con preeclampsia (PE) en un embarazo anterior. En un aspecto de la invención, el ácido acetilsalicílico (ASA) se puede utilizar como terapia para cuidado estándar en una mujer que se diagnostica, o se ha diagnosticado que tiene preeclampsia (PE) en un embarazo en curso. En un aspecto de la invención, el ácido acetilsalicílico (ASA) se puede utilizar como terapia para cuidado estándar en una mujer que está en riesgo de desarrollar preeclampsia (PE).

El término “terapia para cuidado estándar” (SOC), tal como se utiliza en la presente, se define como el tratamiento o la terapia que se recomienda por las sociedades nacionales e internacionales, directrices en el campo y autoridades médicas y reguladoras para su uso en mujeres embarazadas con riesgo de desarrollar preeclampsia (PE) o una mujer embarazada que ha sido diagnosticada como que padece de preeclampsia (PE). La terapia para cuidado estándar puede ser útil en una mujer que ha sido diagnosticada con preeclampsia (PE) en un embarazo anterior, o en una mujer embarazada que ha sido o que está siendo diagnosticada que tiene preeclampsia (PE) en un embarazo en curso, o en una mujer embarazada que está en riesgo de desarrollar preeclampsia (PE).

El término “mujer embarazada” significa una mujer embarazada que no ha estado embarazada

anteriormente o no ha dado a luz anteriormente, o una mujer embarazada que ha estado embarazada anteriormente y que ha dado a luz anteriormente.

Los términos “fármaco para cuidado estándar”, “agente para cuidado estándar” y “medicamento para cuidado estándar” se pueden utilizar indistintamente, aunque tienen el mismo significado.

5 Los ejemplos de medicamentos de terapia para cuidado estándar comúnmente utilizados en la terapia de la preeclampsia son el ácido acetilsalicílico (ASA), los agentes antihipertensivos, los corticosteroides y los medicamentos anticonvulsivos.

Los corticosteroides se pueden utilizar en un aspecto de la invención como un agente en una terapia para cuidado estándar, cuando el bebé corre el riesgo de nacer prematuro con una función pulmonar
10 deficiente debido a que la madre ha sufrido preeclampsia durante el embarazo (PE). Los ejemplos de corticosteroides que pueden ser útiles son la dexametasona o la prednisolona. El uso de corticosteroides en una mujer que tiene preeclampsia se conoce como terapia prenatal.

El ácido acetilsalicílico (ASA) es un fármaco analgésico comercialmente disponible que se reconoce como la marca comercial Aspirin® en países tales como la Unión Europea y los Estados Unidos (nombre
15 IUPAC ácido 2-acetiloxibenzoico).

El término “preeclampsia (PE)” se define como una afección en una mujer embarazada, en donde la mujer tiene una presión arterial (BP) de 140/90 o mayor, tal como 160/100 o mayor, y un valor de albúmina/creatinina en orina ≥ 30 mg/mmol. La proteinuria ($\geq 2+$ en la tira reactiva de orina) puede ser otro
20 indicador de preeclampsia (PE). La preeclampsia se define en la presente de acuerdo con *Poon L.C. et al: The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention; Int J Gynecol Obstet* 2019; 145 (Suppl. 1): 1–33DOI: 10.1002/ijgo.12802. Sin embargo, la definición de preeclampsia que se hace en la presente no debe descalificar el significado del término “preeclampsia” en caso de que esta condición sea redefinida en un momento posterior por expertos médicos en el campo.

25 La preeclampsia (PE) es una enfermedad vascular específica del embarazo, caracterizada por hipertensión materna *de novo* y daño orgánico, y más específicamente hipertensión inducida por el embarazo con proteinuria (es decir, una gran cantidad de proteína en la orina) que en general se desarrolla después de las 20 semanas de gestación. Una reducción en el flujo sanguíneo uterino causa isquemia de placenta y liberación de placenta de factores anti-angiogénicos tal como sFlt-1 seguido de PE. La preeclampsia aumenta
30 el riesgo de malos resultados tanto para la madre como para el bebé. En la enfermedad grave puede haber descomposición de los glóbulos rojos; un bajo conteo de plaquetas en la sangre; alteración de la función hepática; disfunción del riñón; hinchazón; dificultad para respirar debido a líquido en los pulmones; y/o alteraciones visuales. Si no se trata, puede provocar convulsiones, momento en el que se conoce como eclampsia. Los factores de riesgo para la preeclampsia incluyen un diagnóstico temprano de la preeclampsia,
35 obesidad, hipertensión arterial, edad avanzada y diabetes mellitus. La preeclampsia es más frecuente en el primer embarazo de una mujer y si está embarazada de mellizos. El mecanismo subyacente implica la formación anormal de vasos sanguíneos en la placenta, entre otros factores. La mayoría de los casos se diagnostican antes del parto. En raras ocasiones, la preeclampsia puede comenzar en el período posterior al parto.

La definición de preeclampsia (PE) también se asocia con una serie de complicaciones perinatales y neonatales a corto y largo plazo, es decir, complicaciones para el bebé, incluyendo la muerte. Las complicaciones a corto plazo pueden ser restricción del crecimiento fetal (FGR), oligohidramnios, muerte fetal intrauterina (IUFD), parto prematuro, puntuación de Apgar baja, FHR no tranquilizadora durante el trabajo de parto o necesidad de ingreso en la NICU (Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales). Las complicaciones a largo plazo pueden ser parálisis cerebral, bajo IQ, pérdida de audición, discapacidad visual, resistencia a la insulina, diabetes mellitus, enfermedad de las arterias coronarias o hipertensión (*Poon L.C. et al: The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention; Int J Gynecol Obstet* 2019; 145 (Suppl. 1): 1–33DOI: 10.1002/ijgo.12802).

Las manifestaciones maternas agudas se resuelven después del parto, aunque a menudo dejan a la mujer con daño vascular permanente. La preeclampsia se asocia con un mayor riesgo de hipertensión crónica en el futuro, enfermedad cardiovascular (CVD), enfermedad cerebrovascular y muerte.

Aunque históricamente se requería tanto presión arterial elevada (> 140/90 en una mujer después de 20 semanas de embarazo) como proteína en la orina para hacer el diagnóstico, algunas definiciones también incluyen a aquellas con hipertensión y cualquier disfunción orgánica asociada. Se desconoce el mecanismo exacto por el cual la preeclampsia y otros trastornos antihipertensivos del embarazo confieren riesgos cardiovasculares a largo plazo.

El término “síndrome HELLP” es una complicación del embarazo mortal en la vida, que se considera una variante de la preeclampsia. Por lo general, ocurre durante las últimas etapas del embarazo o, en ocasiones, después del parto. **H** significa hemólisis, la cual es la descomposición de los glóbulos rojos; **EL** significa enzimas hepáticas elevadas; y **LP** significa conteo bajo de plaquetas. El síndrome HELLP puede ser difícil de diagnosticar, en especial cuando no hay presión arterial alta ni proteína en la orina. Sus síntomas en ocasiones se confunden con gastritis, gripe, hepatitis aguda, enfermedad de la vesícula biliar u otras afecciones.

El término “obesa” se define como una persona (en la presente invención, mujer) que tiene un BMI (Índice de Masa Corporal) de 30 o mayor (definición de acuerdo con los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH).

El término “prediabético” significa una persona (en la presente invención, una mujer) que tiene un componente del síndrome metabólico y se caracteriza por niveles elevados de azúcar en la sangre que caen por debajo del umbral para diagnosticar diabetes mellitus. Por lo general, no causa síntomas, pero las personas con prediabetes a menudo tienen obesidad (en especial, obesidad abdominal o visceral), dislipidemia con triglicéridos elevados y/o colesterol HDL bajo e hipertensión. También se asocia con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (CVD). La prediabetes se considera con mayor precisión una etapa temprana de la diabetes, ya que las complicaciones de salud asociadas con la diabetes tipo 2 a menudo ocurren antes del diagnóstico de diabetes (*American Diabetes Association (January 2017). Classification and diagnosis of diabetes”. Diabetes Care. 40 (Suppl 1): S11–S24. doi:10.2337/dc17-S005. PMID 27979889*).

El término “diabetes” o “diabético” significa un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por un

nivel elevado de azúcar en la sangre durante un período prolongado de tiempo (*World Health Organization. Archived from the original el 31 de marzo de 2014. Revisadas el 4 de abril de 2014*). Los síntomas a menudo incluyen micción frecuente, aumento de la sed y aumento del hambre. Si se deja de tratar, la diabetes puede provocar muchas complicaciones (*WHO. October 2013. Archivado desde el original el 26 de agosto de 2013.*

5 *Revisado el 25 de marzo de 2014*). Las complicaciones agudas pueden incluir cetoacidosis diabética, estado hiperglucémico hiperosmolar o muerte. Las complicaciones severas a largo plazo incluyen enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, enfermedad renal crónica, úlceras en los pies, daño a los nervios y daño a los ojos.

El término “terapia posparto” (terapia iniciada después del parto) en la presente se define como el
10 tratamiento (tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico) de una mujer que ha dado a luz a un bebé, y cuando dicha mujer está en riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular o cualquier otra enfermedad que se puede deber a preeclampsia o eclampsia, o una mujer que ya ha sido diagnosticada con una enfermedad cardiovascular o cualquier otra enfermedad que se puede deber a preeclampsia o eclampsia. Dicha terapia se puede iniciar en cualquier momento después del parto con una duración de dicha terapia de
15 hasta una semana, hasta dos semanas, hasta tres semanas, hasta cuatro semanas, hasta cinco semanas, hasta seis semanas, hasta siete semanas, hasta ocho semanas, hasta nueve semanas, hasta diez semanas, o con una duración de dicha terapia posparto de preeclampsia (PE) como se determina por el médico responsable de dicha mujer.

El tratamiento de la preeclampsia (PE) como se describe en la presente, puede continuar en un
20 aspecto adicional de la invención después de dar a luz a un bebé, donde la duración de dicha terapia puede continuar hasta una semana, hasta dos semanas, hasta tres semanas, hasta cuatro semanas, hasta cinco semanas, hasta seis semanas, hasta siete semanas, hasta ocho semanas, hasta nueve semanas, hasta diez semanas, o hasta un tiempo adecuado como se determina por el médico responsable de dicha mujer.

El término “aumentar el intercambio de circulación de placenta con la circulación materna (arterias
25 espirales)”, como se utiliza en la presente, significa mantener o mejorar la capacidad de la vena umbilical para transportar sangre fresca oxigenada y rica en nutrientes que circula de regreso a la circulación sistémica fetal.

El término preeclampsia, pre-eclampsia o PE se utiliza indistintamente a todo lo largo de la presente especificación y reivindicaciones, aunque tiene el mismo significado.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

30 La tafoxiparina derivada de heparina, tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención, se puede administrar como una composición farmacéutica adecuada para la administración sistémica. Un ejemplo de administración sistémica es la administración parenteral, tal como, por administración subcutánea, inyección intravenosa, infusión o administración intramuscular.

La tafoxiparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención también se puede administrar
35 por administración local. Los ejemplos de administración local que pueden ser útiles para administrar la tafoxiparina de acuerdo con la invención son la administración oral, la administración vaginal o la administración rectal.

Para la administración parenteral, la tafoxiparina se puede incorporar a una solución o suspensión, que también puede contener uno o más adyuvantes tal como diluyentes estériles tal como agua para

inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicol, glicerol, propilenglicol u otros solventes sintéticos, agentes antibacterianos, antioxidantes, agentes quelantes, tampones y agentes para ajustar la osmolalidad. La formulación farmacéutica parenteral se puede llenar en ampolletas, viales, jeringas desechables o como disposiciones de infusión, tal como para la autoadministración.

5 En un aspecto de la invención, la dosis de tafoxiparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar de cualquiera de las dosis diarias de 300-2000 mg por día; 400-2000 mg/día; 500-2000 mg/día; 600-2000 mg/día; 700-2000 mg/día; 800-2000 mg/día; 900-2000 mg/día; 1000-2000 mg/día; 1100-2000 mg/día; 1200-2000 mg/día; 1300-2000 mg/día; 1400-2000 mg/día; 1500-2000 mg/día; 1600-2000 mg/día; 1700-2000 mg/día; 1800-2000 mg/día; y 1900-2000 mg/día.

10 En un aspecto de la invención, la dosis de tafoxiparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar de cualquiera de las dosis diarias de 350-2000 mg por día; 450-2000 mg/día; 550-2000 mg/día; 650-2000 mg/día; 750-2000 mg/día; 850-2000 mg/día; 950-2000 mg/día; 1050-2000 mg/día; 1150-2000 mg/día; 1250-2000 mg/día; 1350-2000 mg/día; 1450-2000 mg/día; 1550-2000 mg/día; 1650-2000 mg/día; 1750-2000 mg/día; 1850-2000 mg/día; y 1950-2000 mg/día.

15 En un aspecto de la invención, la dosis de tafoxiparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar de cualquiera de las dosis diarias de 300-1000 mg por día; 400-1000 mg/día; 500-1000 mg/día; 600-1000 mg/día; 700-1000 mg/día; 800-1000 mg/día; y 900-1000 mg/día.

 En un aspecto de la invención, la dosis de tafoxiparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar de cualquiera de las dosis diarias de 350-1000 mg por día; 450-1000 mg/día; 550-1000 mg/día; 650-1000 mg/día; 750-1000 mg/día; 850-1000 mg/día; y 950-1000 mg/día.

20 En un aspecto de la invención, la dosis de tafoxiparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención es de 50-300 mg/por día, tal como de 60-300 mg/día, 70-300 mg/día, 80-300 mg/día, 90-300 mg/día, 100-300 mg/día, 110-300 mg/día, 120-300 mg/día, 130-300 mg/día, 140-300 mg/día, 150-300 mg/ día, 160-300 mg/día, 170-300 mg/día, 180-300 mg/día, 190-300 mg/día, 200-300 mg/día, 210-300 mg/día, 220-300 mg/día, 230-300 mg/día, 240-300 mg/día, 250-300 mg/día, 260-300 mg/día, 270-300 mg/día, 280-300 mg/día o 290-300 mg/día.

 En un aspecto de la invención, la dosis de tafoxiparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención es de 50-100 mg/día, tal como 50 mg/día, 60 mg/día, 70 mg/día, 70 mg/día, 80 mg/día, 90 mg/día o 100 mg/día. En un aspecto de la invención, la dosis de tafoxiparina como se utiliza de acuerdo con la presente invención es de 300 mg/día, 200 mg/día o 150 mg/día. En un aspecto de la invención, la dosis de tafoxiparina tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención es de hasta 150 mg/día, tal como hasta 100 mg/día o hasta 75 mg/día.

30 En un aspecto de la invención, la administración puede ser una vez al día. En un aspecto de la invención, la administración puede ser dos veces al día. En un aspecto de la invención, la administración puede ser tres veces al día. Por ejemplo, una dosis diaria de 300 mg se puede dividir al administrar la tafoxiparina como tres dosis de 100 mg o dos dosis de 150 mg. Una dosis diaria de 150 mg se puede dividir en dos dosis de 75 mg o tres dosis de 50 mg. Una dosis diaria de 100 mg se puede dividir en dos dosis de 50 mg.

EJEMPLOS

Producción de tafoxiparina

La tafoxiparina, como se utiliza de acuerdo con la presente invención, se puede preparar siguiendo el procedimiento sintético como se describe en los Ejemplos 1 a 9 de la solicitud de patente publicada WO 2013/095279 o Ejemplos 1 a 3 de WO 2014/202982.

En los experimentos de miografía realizados a continuación, la tafoxiparina se proporcionó por Dilafor AB, Suecia, como una solución de 150 mg/mL:

Ingrediente	Concentración	Función
Tafoxiparina (DF01)	150 mg/mL	API
Fosfato de sodio	15 mM	PH amortiguado
Ácido clorhídrico	Como se requiere	Ph ajustador
Hidróxido de sodio	Como se requiere	Ph ajustador
Agua para inyección	1 ml adicional	Solvente/Diluyente

ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Durante el síndrome de preeclampsia asociada con el embarazo (PE), existe una mayor liberación de las vesículas extracelulares del sincitiotrofoblasto de placenta (STBEVs) y hemoglobina fetal libre (HbF) en la circulación materna. La internalización de STBEVs en células endoteliales primarias de arteria coronaria humana (HCAEC) y la transferencia de miARN específicos de placenta de STBEVs al retículo endoplásmico y las mitocondrias de estas células receptoras ha sido investigada por *Cronqvist T et al: Scientific Reports 7:4558; DOI:10.1038/s41598-017-04468-0*. Los efectos mediados por miARN sobre la expresión génica puede contribuir al estrés oxidativo y del retículo endoplásmico descrito en la PE, así como a la reprogramación endotelial que puede ser la base del mayor riesgo de enfermedad cardiovascular reportado para mujeres con PE más adelante en la vida (Cronqvist T et al: Scientific Reports 7: 4558; DOI:10.1038/s41598-017-04468-0).

Cha Han et. al., reporta en *Haematologica 2020, volumen 105 (6): págs. 1686-1694* que los niveles elevados de las vesículas extracelulares derivadas de la placenta (pcEV) en la circulación se han asociado consistentemente con la preeclampsia. Los autores reportaron que demostraron que pcEV de la placenta lesionada indujo una condición similar a la preeclampsia en ratones al inducir lesión endotelial, vasoconstricción, e hipercoagulación. Esta condición inducida por pcEV se evitó al mejorar la depuración de EV. Por lo tanto, las tasas de producción y depuración de pcEV se podrían utilizar para la evaluación del riesgo de preeclampsia y convertirse en nuevos objetivos terapéuticos para la preeclampsia.

Al proteger los vasos sanguíneos de la contracción durante el embarazo y, por lo tanto, al reducir la presión arterial, se establece una circulación de placenta mejorada que da como resultado un menor riesgo de Restricción del Crecimiento Intrauterino (IUGR). Con la presión arterial y el crecimiento fetal normalizados, el número de nacimientos prematuros se puede reducir. El efecto materno a largo plazo será la prevención de la reprogramación de las células endoteliales vasculares y, por lo tanto, la prevención de la rigidez de los vasos sanguíneos después de la preeclampsia (PE).

El propósito de este estudio fue examinar si y cómo las vesículas derivadas de mujeres con preeclampsia pueden modificar las respuestas contráctiles a la angiotensina II (AngII) y la endotelina-1 (ET-1) en arterias subcutáneas removidas de mujeres que acaban de dar a luz a su hijo con la cesárea.

Investigamos si el fármaco de tafoxiparina podría modificar las respuestas contráctiles.

Abreviaturas

Las siguientes abreviaturas se han utilizado en los ejemplos de trabajo y en las figuras.

“P” significa un segmento de arteria que ha estado expuesto a vesículas de una mujer embarazada sin PE.

“PE” significa una arteria o segmento de arteria que ha estado expuesto a vesículas de una mujer embarazada con PE.

“PE-tafoxi” significa una arteria o segmento de arteria que ha sido tratada con tafoxiparina, seguido por tratamiento con vesículas de una mujer embarazada con PE.

“PE + tinza(parina)” significa una arteria o segmento de arteria que ha sido tratada con tinzaparina, seguido por tratamiento con vesículas de una mujer embarazada con PE.

“P + tafoxi” significa una arteria o segmento de arteria que ha sido tratada con tafoxiparina, seguido por tratamiento con vesículas de una mujer embarazada sin PE.

“P + tinza(parina)” significa una arteria o segmento de arteria que ha sido tratada con tinzaparina, seguido por tratamiento con vesículas de una mujer embarazada sin PE.

“Tafoxi” significa que una arteria o segmento de arteria que ha sido tratada sólo con tafoxiparina (es decir, sin adición de las vesículas).

“Blank” significa que una arteria o segmento de arteria no ha sido sometida a ningún tratamiento.

Sustancia P es un potente vasodilatador de 11 residuos de aminoácidos bien conocido por los expertos en la técnica.

EXPERIMENTOS MIOGRÁFICOS

Los sincitiotrofoblastos de placenta (STB) liberan vesículas extracelulares (STB-EV) que comunican señales de placenta fisiológicas y patológicas a los órganos maternos. La liberación de STB-EV aumenta en la preeclampsia (PE) (*Sammar et al Placenta 66 (2018) págs. 17-25*).

En un modelo miográfico, se utilizaron arterias de tejido subcutáneo de mujeres sometidas a cesárea. El efecto contráctil de las arterias que comprenden vesículas derivadas de placentas de mujeres con preeclampsia se comparó con el efecto contráctil de las arterias que comprenden vesículas derivadas de placentas de mujeres sin preeclampsia. También se investigó el posible efecto sobre la contractilidad del pretratamiento con tafoxiparina antes de agregar las vesículas. La Heparina de Bajo Peso Molecular (LMWH) tinzaparina (Innohep®, Leo Pharma Dinamarca) se utilizó como comparador.

El sistema miográfico de múltiple red, está diseñado para investigar las respuestas activas y pasivas altamente isométricas para vasos pequeños (*Högestätt et al, Acta Physiol 1983, 117, págs. 49-61*) y en la actualidad se aplica a los vasos abdominales subcutáneos (*Edvinsson et al, Acta Physiol 2014;210:811-22; Edvinsson et al, Microcirculation 2016;23:438-46*).

En los experimentos miográficos realizados en la presente, la tafoxiparina (DF01) fue proporcionada por Dilafor AB, Suecia.

Perfusión de placenta y recolección de muestras

La perfusión dual *ex-vivo* de cotiledones de placenta humanos aislados de embarazos normales (n = 5) y PE (n = 5) se realiza como se describe en *Southcombe, J., Tannetta, D., Redman, C. & Sargent, I.*

The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. PLoS One **6**, e20245 (2011). En resumen, el experimento de perfusión consiste de una fase de equilibrio de 30 minutos, a partir del cual se descarta la perfusión materna. Después del equilibrio, el circuito materno se cierra y se perfunde la placenta durante 3 horas. Solo se incluyen las perfusiones con una tasa de retorno fetal >80%. La perfusión se recolecta del lado materno al final de la perfusión de 3 horas y se utiliza para el aislamiento y análisis de STBEV. El método de perfusión de placenta se elige para recolectar STBEV normales y PE en este estudio, debido al gran rendimiento de las vesículas que está disponible utilizando este método.

Aislamiento de STBEV (vesículas)

El aislamiento de STBEV se realiza utilizando pasos de centrifugación secuenciales. Después de la perfusión, la perfusión materna se centrifuga a 600 x g o 1500 x g para remover los glóbulos rojos, y el sobrenadante se congela y almacena a -80°C hasta su posterior análisis. El sobrenadante se centrifuga durante 30 minutos a 3500 x g y +4°C para remover los desechos celulares. El sobrenadante de 3500 x g se ultracentrifuga adicionalmente durante 3 horas a 110 000 x g a +4°C, y el material sedimentado se utiliza para estudios adicionales y se denomina STBEV.

Las distribuciones de tamaño STBEV se analizan utilizando Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA). El NTA se realiza utilizando un NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipado con un láser de 488 nm. Se analizan STBEV normales (n=5) y PE (n=5), diluidos en 1xPBS. Las mediciones se realizan en triplicados de 90 segundos utilizando la ganancia manual, el nivel de la cámara ajustada en 10 u 11 y el umbral de detección ajustada a 3. Los archivos obtenidos se analizan utilizando el software NTA 3.2.16 (Malvern Instruments). Las concentraciones de proteína STBEV se determinan utilizando un Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) o utilizando el Ensayo de Proteína Pierce^{MR} BCA (Thermo Scientific, Rockford, USA). Los STBEV se vuelven a suspender en Solución Salina Tamponada con Fosfato 1x (PBS) y se almacenan a -80°C.

Las vesículas utilizadas son diferentes de experimento a experimento y se agrupan en diferentes proporciones dependiendo de la concentración de proteína. Sin embargo, no se mide la "potencia" para cada lote combinado de las vesículas.

Los tamaños medios de las vesículas para STBEV normales y PE fueron 186 ± 22 nm y 185 ± 6 nm, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la distribución de tamaños entre los STBEV normales y PE. Una comparación entre las concentraciones de las vesículas de las muestras de STBEV, estimadas con NTA, y la concentración de proteína, medida utilizando el análisis NanoDrop, mostró una concentración de proteína para STBEV normal y PE de 2.97 ± 1.17 mg/mL y 2.68 ± 2.04 mg/mL, respectivamente.

De acuerdo con NTA, la concentración de las vesículas fue de $1.18 \times 10^{09} \pm 8.20 \times 10^{08}$ y $9.63 \times 10^{08} \pm 8.04 \times 10^{08}$ partículas/mL, respectivamente. El conteo de las vesículas/partículas se correlacionó fuertemente con la concentración de proteína ($r=0.91$). (*Placental syncytiotrophoblast extracellular vesicles enter primary endothelial cells through clathrin-mediated endocytosis. Cronqvist T, Erlandsson L, Tannetta D, Hansson SR. Placenta. 2020 Oct;100:133-141. doi: 10.1016/j.placenta.2020.07.006. Epub 2020 Jul 11.PMID: 32980046*).

EXPERIMENTOS DE CONTRACCIÓN

Experimentos de preparación y contracción de vasos [segmentos arteriales]

Las arterias subcutáneas se removieron de la grasa subcutánea del abdomen durante la cesárea y se pusieron inmediatamente en medio DMEM frío. Las arterias se diseccionaron en tampón de Na-Krebs frío a un pH de 7.3-7.4 y se cortaron en segmentos de anillo con una longitud de 1-2 mm como se mostró anteriormente. Las secciones se montaron en dos alambres de 40 μ m de diámetro y se conectaron a un dispositivo sensible a la tensión vascular. La propiedad de fuerza de estiramiento de las arterias se registró con miógrafos Mulvany-Halpern. Los segmentos de las arterias montados se sumergieron en baños de tejido con temperatura controlada (+37°C) que contenían solución tampón a base de bicarbonato gaseado con carbógeno para obtener un pH de 7.3-7.4. Cada segmento se estiró hasta el 90% de la circunferencia interna normal, que es el tamaño que tendría cada segmento con una presión transmural de 100 mm Hg. La capacidad contráctil de cada segmento de la arteria se comprobó mediante exposición a solución tampón KCl 60 mM dos o tres veces para estudiar la viabilidad. Después de cada baño, se lavó y el tono volvió al inicio del estudio. Cuando están estables, se agregan a los baños diferentes moléculas o agonistas de receptores en función de la concentración para observar las respuestas vasomotoras de los vasos.

En algunos experimentos, la función endotelial se probó mediante la contracción previa de los vasos con tampón de potasio 30 mM, proporcionando un tono estable y la función endotelial evaluada por exposición a la sustancia P (10^{-6} o 10^{-5} M).

Las arterias utilizadas en cada experimento provienen de diferentes mujeres con diferentes anamnesis, edad y antecedentes genéticos, que son factores que pueden afectar el endotelio vascular y su respuesta a fármacos tales como la angiotensina y la endotelina, a la exposición vesicular y a la LMWH tinzaparina y tafoxiparina respectivamente.

Se reporta que la variación en los segmentos del anillo del vaso tomados de un individuo tiene grandes variaciones en las pruebas de control básico, como la capacidad contráctil medida por el tratamiento con KCl y la función endotelial medida en la concentración previa, inducida por 5-HT y la dilatación al tratamiento con carbacol.

Los segmentos de las arterias se estudiaron por exposición a angiotensina II o endotelina 1 en concentraciones acumulativas de los agonistas. Estudios previos han mostrado que esto da como resultado en contracciones que son bloqueadas por los respectivos antagonistas, lo que muestra que esto ocurre a través de los receptores de angiotensina AT_1 y endotelina ET_A , respectivamente. En algunos experimentos, 30 minutos después de agregar vesículas a los baños de tejido, se obtuvieron curvas de concentración-contracción mediante la aplicación acumulativa de angiotensina II (agonista de los receptores de angiotensina 1 y 2, intervalo de concentración de 10^{-12} a 10^{-6} M). Después del lavado y de que la tensión vuelve a la línea base, se agregan agonistas. Después del lavado y de que la tensión volviera a la línea base, se agregó endotelina 1 (agonista del receptor de endotelina A y B, intervalo de concentración de 10^{-11} a 10^{-7} M).

Pretratamiento

Los vasos fueron tratados previamente durante 30 minutos con el compuesto tafoxiparina (Dilafor AB, Suecia) y tinzaparina (Innohep®, Leo Pharma Dinamarca) respectivamente, hasta una concentración final en los baños de 10 μ g/ml y 100 μ g/ml de tafoxiparina y tinzaparina respectivamente. Después de 30 minutos, se

agregaron vesículas sin preeclampsia como vesículas de control (P) o de preeclampsia (PE) a una concentración de 200 μg (concentración de proteína 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para el paciente No. 13, se utilizó UP15 (código interno) como vesículas de control y UP18 (código interno) como vasos de PE. Para el paciente No. 14, se utilizó UP8 (código interno) como vesículas de control y UP17 como vesículas de PE.

5 Experimentos de vasoconstricción in vitro

30 minutos después de agregar vesículas a los baños de tejidos, se obtuvieron curvas de concentración-contracción mediante la aplicación acumulativa de angiotensina II (A9525 Sigma-Aldrich Angiotensina II humana, polvo CAS Número 4474-91-3 disuelta en cloruro de sodio a una concentración de 10^{-3} M) y se utilizó en el intervalo de concentración de 10^{-12} a 10^{-6} M. Después del lavado y de que la tensión
10 había vuelto a la línea base, se agregó ET-1 (ALX-155-001, Enzo Life Sciences) y se registró (agonista de los receptores de endotelina A y B, intervalo de concentración de 10^{-11} a 10^{-7} M).

Cálculos

El umbral para la respuesta contráctil al tampón de bicarbonato rico en potasio 60 mM (tampón de Krebs) fue de 0.5 mN utilizando el promedio de las respuestas 2 o 3 al tampón de potasio para obtener una
15 apreciación constante de la capacidad contráctil (valor de normalización, 100%). Los datos se excluyeron del procesamiento de datos si no cumplían el umbral de la respuesta contráctil al tampón rico en potasio.

La contracción máxima producida por un agonista está representada por la contractilidad máxima (E_{max}), y el $\log EC_{50}$ representa la concentración de agonista que se produjo a la mitad de la respuesta máxima. El eje x de las gráficas de concentración-contracción se transforma en log. Se presentan las gráficas
20 de angiotensina II y endotelina 1. La función endotelial se calcula fijando la contracción de 30 nM al 100% y la relajación a la sustancia P muestra que el endotelio es funcional (en el presente caso, aproximadamente del 30% de relajación con relación a la contracción inducida por 30 mM).

Como se muestra a continuación en los resultados experimentales y las figuras, la presencia de las vesículas de PE da como resultado una contracción más fuerte que las vesículas de control/vesículas sin PE
25 (P).

EJEMPLO 1

Paciente 13

En el paciente No. 13 el diámetro interior de las arterias fue de 200-250 μm . La función endotelial estaba intacta en la mayoría de los segmentos, excepto en uno.

30 La adición de tinzaparina (Innohep®) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antes de tratar/incubar las arterias con vesículas de PE redujo la contracción máxima inducida por la aplicación de angiotensina II en un 23%, pero la contracción inducida con ET-1 (la E_{max}) fue la misma, aunque el $\log EC_{50}$ se redujo en un 35% (extrapolado). La tinzaparina no pareció tener ningún efecto reductor sobre la contracción en presencia de las vesículas de control.

35 "Control" en la Tabla 1a y la Tabla 1b a continuación significa vesículas sin preeclampsia (P).

Tabla 1a

Ang-II	Función endotelial [%]	E _{max} [%]	logEC ₅₀
P (Control**)	67	74	10.2
Tinzaparina	96	69	-
PE + Tinzaparina	119.95	75	9.4
PE	5	98	10.5
P + Tinzaparina	69.11	103	10.8

** Cerca del umbral para la respuesta de potasio

Tabla 1b

ET-1	Función endotelial [%]	E _{max} [%]	logEC ₅₀
P (Control**)	67	247	9.0
Tinzaparina	96	144	8.5
PE + Tinzaparina	119.95	143	5.7
PE	5	128	8.8
P + Tinzaparina	69.11	166	8.8

** Cerca del umbral para la respuesta de potasio

Los resultados también se ilustran en la **Figura 1A** y la **Figura 1B**, que muestran gráficas de concentración-contracción para el paciente No. 13, en presencia de angiotensina II (**Figura 1A**) y endotelina 1 (**Figura 1B**) con la línea inferior de la concentración de agonista. Barra izquierda = contracción relativa a la obtenida con tampón de potasio 60 mM. En las gráficas, “**P**” indica vesículas sin preeclampsia; “**tinza**” indica la LMWH tinzaparina; “**PE**” indica vesículas de preeclampsia; y “**control**” indica ningún otro agente que el agonista angiotensina II o endotelina 1 presentes en el baño de tejido.

EJEMPLO 2

Paciente 14

En el paciente No. 14, las arterias tenían 150-350 µm de diámetro y la función endotelial estaba intacta en todas excepto en dos vasos (estos fueron excluidos).

Las arterias del paciente 14 se trataron con ambos tinzaparina (ejemplo comparativo) y tafoxiparina, respectivamente. La adición de tinzaparina a una concentración de 10 µg/ml antes de tratar/incubar los vasos con vesículas de PE redujo la contracción máxima inducida con angiotensina II en un 14% y con ET-1 en un 15%. La presencia de tinzaparina con vesículas de control aumentó la contracción en comparación con solo vesículas. En este caso no había ningún recipiente de control para compararlo.

La adición de tafoxiparina a una concentración de 10 µg/ml redujo la contracción inducida con angiotensina II en un 79% y con ET-1 en un 56% en la presencia de las vesículas de PE. Con vesículas de control P, el tratamiento previo con tafoxiparina tuvo poco o ningún efecto sobre las contracciones mediadas por Ang II y ET-1.

“P” en la Tabla 2a y la Tabla 2b a continuación significa vesículas sin preeclampsia.

Tabla 2a

Ang-II	Función endotelial [%]	E _{max} [%]	logEC ₅₀
PE	1	127	10.4
PE + Tinzaparina	1	109	10.0
P (Control)	10	83	10.1
P + Tinzaparina	22	135	10.0
Tafoxiparina	85	101	10.2
P + Tafoxiparina	22	73	9.8
PE + Tafoxiparina	67	27	9.4

Tabla 2b

ET-1	Función endotelial [%]	E _{max} [%]	logEC ₅₀
PE	1	174	9.8
PE + Tinzaparina	1	147	9.9
P (Control)	10	98	7.0
P + Tinzaparina	22	197	9.4
Tafoxiparina	85	180	9.9
P + Tafoxiparina	22	105	7,7
PE + Tafoxiparina	-	77	6.9

Los resultados también se ilustran en la **Figura 2A y la Figura 2B**, que muestran gráficas de concentración-contracción para el paciente No. 14 provocada por la adición de concentraciones crecientes de angiotensina II (**Figura 2A**) y endotelina 1 (**Figura 2B**). Las respuestas contráctiles se proporcionan como porcentaje de contracción en relación con la contracción inducida por tampón de potasio 60 mM (=100%). En las gráficas, “P” indica vesículas sin preeclampsia; “tinza” indica la LMWH tinzaparina; “PE” indica vesículas de preeclampsia; y “tafoxi” indica tafoxiparina.

EJEMPLO 3

En este experimento se utilizó la angiotensina II (Ang II) como vasoconstrictor. Se agruparon los datos de cuatro pacientes.

Las respuestas contráctiles fueron inducidas por angiotensina II en el vaso después de la preincubación con tafoxiparina a una concentración de 10 µg/ml, o con el comparador tinzaparina que tenía una concentración de 10 µg/ml, seguido por el tratamiento con vesículas de placentas PE.

La presencia de las vesículas de PE da como resultado una contracción más fuerte con concentraciones acumulativas de Ang-II en comparación con las vesículas de control (P). La preincubación con tafoxiparina afecta el efecto contráctil de Ang-II en la presencia de PE. La preincubación con tinzaparina (Innohep®) afecta la respuesta contráctil de Ang-II en la presencia de PE.

Tratamiento	AUC	AUC/AUC (PE)%	Carga contractil %	Valor p
PE	234.4	-	-	
Tafoxi+PE	160.5	68.5	-31.5	0.0039
Tinza+PE (comparador)	170.5	72.7	-27.3	0.0039
P (Control)	182.1	77.7	-22.3	0.30

Se utilizó el siguiente principio estadístico: prueba t de Wilcoxon. PE contra PE + tafoxiparina = 0.0039; AUC -31.5%; PE contra PE + Tinza = 0.0039; AUC -27.3%.

Los resultados también se ilustran en la **Figura 3**.

EJEMPLO 4

En este experimento se utilizó la angiotensina II (Ang II) como vasoconstrictor. Se agruparon los datos de cinco pacientes.

Las respuestas contráctiles fueron inducidas por la angiotensina II en el vaso después de la preincubación con tafoxiparina que tiene una concentración de 100 µg/ml, o con el comparador tinzaparina que tiene una concentración de 100 µg/ml, seguido por tratamiento con vesículas de las placentas PE.

La presencia de las vesículas de PE da como resultado una contracción más fuerte con concentraciones acumulativas de Ang-II en comparación con las vesículas de control (P). La preincubación con tafoxiparina disminuyó significativamente la contracción inducida por Ang-II. La preincubación con el comparador tinzaparina (Innohep®) disminuyó significativamente la contracción inducida por Ang-II.

Tratamiento	AUC	AUC/AUC (PE) %	Carga contractil %	Valor p
PE	432.6	-	-	
Tafoxi + PE	306.5	70.8	-29%	0.027
Tinza + PE (comparador)	299.6	69.3	-31%	0.0273
P (Control)	327.7	75.8	-24%	0.0195

Se utilizó el siguiente principio estadístico: prueba t de Wilcoxon. PE contra PE + tafoxiparina = **; p= 0.027; AUC -28%. PE contra PE + Tinza = *; P = 0.0273; AUC -27%.

Los resultados también se ilustran en la Figura 4.

EJEMPLO 5

En este experimento se utilizó endotelina 1 (ET-1) como vasoconstrictor. Se agruparon los datos de cinco pacientes.

Las respuestas contráctiles fueron inducidas por concentraciones crecientes de ET-1 en las arterias después de la preincubación con tafoxiparina a una concentración de 10 µg/ml, o con el comparador tinzaparina que tenía una concentración de 10 µg/ml, seguido por tratamiento con vesículas de las placentas de PE (PE).

En presencia de las vesículas de PE, ET-1 dio como resultado en respuestas contráctiles más fuertes en comparación con las respuestas de ET-1 en las vesículas de control (P). La preincubación con tafoxiparina, reveló una contracción significativamente baja a ET-1. La preincubación con el comparador tinzaparina (Innohep®) reveló una contracción significativamente baja a ET-1.

Tratamiento	AUC	AUC/AUC (PE) %	Carga contractil %	Valor p
PE	312.3	-	-	
Tafoxi + PE	193.1	61.8	-38%	0.0039
Tinza + PE (comparador)	259.5	83.1	-17%	0.0039
P (Control)	236.4	75.7	-24%	0.0039

Se utilizó el siguiente principio estadístico: prueba t de Wilcoxon. PE contra PE + tafoxiparina = *; p= 0.0039; AUC -38%. PE contra PE + Tinza = *; P = 0.0039; AUC -17%.

Los resultados también se ilustran en la **Figura 5**.

EJEMPLO 6

Ensayo clínico de fase IIa

Se llevará a cabo un estudio clínico piloto exploratorio abierto de Fase IIa. Las mujeres embarazadas ≥ 18 años de edad que hayan sido diagnosticadas con preeclampsia entre la semana 26 y 32 de gestación serán sometidas a terapia diaria con tafoxiparina subcutánea desde el momento del diagnóstico y hasta el parto.

Un total de 23 sujetos participaron en el estudio, con 15 sujetos que recibieron el tratamiento de tafoxiparina activo que comprende el Estándar de Atención (SOC) más tafoxiparina, y 8 sujetos que reciben el control que comprende únicamente la terapia Estándar de Atención. La duración del estudio será el tratamiento desde el momento de diagnóstico y hasta 28 días. Alternativamente, el tratamiento se puede extender hasta el parto (es decir, el tratamiento durará desde el momento del diagnóstico hasta el parto). Después del parto, habrá un período de seguimiento de 8 semanas.

Objetivos principales con este estudio

La seguridad y la tolerabilidad se evaluarán a través de la frecuencia y el carácter de eventos adversos y eventos adversos severos, evaluaciones físicas completas y dirigidas a los síntomas, signos vitales, muestras de sangre de seguridad (hematología y química clínica) y la tasa de retiros del estudio y/o de la medicación del estudio.

Objetivos secundarios con este estudio

Para evaluar la eficacia del tratamiento con tafoxiparina en la preeclampsia. Para los fines de este estudio, la preeclampsia se definirá como hipertensión 160/100 con proteinuria ($\geq 2+$ en tira reactiva de orina o medida como albúmina/creatinina ≥ 30 mg/mmol).

Los siguientes puntos finales (eficacia) secundarios serán monitoreados y evaluados:

Cambio en la presión arterial diastólica desde el inicio del estudio hasta el final del tratamiento y en el control de seguimiento a las 8 semanas; Cambio en la Velocidad de Onda del Pulso Aórtico (PWV) medido por PWV femoral de carótida (cfPWV) al inicio del estudio, después de 2, 7 y 28 días de tratamiento, y a 8 semanas de seguimiento en el control; cambio en la rendimiento cardiaco; Cambio en la tirosina quinasa 1 similar a Fms soluble (sFlt-1); Cambio en el Factor de Crecimiento de Placenta (PIGF); Cambio en la proporción sFlt-1/PIGF; Días de embarazo mantenido; Alcance del tratamiento antihipertensivo (número de fármacos y dosis); Cambios en el crecimiento fetal estimados por ultrasonido; Cambio en el flujo sanguíneo del cordón umbilical; Cambio en el flujo sanguíneo de la arteria uterina; Proporción de sujetos con desprendimiento de placenta; Proporción de lactantes con peso al nacer ≤ 5 percentil; Proporción de lactantes con peso al nacer en el 6–10 percentil; Proporción de sujetos con pérdida fetal después de las 28 semanas de gestación; Proporción de sujetos con eclampsia; proporción de sujetos con oliguria; Proporción de sujetos sometidos a unidades de cuidados intensivos (ICU) durante el estudio; Proporción de sujetos sometidos a parto prematuro; Proporción de sujetos sometidos a cesáreas (CS); Indicaciones maternas y fetales para CS; Proporción de sujetos que se sometieron a partos instrumentales (extracción al vacío (VE)/parto con fórceps); Proporción de sujetos con hemorragia posparto (PPH) >2000 ml; Resultado fetal medido como peso al nacer, puntaje de Apgar, acidosis ($\text{pH} < 7.10$) y/o exceso de base < -12 mmol/L arterial o venosa en sangre de cordón umbilical; e indicación de derivación a unidad de cuidados intensivos neonatales (NICU).

Fármacos de estudio

La tafoxiparina será proporcionada por Dilafor AB, Suecia, como una solución de 150 mg/ml.

El producto en investigación será administrado por vía subcutánea cada 24 ± 3 horas por el personal del sitio. El tratamiento diario del estudio será de 300 mg (2 x 1 mL, 150 mg/ml de tafoxiparina) de tafoxiparina por vía subcutánea (SC) durante 4 semanas a menos que exista una indicación clínica para interrumpir o

continuar el tratamiento. A todos los sujetos se les dará un tratamiento normal para la preeclampsia, incluyendo ASA 150 mg de dosis oral (OD) y el tratamiento antihipertensivo de acuerdo con la práctica clínica. Se registrará cualquier medicamento (incluyendo los medicamentos de venta libre o recetados y/o los suplementos a base de hierbas) u otras categorías específicas de interés que el participante esté recibiendo en el momento de la inscripción o que reciba durante el estudio.

Los siguientes medicamentos están prohibidos antes y durante el estudio:

Uso de fármacos que interfieren con la hemostasia, incluyendo heparina/LMWH, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), warfarina y antagonistas de la vitamina K, durante las tres semanas antes de la inscripción (inicio del estudio) y durante el estudio. No se puede utilizar el ácido acetilsalicílico (ASA) desde el inicio del embarazo o más de una semana antes de ingresar al estudio.

Biomarcadores que serán monitoreados durante el estudio:

I. Cambio en la tirosina quinasa 1 similar a Fms soluble (sFlt-1). sFlt1 está elevado en la preeclampsia.

II. Cambio en el factor de crecimiento de placenta (PIGF). El factor de crecimiento de placenta (PIGF) es una molécula cada vez más importante en la predicción, diagnóstico y tratamiento de la preeclampsia.

III. Cambio en la proporción sFlt-1/PIGF. La proporción sFlt-1 a PIGF está elevada en mujeres embarazadas antes del inicio de la preeclampsia.

Criterios de selección

(a) Inclusión

Para participar en este estudio, los sujetos deben cumplir con todos los siguientes criterios de inclusión: Mujeres embarazadas nulíparas entre 18 y 45 años de edad, que hayan sido diagnosticadas con preeclampsia y donde el sujeto esté programado para hospitalización. La edad gestacional debe ser a partir de la semana 26 y hasta la semana 32 (inclusive), confirmada por ultrasonido antes de la semana 21 de gestación. El embarazo también debe ser embarazo único.

(b) Exclusión

Los sujetos que padecen y/o han sido diagnosticados con, cualquiera de las siguientes enfermedades y/o síntomas, están excluidos del estudio: Sujetos que no pueden comprender las instrucciones escritas y verbales en el idioma local; presencia de placenta previa; CTG patológico en la inclusión; diabetes; preeclampsia; síndrome HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas); trastornos de la coagulación previamente conocidos (Leiden - heterocigoto); uso actual de cualquier fármaco que interfiera con la hemostasia (incluyendo heparina/LMWH, medicamentos anticoagulantes orales, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), compuestos y antagonistas de la vitamina K); hipertensión esencial con terapia en curso; VIH o hepatitis aguda con tratamiento en curso; antecedentes

conocidos de alergia a la heparina estándar y/o heparina LMWH; antecedentes de trombocitopenia inducida por heparina (conteo de plaquetas $\leq 100,000$); abuso actual de fármacos o alcohol que, en opinión del investigador, debería impedir la participación en el estudio; no apto para participar en el estudio de acuerdo con la opinión del investigador debido a una enfermedad concurrente o afección grave de órganos;

5 participación actual en otros estudios de tratamiento médico intervencionista; miedo a las agujas que el investigador cree que afectan el cumplimiento de la medicación del estudio; edema pulmonar severo; trombocitopenia idiopática; enfermedad renal crónica; trastornos hepáticos crónicos; lupus eritematoso sistémico; y/o síndrome antifosfolípido.

Métodos y procedimientos para el grupo de tratamiento con tafoxiparina

I. Durante la selección

Un sujeto que se encuentre entre la semana 26 y la semana 32 (inclusive) de gestación, que haya sido diagnosticada con preeclampsia, cumpla con todos los criterios de inclusión y sin criterios de exclusión, examen físico que incluya signos vitales, historial médico y haya firmado el formulario "Consentimiento Informado" es elegible para el estudio. Los sujetos se someterán a las siguientes actividades: Consentimiento

15 informado; criterios de inclusión y exclusión; examen físico que incluya signos vitales, altura y peso; Historial médico; registro de la Presión Arterial (PA) de acuerdo con las instrucciones; registro CTG; Muestra de sangre para hematología y química clínica.

II. En el inicio del estudio

Previo al tratamiento los sujetos se someterán a las siguientes actividades: Criterios de inclusión y exclusión; Examen físico; Medición de la presión arterial de acuerdo a las instrucciones; Registro CTG; Ultrasonido fetal y flujo sanguíneo del cordón umbilical y flujo sanguíneo de la arteria uterina materna; Muestras de sangre para biomarcadores de preeclampsia; y Registro PWV. A partir del cual, las mujeres se asignarán aleatoriamente al tratamiento del estudio y se administrará el primer tratamiento del estudio.

III Durante el tratamiento

El producto en investigación será administrado por vía subcutánea cada 24 ± 3 horas por el personal del sitio. El tratamiento diario del estudio será de 300 mg (2 x 1 ml) de tafoxiparina por vía subcutánea (SC) durante 4 semanas, a menos que exista una indicación clínica para la interrupción o continuación del tratamiento. A todos los sujetos se les dará un tratamiento normal para la preeclampsia, incluyendo ASA 150 mg de OD y el tratamiento antihipertensivo de acuerdo con la práctica clínica.

Si la preeclampsia empeora durante o después del final de las 4 semanas de tratamiento, se tratará al sujeto de acuerdo con la práctica clínica. Si la preeclampsia mejora durante las cuatro semanas de tratamiento con tafoxiparina, el tratamiento se puede continuar fuera del protocolo principal hasta el parto. Si esto ocurre, se debe registrar en el eCRF.

Durante el período de tratamiento, se realizará y registrará lo siguiente: medición diaria de la presión

35 arterial; registro CTG; ultrasonido fetal, flujo sanguíneo del cordón umbilical y flujo sanguíneo de la arteria uterina materna los días 7, 14, 21 y 28; Muestras de sangre para hematología y química clínica a los días 7, 14, 21 y 28 de tratamiento; se tomarán muestras de sangre para biomarcadores de preeclampsia a los días 2, 7, 14, 21 y 28 de tratamiento; Registros de PWV después de 2, 7, 14 y 28 días de tratamiento; rendimiento cardíaco a los 2, 7, 14, 21 y 28 días de tratamiento; control diario para cumplimiento del tratamiento;

documentación del tratamiento antihipertensivo a los 2, 7, 14, 21 y 28 días de tratamiento; revisión AE/SAE; en el día 5 después de administrar la quinta dosis, se debe tomar una muestra de sangre para hematología incluyendo conteo de trombocitos, y analizar y revisarla antes de administrar la sexta dosis; y Registro de medicación concomitante.

5 **IV. Después de la administración**

Se realizarán las siguientes actividades en el hospital: Medición de la presión arterial; muestras de sangre para hematología y química clínica; Documentación del tratamiento antihipertensivo; Documentación del estado del bebé; revisión AE/SAE; y medicación concomitante.

V. Al alta

10 Las siguientes actividades se realizarán en el hospital: medición de la presión arterial de acuerdo con las instrucciones; medición de PWV; Registro del rendimiento cardiaco; Documentación del estado del bebé; Registro de tratamiento antihipertensivo; revisión AE/SAE; y medicación concomitante.

VI. Seguimiento

15 Se realizará un control de seguimiento en la clínica del hospital 8 semanas ($\pm$ 1 semana) después de la descarga donde se realizarán las siguientes investigaciones: Medición de la presión arterial; Muestras de sangre para hematología y química clínica; Medición de PWV; Rendimiento cardiaco; Documentación del estado del bebé; Registro de tratamientos antihipertensivos; Revisión AE/SAE; y Medicación concomitante.

Los sujetos del grupo de control se someterán a los mismos procedimientos listados anteriormente como los sujetos del grupo de tratamiento, aparte del tratamiento con tafoxiparina.