

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 250**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2008 E 08725114 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2121767**

54 Título: **Métodos de procedimiento de purificación de fucoidano a partir de extractos de algas marinas**

30 Prioridad:

23.02.2007 US 891287 P

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

14.07.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

SHAKLEE, PATRICK N.;
BAHR-DAVIDSON, JENNIFER;
PRASAD, SRINIVASA y
JOHNSON, KIRK

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 476 250 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 de procedimiento de purificación de fucoidano a partir de extractos de algas marinas

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere generalmente a la producción de fucoidano (también llamado AV513 en el presente documento). Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos de purificación de extracto de fucoidano para eliminar iones de metales pesados, contaminantes bacterianos y de endotoxinas y otras impurezas sin afectar la actividad biológica deseada.

ANTECEDENTES

La coagulación normal de la sangre es un proceso fisiológico y bioquímico complejo que está regulado en varios niveles. El proceso de la coagulación de la sangre implica la activación de una cascada de factores de coagulación que conduce a la formación de fibrina y a la agregación de plaquetas, junto con vasoconstricción local (revisado por Davie y col., *Biochemistry* 30:10363, 1991). La cascada de coagulación está compuesta por una ruta "extrínseca" que se cree que es el medio principal del inicio de la coagulación normal y una ruta "intrínseca" que contribuye a una respuesta de la coagulación ampliada. La respuesta normal a una lesión de agresión hemorrágica implica la activación de la ruta extrínseca. La activación de la ruta extrínseca se inicia cuando la sangre se pone en contacto con factor tisular (TF), un cofactor para el factor VII que se expone o expresa en tejidos tras la agresión. El TF forma un complejo con FVII que facilita la producción de FVIIa. A continuación FVIIa se asocia con TF para convertir FX en la serina proteasa FXa, que es un componente crítico del complejo de protrombinasa. La conversión de protrombina en trombina por el complejo de FXa/FVa/calcio/fosfolípido estimula la formación de fibrina y la activación de plaquetas, siendo todo esencial para la coagulación normal de la sangre. La hemostasia normal se potencia adicionalmente por los factores IXa y VIIIa de la ruta intrínseca, que también convierten FX en FXa. Véase también Weitz, J. I. y col., *Chest*, 126 (3), septiembre de 2004 (Supl), 265S.

Los polisacáridos sulfatados son una clase de moléculas caracterizadas por una pléthora de actividades biológicas con perfiles de tolerabilidad frecuentemente favorables en animales y seres humanos. Estas moléculas polianiónicas se derivan frecuentemente de tejidos de plantas y animales y engloban una amplia variedad de subclases que incluyen heparinas, glucosaminoglicanos, fucoidanos, carrageninas, polisulfatos de pentosano y sulfatos de dermatano o dextrano. Los polisacáridos sulfatados similares a heparina presentan actividad anticoagulante diferencial mediada mediante interacciones de antitrombina III y/o cofactor II de heparina (Toida TC, Linhardt, R.J., *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 2003; 15:29-46).

Aunque un polisacárido sulfatado tal, la heparina oral, se ha considerado para el desarrollo como anticoagulante (A Dunn, *Idrugs*, 3:817-824, 2000), la heparina es inadecuada debido a sus graves complicaciones que incluyen hemorragias intraoperatorias y postoperatorias, osteoporosis, alopecia, resistencia a heparina, rebote de heparina, trombocitopenia inducida por heparina (TIH), síndrome de trombocitopenia-trombosis inducida por heparina (STTIH) y otras desventajas que incluyen múltiples días para atenuar la anticoagulación después de retirar el fármaco (Iqbal O y col., *Fareed J, Expert Opin Emerg Drugs* 6:111-135, 2001; Roberts, HR, *Anesthesiology* 100:722-730, 2004). La heparina se administra convencionalmente parenteralmente y posee un nivel de captación oral de solo aproximadamente el 1 % (Fitton, J.H., *Glycoscience, The Nutrition Science Site*, modificado el 1 de enero de 2005).

A diferencia de la heparina, se ha mostrado que otro polisacárido sulfatado, el fucoidano, un polisacárido sulfatado aislado de una alga marina, regula (es decir, promueve) la coagulación (publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/0282771). Específicamente, los fucoidanos, cuando se administran a bajas concentraciones *in vitro*, o bajas dosis subcutáneas *in vivo*, proporcionan coagulación mejorada (acelerada) en casos de hemofilia mediante la activación de la ruta extrínseca (Liu, T. y col. y Johnson, K.W., *Thrombosis and Haemostasis*, 95:68-76, 2006), demostrando una actividad pro-coagulante. A mayores dosis el fucoidano puede tener un efecto anticoagulante similar a la heparina. En vista de los problemas asociados a los presentes anticoagulantes como la heparina o la warfarina, sigue existiendo claramente una necesidad de agentes, tales como fucoidano, que puedan vencer uno o más de los problemas asociados a la terapia anticoagulante actualmente disponible.

Así, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento mejorado para producir rentable y eficazmente extracto enriquecido en fucoidano con actividad óptima para uso terapéutico procoagulante o anticoagulante.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de un procedimiento de purificación de fucoidano a partir de extracto de algas marinas. El procedimiento proporciona altos rendimientos de fucoidano sustancialmente libre de iones de metales pesados, contaminantes bacterianos y de endotoxinas y otras impurezas.

Por consiguiente, la invención objeto incluye un procedimiento de enriquecimiento de fucoidano de una mezcla heterogénea, comprendiendo el procedimiento:

- (a) proporcionar una fuente de fucoidano;
- 5 (b) eliminar iones de metales pesados de dicha fuente tratando con un agente quelante para producir una primera mezcla de fucoidano;
- (c) precipitar selectivamente el fucoidano presente en dicha primera mezcla de fucoidano para eliminar contaminantes;
- 10 (d) resuspender el precipitado que contiene fucoidano en disolución acuosa para producir una segunda mezcla de fucoidano;
- (e) repetir las etapas (c) y (d) una o más veces; y
- 15 (f) filtrar la disolución acuosa que comprende fucoidano para eliminar contaminantes bacterianos y de endotoxinas para dar extracto de fucoidano purificado.

En una realización, el fucoidano posee del 5 al 25 por ciento en peso de azufre. En otra realización, el fucoidano es de origen algal. En una realización preferida, el fucoidano se deriva del género *Fucus* o *Laminaria*. Fucoidanos a modo de ejemplo son aquellos derivados de *Fucus vesiculosus* o de *Laminaria japonica* u otras fuentes que incluyen, pero no se limitan a, *Undaria pinnatifida* y *Ascophyllum nodosum*.

En ciertas realizaciones, el agente quelante está seleccionado del grupo que consiste en ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), acético etilenglicol-bis-(beta-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraácido (EGTA), ácido 2,3-dimercaptopropanol-1-sulfónico (DMPS) y ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA). En una realización preferida, el agente quelante es EDTA. En ciertas realizaciones, el agente quelante se inmoviliza sobre un soporte sólido. En una realización, el agente quelante es una resina quelante de iminodiacetato.

En ciertas realizaciones, el fucoidano se precipita selectivamente una o más veces con etanol, en las que la concentración de etanol en la mezcla de fucoidano es de aproximadamente el 40 % al 50 % (v/v). En ciertas realizaciones, el pH se mantiene entre aproximadamente pH 5,7 y aproximadamente pH 6,0. En una realización preferida, el pH se ajusta a aproximadamente pH 5,95. En ciertas realizaciones se añade NaCl a la mezcla de fucoidano a una concentración de aproximadamente 20-24 g/litro.

En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona una composición que comprende fucoidano producido por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En una realización, el fucoidano posee del 5 al 25 por ciento en peso de azufre. En otra realización, el fucoidano es de origen algal. En una realización preferida, el fucoidano se deriva del género *Fucus* o *Laminaria*. Fucoidanos a modo de ejemplo son aquellos derivados de *Fucus vesiculosus* o de *Laminaria japonica* o de *Chorda filum*, *Cladosiphon okamuranus*, *Undaria pinnatifida*, *Leathesia difformis*, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia kurome*, *Pelvetia fastigiata*, *Saundersella simplex*, *Chordaria flagelliformis*, o cualquier otra especie de planta o animal marino que contenga fucoidano. En una realización preferida, el fucoidano es biológicamente activo, por ejemplo, teniendo actividad pro-coagulante. En ciertas realizaciones, la composición puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para tratar un sujeto en necesidad de coagulación de la sangre potenciada que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende fucoidano, producida por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, a dicho sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un trastorno hemorrágico seleccionado del grupo que consiste en un trastorno hemorrágico crónico o agudo, un trastorno de la coagulación congénito producido por una deficiencia de factores de la sangre y un trastorno de la coagulación adquirido. En otras realizaciones, la causa de la necesidad de coagulación de la sangre potenciada es antes de la administración de un anticoagulante, cirugía, u otro procedimiento invasivo. En ciertas realizaciones, el fucoidano se administra a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

Estas y otras realizaciones de la invención objeto se producirán fácilmente para aquellos expertos en la materia en vista de la divulgación en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60 La Figura 1 muestra el efecto del procesamiento sobre la actividad del fucoidano (AV513) en un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT).

La Figura 2 muestra el efecto del procesamiento sobre la actividad de fucoidano en un ensayo de tiempo de protrombina diluido (dPT).

65 La Figura 3 muestra un análisis de tromboelastógrafo (TEG) del efecto del procesamiento sobre la actividad de

fucoidano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química de proteínas, bioquímica, biología molecular y farmacología, dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Protein Purification Proteins: A Practical Approach (E.L.V. Harris y S. Angal, Eds., 1989); Protein Purification Applications: A Practical Approach (E.L.V. Harris y S. Angal, Eds., 1990); T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman y Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edición actual); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Morrison y Boyd, Organic Chemistry (Allyn y Bacon, Inc., edición actual); J. March, Advanced Organic Chemistry (McGraw Hill, edición actual); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Ed., 20ª ed.; y Goodman & Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics, J. Griffith Hardman, L. L. Limbird, A. Gilman, 10ª ed.

15

Las siguientes abreviaturas de aminoácidos se usan en todo el texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

1. DEFINICIONES

20 En la descripción de la presente invención se emplearán los siguientes términos y pretenden definirse como se indica a continuación.

25 Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias en plural, a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, referencia a “fucoidano” incluye una mezcla de dos o más de tales fucoidanos y similares.

25

Como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” significa \pm aproximadamente el 10 % del valor que modifica.

30 El término “biológicamente activo” se refiere a una proteína que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de una molécula que se produce naturalmente.

35 El término “fucoidano”, como se usa en el presente documento, se refiere a un alfa-L-fucano sulfatado encontrado en muchas plantas y animales marinos. El fucoidano es particularmente abundante en las paredes celulares de algas marrones e incluye fucoidanos derivados del género *Fucus* (por ejemplo, *Fucus vesiculosus*, *Fucus evanescens*, *Fucus distichus* y *Fucus serratus*) o *Laminaria* (por ejemplo, *Laminaria japonica*, *Laminaria religiosa* y *Laminaria abyssalis*). El fucoidano también incluye fucoidanos derivados de *Chorda filum*, *Cladosiphon okamuranus*, *Undaria pinnatifida*, *Leathesia difformis*, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia kurome*, *Pelvetia fastigiata*, *Saundersella simplex*, *Chordaria flagelliformis*, o cualquier otra especie de planta o animal marino que contenga fucoidano. Además, el término fucoidano incluye fragmentos biológicamente activos, derivados o análogos de los mismos. El fucoidano puede incluir fragmentos de fucoidano generados por degradación (por ejemplo, hidrólisis) de moléculas de fucoidano mayores. La degradación puede lograrse por cualquiera de una diversidad de medios conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen tratamiento de fucoidano con ácido, base, calor, o enzimas para dar fucoidano degradado. Los fucoidanos también pueden alterarse químicamente y pueden tener modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, sulfatación, polisulfatación, acetilación, esterificación y metilación.

45

“Sustancialmente purificado” generalmente se refiere al aislamiento de una sustancia (por ejemplo, fucoidano) de forma que la sustancia comprenda la mayoría del porcentaje de la muestra en la que reside. Normalmente, en una muestra, un componente sustancialmente purificado comprende el 50 %, preferentemente el 80 %-85 %, más preferentemente el 90-95 % de la muestra.

50

Una composición que contiene A está “sustancialmente libre de” B cuando al menos aproximadamente el 80 % en peso de A+B total en la composición es A. Preferentemente, A comprende al menos aproximadamente del 85 % al 95% en peso del total de A+B en la composición.

55 Un “anticoagulante”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente que puede prevenir o ralentizar la formación de coágulos.

Un “procoagulante”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente capaz de acelerar la formación de coágulos.

5 Un “agente quelante”, como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico, péptido o proteína que puede unirse a un metal. Ejemplos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis-(beta-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido 2,3-dimercaptopropanol-1-sulfónico (DMPS) y ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y similares. El agente quelante puede inmovilizarse sobre un soporte sólido (por ejemplo, resina quelante de iminodiacetato).

10 El término “derivado de” se usa en el presente documento para identificar la fuente original de una molécula, pero no pretende limitar el procedimiento por el que se prepara la molécula que puede ser, por ejemplo, por síntesis química o medios recombinantes.

15 Por “derivado” está prevista cualquier modificación adecuada de la molécula de referencia de interés o de un análogo de la misma, tal como sulfatación, acetilación, glucosilación, fosforilación, conjugación de polímeros (tal como con polietilenglicol), u otra adición de restos extraños, mientras que se conserve la actividad biológica deseada (por ejemplo, actividad de coagulación) de la molécula de referencia. El fucoídano puede alterarse químicamente, por ejemplo, para mejorar la función procoagulante. Tales modificaciones pueden incluir, pero no se limitan a, sulfatación, polisulfatación, esterificación y metilación. Procedimientos de preparación de análogos y derivados están generalmente disponibles en la materia.

25 Por “fragmento” está prevista una molécula que consiste en solo una parte de la secuencia y estructura de longitud completa intacta. Un fragmento de un fucoídano puede generarse por degradación (por ejemplo, hidrólisis) de un polisacárido de fucoídano mayor. Fragmentos activos de fucoídano incluirán generalmente al menos aproximadamente 2-20 unidades de sacáridos del polisacárido de longitud completa, preferentemente al menos aproximadamente 5-10 unidades de sacárido de la molécula de longitud completa, o cualquier número entero entre 2 unidades de sacárido y la molécula de longitud completa, a condición de que el fragmento en cuestión retenga la actividad biológica, tal como actividad procoagulante.

30 “Excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente que puede incluirse opcionalmente en las composiciones de la invención y que no produce efectos toxicológicos adversos significativos al paciente.

35 “Sal farmacéuticamente aceptable” incluye, pero no se limita a, sales de aminoácidos, sales preparadas con ácidos inorgánicos, tales como sales de cloruro, sulfato, fosfato, difosfato, bromhidrato y nitrato, o sales preparadas con un ácido orgánico, tal como malato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, etilsuccinato, citrato, acetato, lactato, metanosulfonato, benzoato, ascorbato, para-toluenosulfonato, pamoato, salicilato y estearato, además de sales de estolato, gluceptato y lactobionato. Similarmente, sales que contienen cationes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sodio, potasio, calcio, aluminio, litio y amonio (incluyendo amonio sustituido).

40 “Molécula activa” o “agente activo” como se describen en el presente documento incluyen cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de materia o mezcla que proporcione algún efecto farmacológico, frecuentemente beneficioso, que pueda demostrarse *in vivo* o *in vitro*. Esto incluye alimentos, suplementos alimenticios, nutrientes, nutracéuticos, fármacos, vacunas, anticuerpos, vitaminas y otros agentes beneficiosos. Como se usa en el presente documento, los términos incluyen adicionalmente cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produzca un efecto localizado o sistémico en un paciente.

50 “Opcional” u “opcionalmente” significa que la circunstancia posteriormente descrita puede o puede no producirse, de manera que la descripción incluye casos en los que la circunstancia se produce y casos en los que no.

Los términos “sujeto”, “individuo” o “paciente” se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un vertebrado, preferentemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, roedores, simios, seres humanos, animales de granja, animales para deportes y mascotas.

55 2. MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

60 Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que la presente invención no se limita a formulaciones o parámetros de procedimiento particulares ya que tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares de la invención solo y no pretende ser limitante.

Aunque varios procedimientos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica de la presente invención, los materiales y procedimientos preferidos se describen en el presente documento.

65 A. Producción de fucoídano

La presente invención se basa en el descubrimiento de un procedimiento de purificación que permite el aislamiento de fucoidano sustancialmente libre de iones de metales pesados, contaminantes bacterianos y de endotoxinas y otras impurezas. El procedimiento comprende una serie de etapas de aislamiento, que incluyen tratamiento con un agente quelante para eliminar metales pesados, una o más precipitaciones selectivas para eliminar impurezas y filtración para eliminar contaminantes bacterianos y de endotoxinas.

Con el fin de entender adicionalmente la invención, a continuación se proporciona una discusión más detallada referente a los procedimientos de purificación de extractos de fucoidano.

Fucoidano

Puede usarse cualquier fuente de extracto de fucoidano en la purificación. Los fucoidanos se encuentran en muchas plantas y animales marinos y son particularmente abundantes en las paredes celulares de algas marrones (*Phaeophyceae*). Por ejemplo, el fucoidano derivado de algas marrones del género *Fucus* (por ejemplo, *Fucus vesiculosus*, *Fucus evanescens*, *Fucus distichus* y *Fucus serratus*) o *Laminaria* (por ejemplo, *Laminaria japonica*, *Laminaria religiosa* y *Laminaria abyssalis*) puede usarse en la purificación. Alternativamente, el fucoidano de otras fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, *Chorda filum*, *Cladosiphon okamuranus*, *Undaria pinnatifida*, *Leathesia difformis*, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia kurome*, *Pelvetia fastigiata*, *Saundersella simplex*, *Chordaria flagelliformis*, o cualquier otra especie de planta o animal marino que contenga fucoidano también puede usarse en la práctica de la invención.

Agentes quelantes

Cualquier agente quelante que pueda unirse a iones metálicos puede usarse para eliminar contaminantes de iones metálicos de una mezcla heterogénea que contiene fucoidano. Ejemplos de agentes quelantes incluyen, pero no se limitan a, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis-(beta-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido 2,3-dimercaptopropanol-1-sulfónico (DMPS) y ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y similares. Alternativamente, una resina quelante de metales que comprende grupos quelantes inmovilizados puede usarse para eliminar iones metálicos de una muestra que contiene fucoidano. Por ejemplo, pueden usarse resinas quelantes comercialmente disponibles que contienen el ligando quelante iminodiacetato (por ejemplo, CHELEX 100 (Bio-Rad), DOWEX A1 (Dow Chemical Co.) y resina quelante (Hampton Research)). La resina quelante puede añadirse a una muestra de fucoidano en lote y eliminarse por centrifugación. Alternativamente, los iones metálicos pueden eliminarse a partir de muestras de fucoidano por cromatografía a través de una columna que contiene resina quelante mediante procedimientos muy conocidos en la técnica.

Precipitación selectiva de fucoidano

El extracto de fucoidano se purifica adicionalmente por precipitación selectiva de fucoidano con etanol. La precipitación selectiva elimina algunos agentes quelantes y otros contaminantes de la mezcla de fucoidano. En ciertas realizaciones, el fucoidano se precipita selectivamente una o más veces con etanol a una concentración de aproximadamente el 40 % al 50 % (v/v) en la mezcla de fucoidano. Antes de la adición de etanol a la mezcla de fucoidano, el pH de la mezcla de fucoidano se ajusta a entre aproximadamente pH 5,7 y aproximadamente pH 6,0 y se añade NaCl a la mezcla de fucoidano a una concentración de aproximadamente 20-24 g/litro. Después de la precipitación del fucoidano, el sobrenadante se elimina del fucoidano precipitado y el fucoidano precipitado se resuspende en disolución acuosa. Ciclos repetidos de tal purificación pueden mejorar la pureza del fucoidano.

Filtración

El fucoidano se filtra a través de un filtro positivamente cargado de 0,2 µm para eliminar contaminantes bacterianos y de endotoxinas. El producto filtrado puede secarse usando liofilización o secado por pulverización. Normalmente, el rendimiento del fucoidano será de aproximadamente el 50 % o más, más preferentemente de aproximadamente el 60 % a aproximadamente 80 % o más.

Análisis de fucoidano purificado

Las muestras de fucoidano pueden analizarse para pureza y diversas propiedades, tales como peso molecular, contenido de hidratos de carbono, que incluyen fucosa y xilosa, contaminación con metales pesados, sulfato y agua. Pueden usarse varias técnicas analíticas para caracterizar muestras de fucoidano, que incluyen pero no se limitan a, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), análisis de composición elemental, dispersión de luz láser (DLL), espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-EM) y CG-EM.

B Composiciones farmacéuticas

El fucoidano purificado puede formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Excipientes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, hidratos de carbono,

sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos. Excipientes adecuados para composiciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina, aceites vegetales, fosfolípidos y tensioactivos. Un hidrato de carbono tal como un azúcar, un azúcar derivatizado tal como un

5 Excipientes de hidrato de carbono específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditos tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosilsorbitol, mioinositol y similares. El excipiente también puede incluir una sal inorgánica o tampón tal como ácido cítrico, cloruro sódico, cloruro de potasio, sulfato de

10 sodio, nitrato de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y combinaciones de los mismos.

Una composición también puede incluir un agente antimicrobiano para prevenir o impedir el crecimiento microbiano. Ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timerosal y combinaciones de los mismos.

15

Un antioxidante también puede estar presente en la composición. Los antioxidantes se usan para evitar la oxidación, evitando así el deterioro del fucoidano u otros componentes de la preparación. Antioxidantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monoglicérol, galato de propilo, bisulfito de sodio, sulfoxilato formaldehído sódico, metabisulfito de sodio y combinaciones de los mismos.

20

Un tensioactivo puede estar presente como excipiente. Tensioactivos a modo de ejemplo incluyen: polisorbatos tales como "Tween 20" y "Tween 80," y Pluronicos tales como F68 y F88 (BASF, Mount Olive, Nueva Jersey); ésteres de sorbitano; lípidos tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferentemente no en forma liposómica), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides tales como colesterol; agentes quelantes tales como EDTA; y cinc y tales otros cationes adecuados.

25

Los ácidos o bases pueden estar presentes como excipiente en la composición. Ejemplos no limitantes de ácidos que pueden usarse incluyen aquellos ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos. Ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido sódico, acetato sódico, hidróxido de amonio, hidróxido potásico, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumerato de potasio y combinaciones de los mismos.

30

La cantidad de fucoidano (por ejemplo, cuando está contenido en un sistema de administración de fármaco) en la composición variará dependiendo de varios factores, pero será óptimamente una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición esté en una forma de dosificación unitaria o recipiente (por ejemplo, un vial). Una dosis terapéuticamente eficaz puede determinarse experimentalmente por administración repetida de cantidades crecientes de la composición con el fin de determinar qué cantidad produce un criterio de valoración clínicamente deseado.

40

La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la naturaleza y función del excipiente y de las necesidades particulares de la composición. Normalmente, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina mediante experimentación rutinaria, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan de bajas a altas), examinando la estabilidad y otros parámetros y luego determinando el intervalo al que se obtiene rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos. Generalmente, sin embargo, el (los) excipiente(s) estará(n) presente(s) en la composición en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 99 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 98 % en peso, más preferentemente de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 95 % en peso del excipiente, siendo las más preferidas concentraciones inferiores al 30 % en peso. Estos excipientes farmacéuticos anteriores, junto con otros excipientes, se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams (1995), la "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998) y Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

45

Las composiciones engloban todos los tipos de formulaciones y en particular aquellas que son aptas para inyección, por ejemplo, polvos o liofilizados que pueden reconstituirse con un disolvente antes de uso, además de disoluciones o suspensiones listas para inyección, composiciones insolubles secas para combinación con un vehículo antes de uso y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de administración. Ejemplos de diluyentes adecuados para la reconstitución de composiciones sólidas antes de la inyección incluyen agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5 % en agua, solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada y combinaciones de las mismas. Con respecto a las composiciones farmacéuticas líquidas, se prevén disoluciones y suspensiones. Composiciones preferidas adicionales incluyen aquellas para administración oral, ocular o localizada.

60

Las preparaciones farmacéuticas en el presente documento también puede estar alojadas en una jeringuilla, un dispositivo de implantación, o similares, dependiendo del modo previsto de administración y uso. Preferentemente, las

65

composiciones de fucoidano en el presente documento se describen en forma de dosificación unitaria, que significa una cantidad de un conjugado o composición apropiado para una dosis única, en una forma previamente medida o previamente envasada.

- 5 Las composiciones de fucoidano en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más agentes adicionales, tales como agentes hemostáticos, factores de la sangre, u otras medicaciones usadas para tratar un sujeto para una afección o enfermedad. Particularmente se prefieren preparaciones combinadas que incluyen uno o más factores de la sangre tales como factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. Las composiciones de fucoidano también pueden incluir otros procoagulantes, tales como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, que incluyen, pero no se limitan a, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y quinínogeno de alto peso molecular; o y activador de la ruta de coagulación intrínseca que incluye, pero no se limita a, factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa. Las composiciones de fucoidano pueden incluir factores de coagulación que se producen naturalmente, sintéticos o recombinantes, o fragmentos, variantes o derivados covalentemente modificados de los mismos que retienen la actividad biológica (es decir, promueven la coagulación). Alternativamente, tales agentes pueden estar contenidos en una composición separada del fucoidano y administrarse simultáneamente, antes o después de la composición de fucoidano.

C. Administración

- 20 Al menos un ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz con fucoidano se administrará a un sujeto. Por "ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz" está previsto un ciclo de tratamiento que cuando se administra, provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un individuo para un trastorno hemorrágico. Es de particular interés un ciclo de tratamiento con fucoidano que mejora la hemostasia. Por "respuesta terapéutica positiva" está previsto que el individuo que recibe tratamiento según la invención presente una mejora en uno o más síntomas de un trastorno hemorrágico, que incluye mejoras tales como tiempos de coagulación de la sangre acortados y hemorragia reducida y/o necesidad reducida de terapia de sustitución de factores.

- 30 Otro ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz con fucoidano se administrará como anticoagulante a sujetos con afecciones pro-trombóticas como trombosis venosa profunda, trombosis arterial y otras enfermedades cardiovasculares y de cáncer como terapia preventiva y/o de mantenimiento.

- 35 En ciertas realizaciones, se administrarán múltiples dosis terapéuticamente eficaces de composiciones que comprenden fucoidano y/o uno o varios de otros agentes terapéuticos, tales como agentes hemostáticos, factores de la sangre, u otras medicaciones. Las composiciones se administran normalmente, aunque no necesariamente, por vía oral, mediante inyección (subcutáneamente, intravenosamente o intramuscularmente), por infusión o localmente. La preparación farmacéutica puede estar en forma de una disolución líquida o suspensión inmediatamente antes de la administración, pero también puede tomar otra forma tal como un jarabe, crema, pomada, comprimido, cápsula, polvo, gel, matriz, supositorio, o similares. También se contemplan modos de administración adicionales, tales como pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosa, intratecal, pericárdica, intra-arterial, intracerebral, intraocular, intraperitoneal, etc. Las composiciones farmacéuticas que comprenden fucoidano y otros agentes pueden administrarse usando las mismas vías de administración o vías de administración diferentes según cualquier procedimiento médicamente aceptable conocido en la técnica.

- 45 En una realización particular, una composición se usa para administración localizada de fucoidano, por ejemplo, para el tratamiento de hemorragia como resultado de una lesión, herida o cirugía. Las preparaciones también son adecuadas para tratamiento local. Por ejemplo, el fucoidano puede administrarse mediante inyección en el sitio de hemorragia o tópicamente en forma de un sólido, líquido o pomada, preferentemente mediante un esparadrapo o un vendaje para heridas. También pueden usarse supositorios, cápsulas, en particular cápsulas resistentes a los jugos gástricos, gotas o sprays. La preparación particular y procedimiento apropiado de administración se eligen para ir dirigidos al sitio de hemorragia.

- 55 En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden fucoidano y/u otros agentes se administran profilácticamente, por ejemplo, antes de la cirugía planeada. Tales usos profilácticos serán de valor particular para sujetos con trastornos de la coagulación de la sangre preexistentes conocidos.

- 60 En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden fucoidano y/u otros agentes están en una formulación de liberación sostenida, o una formulación que se administra usando un dispositivo de liberación sostenida. Tales dispositivos son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, parches transdérmicos y bombas implantables en miniatura que pueden proporcionar la administración de fármacos con el tiempo en un modo en estado estacionario continuo, a una diversidad de dosis para lograr un efecto de liberación sostenida con una composición farmacéutica de liberación no sostenida.

- 65 La memoria descriptiva también proporciona un procedimiento de administración de un conjugado que comprende fucoidano como se proporciona en el presente documento a un paciente que padece una afección que es sensible al tratamiento con fucoidano contenido en el conjugado o composición. El procedimiento comprende administrar, mediante

cualquiera de los modos descritos en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz del sistema de administración de conjugado o fármaco, preferentemente proporcionado como parte de una composición farmacéutica. El procedimiento de administración puede usarse para tratar cualquier afección que sea sensible al tratamiento con fucoidano. Más específicamente, las composiciones en el presente documento son eficaces en el tratamiento de

5 trastornos hemorrágicos, que incluyen hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto tales como factor XI, factor XII, precalicreína y quininógeno de alto peso molecular (HMWK), una deficiencia de uno o más factores asociados a hemorragia clínicamente significativa, tales como factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y factor

10 de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, que incluye afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa₂-antiplasmina y sangrado excesivo tal como el producido por enfermedad del hígado, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo.

Aquellos expertos habituales en la materia apreciarán qué afecciones puede tratar eficazmente un fucoidano específico. La dosis real que va a administrarse variará dependiendo de la edad, peso y condición general del sujeto, además de la gravedad de la afección que está tratándose, el criterio del profesional sanitario y el conjugado que se administra. Las cantidades terapéuticamente eficaces pueden determinarse por aquellos expertos en la materia y se ajustarán a los requisitos particulares de cada caso particular.

20 Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará de aproximadamente 0,01 mg/kg a 200 mg/kg de un fucoidano al día, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a 20 mg/kg al día, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,02 mg/kg a 2 mg/kg al día. Preferentemente, tales dosis están en el intervalo de 0,01-50 mg/kg cuatro veces al día (QID), 0,01-10 mg/kg QID, 0,01-2 mg/kg QID, 0,01-0,2 mg/kg QID, 0,01-50 mg/kg tres veces al día (TID), 0,01-10 mg/kg TID, 0,01-2 mg/kg TID, 0,01-0,2 mg/kg TID, 0,01-100 mg/kg dos veces al día (BID), 0,01-10 mg/kg

25 BID, 0,01-2 mg/kg BID, o 0,01-0,2 mg/kg BID y 0,1 al 10 % para aplicaciones individuales y múltiples tópicos un día. La cantidad del compuesto administrado dependerá de la potencia del fucoidano específico y la magnitud o efecto procoagulante deseado y la vía de administración.

Un extracto de fucoidano purificado (de nuevo, se proporciona preferentemente como parte de una preparación farmacéutica) puede administrarse solo o en combinación con otros extractos de fucoidano o agentes terapéuticos, tales como agentes hemostáticos, factores de la sangre, u otras medicaciones usadas para tratar una afección o enfermedad particular según una variedad de programas de dosificación que dependen del criterio del profesional clínico, necesidades del paciente, etc. El programa de dosificación específico será conocido por aquellos expertos habituales en la materia o podrá determinarse experimentalmente usando procedimientos rutinarios. Programas de dosificación a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, administración cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes y cualquier combinación de los mismos. Composiciones preferidas son aquellas que requieren dosificación no superior a una vez al día.

40 El fucoidano puede administrarse antes de, simultáneamente a, o posteriormente a otros agentes. Si se proporciona al mismo tiempo que otros agentes, el fucoidano puede proporcionarse en la misma composición o en una composición diferente. Así, el fucoidano y otros agentes pueden presentarse al individuo a modo de terapia simultánea. Por "terapia simultánea" está prevista la administración a un sujeto de forma que el efecto terapéutico de la combinación de las sustancias sea provocado en el sujeto que recibe la terapia. Por ejemplo, la terapia simultánea puede lograrse administrando una dosis de una composición farmacéutica que comprende un fucoidano y una dosis de una composición farmacéutica que comprende al menos otro agente, tal como un agente hemostático o factor de coagulación (por ejemplo, FVIII o FIX), que en combinación comprenden una dosis terapéuticamente eficaz, según una pauta de dosificación particular. Similarmente, el fucoidano y uno o varios de otros agentes terapéuticos pueden administrarse en al menos una dosis terapéutica. La administración de las composiciones farmacéuticas separadas puede realizarse simultáneamente o en momentos diferentes (es decir, secuencialmente, en cualquier orden, el mismo día, o en días diferentes), mientras que el efecto terapéutico de la combinación de estas sustancias sea provocado en el sujeto que recibe la terapia.

55 F. Aplicaciones

Una vez purificado, el extracto de fucoidano puede usarse para una diversidad de fines. A este respecto, el fucoidano puede usarse, por ejemplo, como procoagulante para promover la coagulación de la sangre, reducir hemorragia, contrarrestar los efectos del tratamiento de un sujeto con un anticoagulante, como agente antiinflamatorio, como agente antineoplásico, como agente antiviral o como agente movilizador de células hematopoyéticas. La capacidad del extracto de fucoidano purificado para promover la coagulación y reducir la hemorragia se determina fácilmente usando diversos ensayos de coagulación *in vitro* (por ejemplo, ensayos de dPT y aPTT) y modelos de hemorragia *in vivo* (por ejemplo, determinación del tiempo de hemorragia de corte en la cola o de la cutícula en ratones o perros hemofílicos). Véanse, por ejemplo, PDR Staff. Physicians' Desk Reference. 2004, Anderson y col. (1976) *Thromb. Res.* 9:575-580; Nordfang y col. (1991) *Thromb Haemost.* 66:464-467; Welsch y col. (1991) *Thrombosis Research* 64:213-222; Broze y col. (2001) *Thromb Haemost* 85:747-748; Scallan y col. (2003) *Blood.* 102:2031-2037; Pijnappels y col. (1986) *Thromb. Haemost.* 55:70-73; y Giles y col. (1982) *Blood* 60:727-730.

En un aspecto, el extracto de fucoidano purificado puede usarse para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, particularmente aquellos asociados a deficiencias de los factores de coagulación o para invertir los efectos de anticoagulantes en un sujeto. El fucoidano puede administrarse a un sujeto para tratar trastornos hemorrágicos, que incluyen trastornos de la coagulación congénitos, trastornos de la coagulación adquiridos y afecciones hemorrágicas inducidas por traumatismo. Ejemplos de trastornos hemorrágicos que pueden tratarse con fucoidano incluyen, pero no se limitan a, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto tales como factor XI, factor XII, precalicreína y quininógeno de alto peso molecular (HMWK), una deficiencia de uno o más factores asociados a hemorragia clínicamente significativa tales como factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, que incluye afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa₂-antiplasmina y sangrado excesivo tal como el producido por enfermedad del hígado, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo. En ciertas realizaciones, el fucoidano se usa para tratar trastornos de la coagulación congénitos que incluyen hemofilia A, hemofilia B y enfermedad de von Willebrand. En otras realizaciones, el fucoidano se usa para tratar trastornos de la coagulación adquiridos que incluyen deficiencias del factor VIII, factor de von Willebrand, factor IX, factor V, factor XI, factor XII y factor XIII, particularmente trastornos producidos por inhibidores o autoinmunidad contra la coagulación de los factores de la sangre, o trastornos hemostáticos producidos por una enfermedad o afección que produce síntesis reducida de factores de coagulación.

Las necesidades del paciente dependerán del trastorno hemorrágico particular que esté tratándose. Por ejemplo, un fucoidano puede administrarse para tratar una afección crónica (por ejemplo, un deficiencia congénita o adquirida de factores de la coagulación) en múltiples dosis durante un periodo prolongado. Alternativamente, un fucoidano puede administrarse para tratar una afección aguda (por ejemplo, hemorragia producida por cirugía o traumatismo, o inhibidor de factores/episodios autoinmunitarios en sujetos que reciben terapia de sustitución de la coagulación) en dosis individuales o múltiples durante un periodo relativamente corto, por ejemplo, una a dos semanas. Además, la terapia con fucoidano puede usarse en combinación con otros agentes hemostáticos, factores de la sangre y medicaciones. Por ejemplo, al sujeto puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular (HMWK), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, que incluye factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y quininógeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, que incluye factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa. Además, la transfusión de hemoderivados puede ser necesaria para sustituir la pérdida de sangre en sujetos que experimentan sangrado excesivo y en casos de lesión, la reparación quirúrgica puede ser apropiada para detener la hemorragia.

La memoria descriptiva también proporciona un procedimiento para invertir los efectos de un anticoagulante en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende fucoidano purificado al sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto puede haber sido tratado con un anticoagulante que incluye, pero no se limita a, heparina, un derivado de cumarina, tal como warfarina o dicumarol, TFPI, AT III, anticoagulante de lúpulo, péptido anticoagulante de nematodos (NAPc2), factor VIIa bloqueado en sitios activos (factor VIIai), inhibidores del factor IXa, inhibidores del factor Xa, que incluyen fondaparinux, idraparinux, DX-9065a y razaxaban (DPC906), inhibidores de los factores Va y VIIIa, que incluyen proteína C activada (APC) y trombomodulina soluble, inhibidores de trombina, que incluyen hirudina, bivalirudina, argatroban y ximelagatran. En ciertas realizaciones, el anticoagulante en el sujeto puede ser un anticuerpo que se une a factor de coagulación que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo que se une al factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor XI, factor XII, factor de von Willebrand, precalicreína o quininógeno de alto peso molecular (HMWK).

En ciertas realizaciones, el extracto de fucoidano purificado puede administrarse solo o coadministrarse con uno o más fucoidanos diferentes y/o en combinación con uno o varios de otros agentes terapéuticos para invertir los efectos de un anticoagulante en el sujeto. Por ejemplo, al sujeto puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un fucoidano y uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular (HMWK), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, que incluye factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y quininógeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca, que incluye factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa.

En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para mejorar la coagulación en un sujeto que recibe un procedimiento quirúrgico o invasivo, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende fucoidano purificado al sujeto. En ciertas realizaciones, el fucoidano puede administrarse solo o coadministrarse con uno o más fucoidanos diferentes y/o en combinación con uno o varios de otros agentes terapéuticos al sujeto que experimenta un procedimiento quirúrgico o invasivo. Por ejemplo, al sujeto puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular (HMWK), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además

administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, que incluye factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y quinínogeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca que incluye factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa.

- 5 En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento de inhibición de la actividad de TFPI que comprende combinar una composición que comprende TFPI con una cantidad suficiente de un fucoidano para inhibir la actividad de TFPI. En ciertas realizaciones, la actividad de TFPI se inhibe en un sujeto mediante un procedimiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende extracto de fucoidano purificado al sujeto. En ciertas realizaciones, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de TFPI en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento combinar la muestra biológica (por ejemplo, sangre o plasma) con una cantidad suficiente de extracto de fucoidano purificado para inhibir la actividad de TFPI.

3. PARTE EXPERIMENTAL

- 15 A continuación están ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solo y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, debe permitirse algún error experimental y desviación.

20

Ejemplo 1

Purificación de fucoidano Ensayo 1

Día 1

- Se disolvió extracto de fucoidano (50 gramos, NPNutra, lote n.º 050316-FU-85) en 1.000 ml de agua de alta pureza (NERL, lote n.º 0808036) y se agitó durante 45 minutos a 40-45 °C en un baño de agua. La disolución estaba a un pH de 5,82 y una temperatura de 41 °C cuando se añadieron 2,5 gramos de EDTA disódico con agitación (2,5 % en peso de EDTA/peso del extracto de fucoidano de partida, lote de EDTA n.º 006139 de Fisher). El pH de la disolución disminuyó a 4,70 a medida que se disolvió el EDTA, pero luego se ajustó al alza a 6,02 con NaOH 0,1 M. A continuación la reacción se mezcló y se mantuvo durante 1 hora a 40-45 °C y pH 6,0 (± 0,2). Después de 1 hora se añadieron 24 gramos de cloruro sódico (2 % en peso/volumen, Fisher, lote n.º 010166) y se retiró la camisa de agua. A continuación, el pH se ajustó de pH 5,7 a 5,95 con NaOH 0,1 M. El fucoidano se precipitó mezclando aproximadamente un volumen de etanol absoluto (1,1 litros, Sigma-Aldrich, lote n.º 06563JE) y dejando que se produjera la precipitación durante la noche a temperatura ambiente.

Día 2

- 40 La disolución de sobrenadante se eliminó por aspiración del precipitado de polisacárido. A continuación el precipitado se redisolvió mediante la adición de 1 litro (1.000 ml) de agua de alta pureza a temperatura ambiente, seguido de 30-60 minutos de agitación vigorosa. Una vez el precipitado estaba en disolución, 20 gramos (2 % en peso/volumen) de cloruro sódico se disolvieron por mezcla continua de la disolución. El polisacárido precipitó de nuevo mezclando 800 ml de etanol absoluto con el precipitado resalinizado resolubilizado del día 1. De nuevo, el polisacárido se dejó precipitar durante la noche.

Día 3

- 50 La disolución de sobrenadante se eliminó de nuevo del precipitado del día 2 y en el día 3 se repitió el procedimiento entero de resolubilización (1.000 ml de agua NERL), resalinización (20 gramos de NaCl) y reprecipitación (800 ml de EtOH absoluto). El fucoidano se dejó de nuevo precipitar durante la noche.

Día 4

- 55 En el día 4, el sobrenadante se eliminó por aspiración del precipitado de polisacárido. A continuación el precipitado se disolvió mezclando con 900 ml de agua de alta pureza durante 1-1,5 horas a 22 °C. El pH, que se midió en 6,85, se ajustó a pH 5,8 mediante la adición de HCl 6 N. A continuación la disolución entera se filtró a través de una cápsula de filtración KLEENPAK N66 POSIDYNE de 0,2 µm (Pall, lote n.º IJ7287). A continuación, el matraz y el filtro se aclararon con aproximadamente 100 ml de agua de alta pureza, que luego se filtró a través del filtro POSIDYNE y se añadió a la disolución de polisacárido. A continuación la disolución filtrada entera (~1,05 litros) se cargó en una única bandeja del liofilizador y se congeló a -40 °C durante 3 horas. A continuación se realizó la liofilización durante las siguientes aproximadamente 48 horas con el siguiente programa: primeras 4 horas, temperatura del estante a 10 °C, siguientes 20 horas, temperatura del estante a 20 °C, 24 horas finales, temperatura del estante a 50 °C. A continuación el producto secado se retiró de la secadora y la bandeja y se colocó en un recipiente de plástico previamente tarado.

65

El rendimiento del producto fue 26,4 gramos (rendimiento del 52,8 % en peso). El producto se marcó como lote/ensayo I

y se colocó en bolsas de poli dobles para el almacenamiento.

Ejemplo 2

5 Purificación de fucoidano Ensayo 2

Día 1

10 Se disolvió extracto de fucoidano (50 gramos, NPNutra, lote n.º 050316-FU-85) en 1.000 ml de agua de alta pureza (NERL, lote n.º 0808036) por agitación durante 30-45 minutos a 40-45 °C en un baño de agua. La disolución estaba a un pH de 5,83 y una temperatura de 42,5 °C cuando se añadieron 1,25 gramos de EDTA disódico con agitación (1,25 % en peso de EDTA/peso del extracto de fucoidano, lote de EDTA n.º 006139 de Fisher). El pH de la disolución disminuyó a 4,90 a medida que se disolvió el EDTA, pero luego se ajustó al alza a 6,04 con NaOH 0,1 M. A continuación la reacción se mezcló y se mantuvo durante 1 hora a 40-45 °C y pH 6,0 ($\pm 0,2$). El pH de la disolución fue 6,15 al final de la incubación de 1 hora, ya que 22 gramos de cloruro sódico se mezclaron en la disolución. El pH disminuyó ligeramente a 55,72 pero a continuación se ajustó a 6,08 con NaOH 1 M. Se precipitó fucoidano mediante la adición de 1 litro (1.000 ml) de EtOH absoluto. El precipitado se dejó sedimentar a temperatura ambiente durante la noche.

Día 2

20 La disolución de sobrenadante se eliminó por aspiración del precipitado de polisacárido. A continuación el precipitado se redisolvió mediante la adición de 1 litro (1.000 ml) de agua de alta pureza a temperatura ambiente, seguido de 30-60 minutos de agitación vigorosa. Una vez el precipitado estaba en disolución, 20 gramos (2 % en peso/volumen) de cloruro sódico se disolvieron por mezcla continua de la disolución. El polisacárido precipitó de nuevo mezclando 750 ml de etanol absoluto con el precipitado resalinizado resolubilizado del día 1. De nuevo, el polisacárido se dejó precipitar durante la noche.

Día 3

30 La disolución de sobrenadante se eliminó de nuevo del precipitado del día 2 y en el día 3 se repitió el procedimiento entero de resolubilización (1.000 ml de agua NERL), resalinización (20 gramos de NaCl) y reprecipitación (750 ml de EtOH absoluto). El fucoidano se dejó de nuevo precipitar durante la noche.

Día 4

35 En el día 4, el sobrenadante se eliminó por aspiración del precipitado de polisacárido. A continuación el precipitado se disolvió mezclando con 900 ml de agua de alta pureza durante 1-2 horas a 22 °C. El pH, que se midió en 6,81, se ajustó a continuación a pH 5,82 mediante la adición de HCl 6 N. A continuación la disolución entera se filtró a través de una cápsula de filtración KLEENPAK N66 POSIDYNE de 0,2 μm (Pall, lote n.º IJ7287). A continuación el matraz y el filtro se aclararon con aproximadamente 100 ml de agua de alta pureza, que luego se filtró a través del filtro POSIDYNE y se añadió a la disolución de polisacárido. A continuación la disolución filtrada entera (~1,1 litros) se cargó en una única bandeja del liofilizador y se congeló a -40 °C durante 3 horas. A continuación se realizó la liofilización durante las siguientes aproximadamente 48 horas con el siguiente programa: primeras 4 horas, temperatura del estante a 10 °C, siguientes 20 horas, temperatura del estante a 20 °C, 24 horas finales, temperatura del estante a 50 °C. A continuación el producto secado se sacó de la secadora y la bandeja y se colocó en un recipiente de plástico previamente tarado.

El rendimiento del producto fue 25,4 gramos (rendimiento del 50,8 % en peso). El producto se marcó como lote/ensayo 2 y se colocó en bolsas de poli dobles para el almacenamiento.

50 Ejemplo 3

Análisis de muestras de fucoidano

55 Muestras de extractos de fucoidano purificados del Ensayo 1 (Ejemplo 1) y Ensayo 2 (Ejemplo 2) se caracterizaron y se compararon con extracto de fucoidano en bruto (NPNutra, lote n.º 050316-FU-85). Los análisis de las muestras se realizaron por Bay Bioanalytical Laboratory, Inc. (BBL, Hercules, CA). La caracterización de extractos de fucoidano incluyó cromatografía de exclusión por tamaño con detección de dispersión de luz láser (DLL), contenido de fucosa y xilosa, contenido de agua, metales pesados, sulfato y análisis elemental. La cromatografía de exclusión por tamaño con DLL se usó para medir el peso molecular promedio. La fucosa y xilosa se determinaron hidrolizando el fucoidano y midiendo el contenido de fucosa y xilosa por HPLC usando una columna diseñada para separar hidratos de carbono pequeños. El contenido de hidratos de carbono total también se estimó usando un ensayo de fenol-ácido sulfúrico con fucosa como el patrón. El contenido de agua se midió usando un ensayo de Karl Fischer (KF). El sulfato se midió por cromatografía de intercambio iónico y los cationes (principalmente sodio, potasio y otros metales pesados) se midieron por ICP-EM. Además, se realizó análisis de la composición elemental (CHNS) en muestras. El Centro de Investigación de Hidratos de Carbono Complejos (Universidad de Georgia, Athens, Georgia) realizó los análisis de monosacáridos mediante CG/EM tras la preparación de metilglucósidos per-O-trimetilsililados de la muestra. La endotoxina por LAL se

determinó en Avigen. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de los resultados de la caracterización de extractos de fucoidano

	NP Nutra 050316-FU-85 (MC514)	Ensayo procesado n.º 1 (AN50)	Ensayo procesado n.º 2 (AN51)
M _w	184.800	179.400	183.800
% en peso/peso de azúcares neutros por fenol-H ₂ SO ₄	52	73	65
Monosacárido (%)			
Fucosa	60,7	60,3	61,1
Xilosa	22,8	27,4	24,9
Glucosa	5,5	1,6	0,8
Galactosa	3,9	0,6	ND
Manosa	3,3	ND	4,0
Ácido galacturónico	2,4	2,2	3,1
Ácido glucarónico	1,4	ND	ND
Raminosa	ND	4,3	6,1
% de sulfato	11,6	16,9	15,5
% de agua por KF	8,4	9,2	9,0
Análisis elemental: % en peso/peso			
Carbono	30,4	27,7	25,5
Hidrógeno	4,7	4,0	3,2
Nitrógeno	0,7	0,2	0,3
Azufre	6,6	6,2	6,0
Cationes (los 8 principales): ppm			
Sodio	50000	75000	80000
Magnesio	8200	1200	1200
Calcio	6300	5400	6900
Potasio	4900	550	530
Hierro	370	60	102
Estroncio	310	460	480
Fosforo	160	27	30
Aluminio	43	27	40
Endotoxina (UE/mg)	88,6	38	40

5

Los análisis de muestras se describen en más detalle más adelante.

A. Dispersión de luz láser (DLL)

10 Los extractos de fucoidano se analizaron para peso molecular usando HPLC de exclusión de tamaño con detección por dispersión de luz láser (DLL) e índice de refracción (IR), como se describe en la publicación de BBL SOP-059, incorporada en el presente documento por referencia. Cada muestra se disolvió en la fase móvil a una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml. El dextrano obtenido de American Polymer Standards se usó como control del sistema. Se usaron la siguiente instrumentación y parámetros:

15

Instrumentación y parámetros

Fase móvil: Acetato de amonio 0,1 M
 Columna: Shodex OH pack SB-803 HQ 30 cm x 8 mm (con precolumna)
 Bomba: ASI Modelo 500
 Inyector: Inyector automático Varian 9010 equipado con bucle de 100 µl
 Detector de DLL: Sistema de dispersión de la luz de múltiples detectores Precision Detectors PD2020 (90° clásico)
 Detector de IR: Shodex RI SE-61
 Vol de inyección: 100 µl
 Velocidad de flujo: 1 ml/min
 Tiempo de análisis: 20 min
 Sistema de datos: Precision Discovery 32 v. 0.98.010

20

La calibración del instrumento se realizó usando NIST BSA lote 927c con un valor del índice de refracción diferencial (dn/dc) de 0,185 ml/g. Los cálculos para el peso molecular del control de dextrano se basaron en un dn/dc de 0,147 ml/g, como se informa por American Polymer Standards. Los cálculos de peso molecular de las muestras usaron un dn/dc de

0,137 ml/g, que se obtuvo del soporte técnico de Sigma. Se hicieron inyecciones individuales para cada muestra.

Los resultados de las medidas de peso molecular (MW) de las muestras de fucoidano se resumen en la Tabla 2.

5

Tabla 2. Peso molecular promedio en peso (M_w) por DLL

	NP Nutra 050316-FU- 85 (MC514)	Ensayo procesado n.º 1 (AN50)	Ensayo procesado n.º 2 (AN51)
M_w	184.800	179.400	183.800
% <10 kDa	4,7	<1	<1
% 10-50 kDa	22,3	18,7	19,4
% 50-100 kDa	13,0	13,0	11,3
% >100 kDa	60,0	68,3	69,3

Los resultados muestran una diferencia significativa en el peso molecular entre las tres muestras en bruto. En general, los valores de peso molecular pueden variar aproximadamente el 10 % dentro de un laboratorio.

10

B. Hidrólisis de fucoidano y medición de fucosa y xilosa por HPLC

Las muestras se disolvieron en HCl 2 M dando disoluciones de aproximadamente 10 mg/ml. Cinco alícuotas de 1 ml de cada muestra se incubaron a 60 °C en viales de vidrio de 4 ml durante diferentes periodos de tiempo. Un vial de cada muestra se sacó después de 2, 4, 6, 8 y 10 horas y se neutralizó mediante la adición de 1 ml de NaOH 2 M enfriado.

15

Las muestras se analizaron para contenido de fucosa y xilosa por HPLC con detección del índice de refracción. Se usaron L-fucosa (Sigma-Aldrich, lote n.º 105K058) y D-xilosa (Fluka, lote n.º 1118093) en agua como patrones para la cuantificación. Se usaron la siguiente instrumentación y parámetros:

20

Instrumentación y parámetros

Fase móvil:	Ácido sulfúrico 5 mM
Columna:	Bio-Rad Aminex HPX-78H, 300 mm x 7,8 mm (con precolumna)
Bomba:	ASI Modelo 500
Inyector:	Inyector automático Varian 9010 equipado con bucle de 20 μ l
Detector de RI:	Shodex RI SE-61
Vol. de inyección:	20 μ l
Velocidad de flujo:	0,8 ml/min
Tiempo de análisis:	18 min
Temperatura de la columna:	ambiente

El contenido de fucosa y xilosa en los tres extractos de fucoidano se determinó por HPLC tras la hidrólisis en HCl 2 N a 60 °C durante 22 horas. Los resultados se resumen en la Tabla 3A. Los valores de % en peso/peso en las tablas se han corregido para el aumento de agua durante la hidrólisis: ((164-18)/164) % en peso/peso de fucosa o ((150-18)/150) % en peso/peso de xilosa.

25

Tabla 3A. Contenido de fucosa y xilosa (60 °C, 22 horas)

	NP Nutra 050316-FU- 85 (MC514)	Ensayo procesado n.º 1 (AN50)	Ensayo procesado n.º 2 (AN51)
% en peso/peso de fucosa	11,1	8,6	8,7
% en peso/peso de xilosa	5,8	4,9	4,9

30

Estos valores son considerablemente inferiores a los esperados, lo que indica que probablemente no se completó la hidrólisis. Dos de las muestras se hidrolizaron con la concentración de muestra a 1 mg/ml en HCl 2 N a 100 °C durante 8 horas. Los resultados se resumen en la Tabla 3B.

35

Tabla 3B. Contenido de fucosa y xilosa (100 °C, 22 horas)

	NP Nutra 050316-FU- 85 (MC514)	Ensayo procesado n.º 1 (AN50)
% en peso/peso de fucosa	21,7	19,2
% en peso/peso de xilosa	5,3	5,5

Las muestras también se analizaron para azúcares neutros totales por el ensayo de fenol-ácido sulfúrico, un ensayo colorimétrico clásico. La fucosa se usó como patrón.

40

Estos resultados no se corrigieron para el aumento de agua durante la hidrólisis, por lo que son en algún porcentaje altos, pero próximos a los valores esperados. Los resultados se resumen en la Tabla 3C.

Tabla 3C. Ensayo de fenol-ácido sulfúrico de contenido de fucosa

	NP Nutra 050316-FU- 85 (MC514)	Ensayo procesado n.º 1 (AN50)	Ensayo procesado n.º 2 (AN51)
Azúcares neutros en % en peso/peso (patrón de fucosa)	46	65	58

5

C. Contenido de agua

El contenido de agua de cada extracto de fucoidano se determinó por ensayo de Karl Fischer (KF), según la publicación de BBL SOP-009 v6 "Ensayo del contenido de humedad por Karl Fischer de fármaco a granel usando extracción con metanol anhidro", incorporado en el presente documento por referencia. Para los ensayos de Karl Fischer, aproximadamente 15 mg de cada muestra se pesaron en un vial de inyector automático de 1,8 ml limpio. Las muestras se prepararon por triplicado. Se extrajo agua de las muestras inyectando aproximadamente 1 ml de metanol en los viales de muestra cerrados. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

10
15

Tabla 4. Contenido de agua

	NP Nutra 050316-FU-85 (MC514)	Lote procesado n.º 1 (AN50)	Lote procesado n.º 2 (AN51)
Ensayo 1	8,6	9,2	9,1
Ensayo 2	8,1	9,1	9,0
Ensayo 3	--	9,2	8,8
Promedio	8,4	9,2	9,0

Las unidades son % en peso/peso ((peso de agua/peso de muestra total)100).

D. Metales, análisis elemental y análisis de sulfato

20

Se realizó un cribado de metales pesados usando ICP-EM por West Coast Analytical Services, Inc. El azufre se determinó cuantitativamente por ICP-EM. El análisis del contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre (CHNS) también se realizó por West Coast Analytical Services usando un analizador elemental. También se determinó sulfato por cromatografía de iones en West Coast Analytical Services sobre muestras de fucoidano hidrolizadas en HCl 6 N durante 6 horas.

25

Los resultados de la determinación de sulfato por cromatografía iónica se muestran en la Tabla 5. Los valores de % en peso/peso en las tablas se han corregido para el aumento de agua durante la hidrólisis: ((96-16)/96) % en peso/peso de sulfato.

30

Tabla 5. Contenido de sulfato

	NP Nutra 050316-FU-85 (MC514)	Lote procesado n.º 1 (AN50)	Lote procesado n.º 2 (AN51)
% en peso/peso de sulfato	11,6	16,9	15,5

Los resultados del cribado de elementos por ICP-EM se muestran en las Tablas 6A y 6B. Los valores se informan en µg/g (ppm).

35

Tabla 6A. Elementos más abundantes

Metal	NP Nutra 050316-FU- 85 (MC514)	Lote procesado n.º 1 (AN50)	Lote procesado n.º 2 (AN51)
Sodio	50000	75000	80000
Magnesio	8200	1200	1200
Potasio	4900	550	530
Calcio	6300	5400	6900
Hierro	370	60	102
Estroncio	310	460	480
Fósforo	160	27	30
Aluminio	43	27	40
Manganeso	35	0,19	0,14
Bario	33	52	52
Titanio	15	11	15

Tabla 6B. Contaminantes traza

Metal	NP Nutra 050316-FU- 85 (MC514)	Lote procesado n.º 1 (AN50)	Lote procesado n.º 2 (AN51)
Arsénico	2,1	ND	ND
Bromo	9,5	ND	ND
Cerio	0,08	ND	ND
Cromo	12	7,2	8,2
Cobalto	0,49	ND	ND
Yodo	14	1,6	1,5
Plomo	0,18	ND	ND
Litio	0,64	ND	ND
Manganeso	35	0,19	0,14
Molibdeno	0,15	ND	ND
Níquel	3,8	0,65	0,63
Rubidio	2,2	0,33	0,29
Estaño	0,27	ND	ND
Tungsteno	0,11	ND	ND
Uranio	0,55	0,34	0,36
Vanadio	0,89	ND	ND

- 5 Los resultados del análisis de la composición elemental se muestran en las Tablas 7A y 7B. El análisis de la composición elemental puede compararse con la composición teórica, calculada para un residuo de fucoidano que contiene solo fucosa y un sulfato por fucosa como porcentaje en peso, por ejemplo, $C_6H_{12}O_5 + SO_3 - H_2O = C_6H_{10}O_7S$ (residuo de fucosa + 1 sulfato), véase la Tabla 7B. La composición elemental determinada para todos los lotes está muy de acuerdo con el valor teórico esperado con la excepción del azufre. Así, es poco probable que cada residuo de fucosa esté sulfatado. Los valores de azufre se correlacionan bien con el análisis de iones sulfato. Los valores de nitrógeno son bajos probablemente debido a otro material de no fucoidano extraído con el fucoidano.
- 10

Tabla 7A. Análisis elemental (% en peso/peso)

	NP Nutra 050316- FU- 85 (MC514)	Lote procesado n.º 1 (AN50)	Lote procesado n.º 2 (AN51)	Teórico
Carbono	30,4	27,7	25,5	31,9
Hidrógeno	4,7	4,0	3,2	4,4
Nitrógeno	0,7	0,2	0,3	0
Azufre	6,6	6,2	6,0	14,2

15

Tabla 7B. Balance másico de fucoidano

	NP Nutra 050316- FU- 85 (MC514)	Ensayo procesado n.º 1 (AN50)	Ensayo procesado n.º 2 (AN51)
Azúcares neutros (por fenol/H ₂ SO ₄ , corregido como residuo)	46	65	58
Agua (por KF)	8,4	9,2	9,0
Sulfato (corregido como residuo)	11,6	16,9	15,5
Cationes (Na+K+Mg+Ca)	5,5	8,2	8,9
Total	71,5	99,3	91,4

E. Composición de monosacáridos

- 20 La composición de monosacáridos se determinó por CG/EM en el Centro de Investigación de Hidratos de Carbono Complejos (Universidad de Georgia, Athens, Georgia). Se prepararon metilglucósidos a partir de 10 µg de muestra tratando con HCl 1 M en metanol (25 gotas) a 80 °C durante 15 h seguido de re-N-acetilación con piridina (5 gotas) y anhídrido acético (5 gotas) en metanol (20 gotas) a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación las muestras se per-O-trimetilsililaron por el tratamiento con Tri-Sil (10 gotas, Pierce) a 80 °C (15 minutos). Estos procedimientos se
- 25 llevaron a cabo como se describe previamente por Merkle y Poppe en Methods Enzymol. 1994, 230, 1-15 y York y col. en Methods Enzymol 1985, 118, 3-40. El análisis de CG/EM de los TMS-metilglucósidos se realizó en un CG HP 5890 con interfaz a un 5970 MSD, usando la columna DB-1 (30 m x 0,25 mm de DI). Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Análisis de monosacáridos

	Lote original (NP-051316)	Lote de ensayo n.º 1	Lote de ensayo n.º 2
Fucosa	60,7	60,3	61,1
Xilosa	22,8	27,4	24,9
Glucosa	5,5	1,6	0,8
Galactosa	3,9	0,6	ND
Manosa	3,3	ND	4,0
Ácido galacturónico	2,4	2,2	3,1
Ácido glucarónico	1,4	ND	ND
Raminosa	ND	4,3	6,1

- 5 La composición de monosacáridos no se afectó enormemente por el procesamiento, a pesar del 50 % de pérdida de masa durante el procesamiento y el aumento en azúcares neutros totales y sulfato.

F. Endotoxina

- 10 La endotoxina bacteriana se determinó por LAL según USP<85>. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 9. El procesamiento produjo una reducción de aproximadamente el 50 % en los niveles de endotoxinas.

Tabla 9: Niveles de endotoxinas de fucoidano sin procesar y procesado

	Endotoxina (UE/mg)
Lote original (NP-051316)	88,6
Lote de ensayo n.º 1	38
Lote de ensayo n.º 2	40

15

Ejemplo 4

Actividad biológica de muestras de fucoidano

- 20 Muestras de extractos de fucoidano purificadas del ensayo 1 (Ejemplo 1) y ensayo 2 (Ejemplo 2) se evaluaron en ensayos de coagulación *in vitro* para actividad y se compararon con el extracto de fucoidano en bruto (NPNutra, lote n.º 050316-FU-85). Los extractos de fucoidano purificados y en bruto se evaluaron para actividad biológica en ensayos *in vitro*, por ejemplo, APTT, dPT y tromboelastógrafo en Avigen Inc.

25 Ensayos de coagulación en plasma:

Tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT)

- 30 El ensayo de APTT se modificó a partir de los procedimientos convencionales (Anderson 1976; Staff 2004). Brevemente, 5 µl de 20X fucoidano en solución salina se incubaron con 95 µl de plasma durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación 100 µl de reactivo de APTT a 37 °C se añadieron a la mezcla y se incubaron a 37 °C durante 3 min, seguido de adición de 100 µl de CaCl₂ 25 mM a 37 °C e inicio del cronometraje en un fibrómetro convencional.

Tiempo de protrombina diluido (dPT)

- 35 El ensayo de dPT fue similar al previamente descrito (14). Se diluyó simplastina (bioMerieux, Durham, NC) con solución salina a 1:100 o 1:300, dependiendo del formato del ensayo y se mezcló con CaCl₂ 25 mM. La muestra de plasma también se calentó previamente a 37 °C y luego ~75 µl de cada una se mezclaron juntas y se midió el tiempo hasta la coagulación con un fibrómetro. Para la evaluación de la actividad de fucoidano, 5 µl de 20X fucoidano se preincubaron con plasma a temperatura ambiente durante 30 min antes de iniciarse el ensayo de dPT. Para evaluar la posible inhibición de la actividad de TFPI por fucoidano, rTFPI diluido (American Diagnostica, Stamford, CT) se preincubó con fucoidano durante 5 min a temperatura ambiente, se añadió muestra de plasma y la mezcla se incubó durante 25 min adicionales, seguido del inicio de dPT. Todos los estudios de coagulación se realizaron por duplicado y se reprodujeron.

45 Tromboelastógrafo de plasma (TEG)

Preparación de muestras – Muestras de plasma humano deficiente en factor VIII (George King Biomedical, Overland Park, KS) (360 µl) precalentadas a 37 °C se mezclaron con 40 µl de fucoidano sin procesar o tratado con EDTA en solución salina. La concentración de fucoidano final en las muestras de plasma osciló de 1 µg/ml a 100 µg/ml.

50

Análisis de TEG – Para la activación de las muestras de plasma, 20 µl de CaCl₂ 0,2 M se añadieron a una copa de

plástico montada en un soporte para copas de aluminio. Las mezclas de muestra de plasma y fucoídano (340 μ l) se dispensaron a la disolución de CaCl_2 y se midieron inmediatamente. El analizador de TEG incubó las muestras continuamente a 37 °C. Las pruebas se detuvieron después de que se calcularan los siguientes parámetros de formación de coágulos por el software TEG®Analytical versión 4: R, periodo de latencia para la coagulación inicial a partir del tiempo en que empezó la medición; ángulo α , que representa la rapidez del fortalecimiento del coágulo; y MA (amplitud máxima), equivalente a la fortaleza máxima del coágulo formado. En muestras de plasma sin formación de coágulos, la medición se terminó después de 2 h. Los valores promedio y desviaciones estándar se calcularon a partir de tres mediciones independientes.

El efecto del procesamiento sobre la actividad de fucoídano sobre la ruta de coagulación intrínseca y extrínseca se examinó midiendo el tiempo de coagulación frente a la concentración de fucoídano en los ensayos de APTT (Fig. 1) y dPT (Fig. 2). Como puede apreciarse en la Figura 1, el procesamiento tuvo un modesto cambio en la actividad de APTT. Sin embargo, como se observa en la Figura 2, el fucoídano potencia la inhibición de TFPI disminuyendo el tiempo de coagulación y desplaza la respuesta a dosis (CI90 para el extracto de fucoídano en bruto es aprox. 30 μ g/ml frente a los lotes de extracto de fucoídano purificado n.º 1 y n.º 2 que son aprox. 4 μ g/ml).

El impacto del procesamiento sobre las actividades pro- y anticoagulación en plasma de Hem A humana como se mide por análisis de TEG se examinó en muestras de plasma de cuatro pacientes con hemofilia A separados. El valor de R se representa frente a la concentración cuando los valores de R representan el tiempo necesario para formar un coágulo de 20 mm de tamaño. Como se representa en la Figura 3, aunque el extracto de fucoídano en bruto y los extractos de fucoídano purificados demostraron perfil pro-coagulante similar en los cuatro plasmas de Hem A, varió el efecto sobre la anticoagulación. Los lotes procesados n.º 1 y n.º 2 que contienen fucoídano mostraron actividad anticoagulante alterada en algunas muestras.

25 E. Conclusión

El extracto de fucoídano purificado como se describe en los Ejemplos 1 y 2 tuvo elevado contenido de azúcares neutros y sulfato y reducida contaminación de metales pesados y niveles de endotoxinas, mientras que mantiene el perfil de monosacáridos. Los extractos de fucoídano purificados tuvieron niveles no detectables (ND) de arsénico, bromo, cerio, cobalto, plomo, litio, molibdeno, estaño, tungsteno y vanadio. Además, la purificación redujo los niveles de yodo, hierro, magnesio, manganeso, níquel, fósforo, potasio y rubidio al menos dos veces. Los niveles de endotoxinas se redujeron aproximadamente el 50 %. Los extractos de fucoídano purificados que contienen fucoídano enriquecido tuvieron actividad de coagulación acelerada (e inhibición de TFPI potenciada) y cambio mínimo en la actividad anticoagulante cuando se compararon con el extracto de fucoídano en bruto.

Aunque las realizaciones preferidas de la invención se han ilustrado y descrito, se apreciará que pueden hacerse diversos cambios en las mismas sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de fucoidano de una mezcla heterogénea, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 (a) proporcionar una fuente de fucoidano;
 - (b) eliminar iones de metales pesados de dicha fuente tratando con un agente quelante para producir una primera mezcla de fucoidano;
 - 10 (c) precipitar selectivamente el fucoidano presente en dicha primera mezcla de fucoidano para eliminar contaminantes;
 - (d) resuspender el precipitado que contiene fucoidano en disolución acuosa para producir una segunda mezcla de fucoidano;
 - 15 (e) repetir las etapas (c) y (d) una o más veces; y
 - (f) filtrar la disolución acuosa que comprende fucoidano para eliminar contaminantes bacterianos y de endotoxinas para dar fucoidano purificado.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fucoidano posee del 5 al 25 por ciento en peso de azufre.
3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el fucoidano es de origen algal.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el fucoidano es del género *Fucus* o *Laminaria*.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el fucoidano es de *Fucus vesiculosus* o *Laminaria japonica*.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente quelante está seleccionado del grupo que consiste en ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis-(beta-aminoetiléter)-N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido 2,3-dimercaptopropanol-1-sulfónico (DMPS) y ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA).
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el agente quelante es EDTA.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el agente quelante se inmoviliza sobre un soporte sólido.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el agente quelante es una resina quelante de iminodiacetato.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el fucoidano en dicha primera mezcla de fucoidano se precipita selectivamente con etanol.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la concentración de etanol es aproximadamente del 40 % al 50 % (v/v).
- 45 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el pH se mantiene entre aproximadamente pH 5,7 y aproximadamente pH 6,0.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el pH se ajusta a aproximadamente pH 5,95.
- 50 14. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que se añade NaCl a la mezcla de fucoidano a una concentración de aproximadamente 20-24 g/litro.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende repetir las etapas (c) y (d) tres veces.
- 55 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además liofilización del fucoidano purificado.

Figura 1

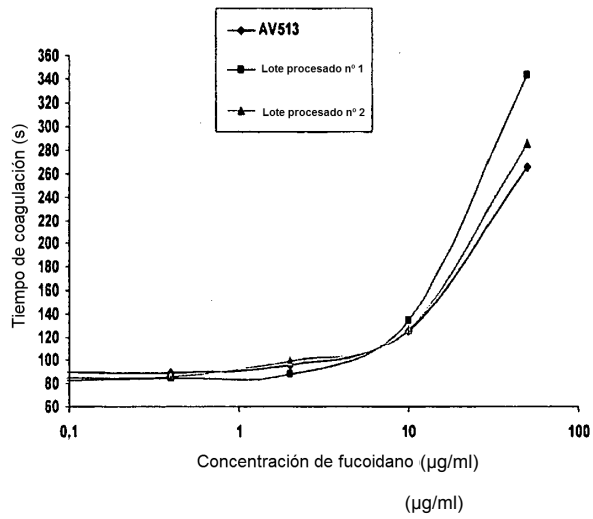


Figura 2

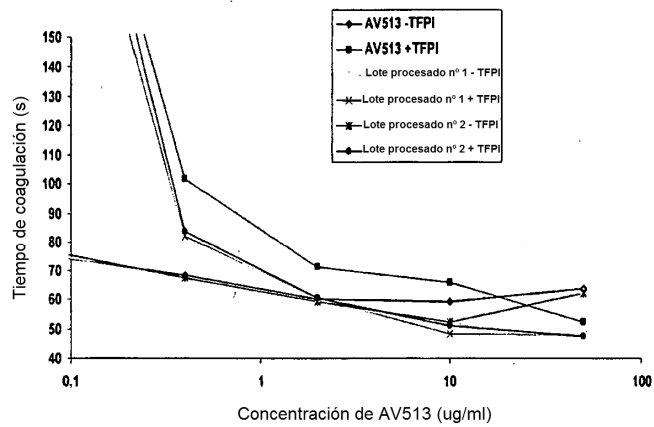
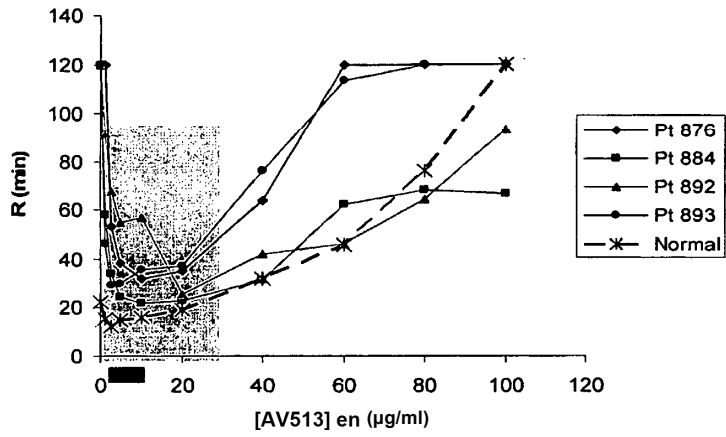
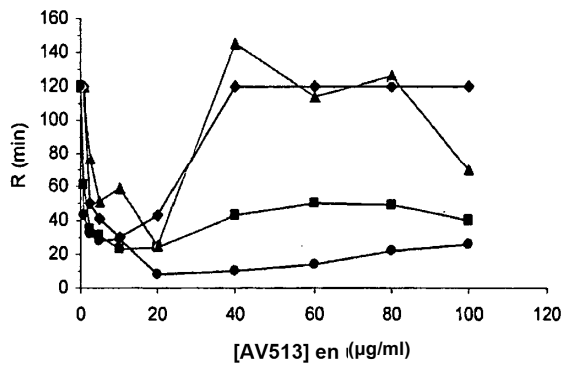


Figura 3

Sin procesar (050316)



Lote procesado n° 1



Lote procesado n° 2

