

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 741**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 49/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 103/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 49/04</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/60</b>	(2006.01)
<b>A61K 49/08</b>	(2006.01)		
<b>A61K 49/22</b>	(2006.01)		
<b>A61K 51/04</b>	(2006.01)		
<b>A61K 51/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 49/12</b>	(2006.01)		
<b>A61K 49/18</b>	(2006.01)		
<b>A61K 51/06</b>	(2006.01)		
<b>B82Y 5/00</b>	(2011.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2009 PCT/IB2009/052791**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO2010116209**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2009 E 09786466 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2416806**

54 Título: **Fucoidanos como ligandos para el diagnóstico de patologías degenerativas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.06.2017**

73 Titular/es:  
**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75654 Paris Cedex 13, FR y  
UNIVERSITÉ PARIS 13 (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**MICHEL, JEAN-BAPTISTE;  
LETOURNEUR, DIDIER;  
CHAUBET, FRÉDÉRIC;  
BACHELET, LAURE;  
ROUZET, FRANÇOIS y  
MEULEMANS, ALAIN**

74 Agente/Representante:  
**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 617 741 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

Fucoidanos como ligandos para el diagnóstico de patologías degenerativas

5 **Estado de la técnica**

Numerosas enfermedades degenerativas humanas, que incluyen enfermedades degenerativas cardiovasculares, pero también enfermedades degenerativas específicas de órgano, implican interacciones de células en circulación/pared vascular. Las selectinas son moléculas de adhesión celular importantes, con altas afinidades por restos de hidrato de carbono. Desempeñan una función importante y crítica en las etapas iniciales de componentes celulares en circulación e interacciones de la pared vascular mediando en interacciones leucocitos/plaqueta y leucocitos/endotelio. Se han descubierto tres tipos de selectinas hasta la fecha: P-selectina, E-selectina y L-selectina. La L-selectina se expresa constitutivamente en casi todos los leucocitos circulantes. La expresión de E-selectina es inducible en endotelio vascular tras la activación por diversos mediadores que incluyen citocinas y endotoxina. La P-selectina está contenida en gránulos intracitoplásmicos y se trasloca rápidamente a plaqueta o superficies endoteliales después de la exposición de células a trombina o histamina.

Las P-, L- y E-selectinas son proteínas transmembranarias estructuralmente similares. Todas poseen dominios extracelulares grandes, altamente glucosilados, un único dominio transmembranario, y una cola citoplásmica pequeña. En sus extremos amino extracelulares, tienen un único dominio de lectina dependiente de calcio (o tipo C) (L), seguido de un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) (E) y varios dominios reguladores del complemento (C). La adhesión celular mediada por selectina resulta de interacciones dependientes de calcio del dominio de lectina del extremo amino con una gran variedad de moléculas presentadoras de hidrato de carbono sobre la superficie de células diana. Mientras que la afinidad de cada una de las selectinas varía dependiendo del ligando, todas se unen a una estructura de hidrato de carbono de tetrasacárido específica conocida como sialil Lewis X (SLe<sup>x</sup>), que contiene restos de ácido siálico y fucosa.

Aunque los eventos de unión mediados por selectina desempeñan una función crítica en los procesos fisiológicos normales, las selectinas también son conocidas por contribuir a muchas patologías. Tales patologías incluyen estados clínicos que están asociados a la activación de plaquetas y la formación de fibrina, tales como enfermedades aterotrombóticas (E. Galkina et al., *Curr. Drug Targets*, 2007, 8: 1239-1248); estados clínicos asociados a activación endotelial aguda tales como sepsis, isquemia cerebral o isquemia-reperusión (C.R. Calvey et al., *J. Invest. Surg.*, 2007, 20: 71-85); estados clínicos asociados a activación endotelial crónica tales como hipertensión, hiperlipidemia, obesidad (S. Nishimura et al., *J. Clin. Invest.*, 2008, 118: 710-721) o trastornos degenerativos del sistema cardiovascular, el pulmón o el cerebro (M. Fisher, *Rev. Neurol. Dis.*, 2008, 5 Suppl. 1: S4-S11; S.I. van Kasteren et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106: 18-23); y estados clínicos asociados a acumulación focalizada crónica de leucocitos tales como neogénesis linfoide terciaria o enfermedades autoinmunitarias. Las interacciones de selectina también pueden mediar en mecanismos adhesivos implicados en la metástasis de ciertos cánceres epiteliales (I.P. Witz, *Immunol. Lett.*, 2006, 104: 89-93; 1; S. Gout et al., *Clin. Exp. Metastasis*, 2008, 25: 335-344; L. Borsig, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2008, 8: 1247-1255).

Las selectinas son consideradas marcadores potencialmente útiles para el diagnóstico de algunas de estas patologías. Están en progreso numerosos esfuerzos para obtener imágenes de selectinas, predominantemente mediante imagen por resonancia magnética (IRM) (S. Bouty et al., *Contrast Media Mol. Imaging*, 2006, 1: 15-22), escintigrafía (G. Hairi et al., *Ann. Biomed. Eng.*, 2008, 36: 821-830), y más recientemente usando ultrasonidos (F.S. Villanueva et al., *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 2008, 5: S26-S32). La mayoría de los agentes de obtención de imágenes de selectina desarrollados hasta la fecha son anticuerpos anti-selectina (B.A. Kaufinan et al., *Eur. Heart J.*, 2007, 28: 2011-2017; G. Hairi et al., *Ann. Biomed. Eng.*, 2008, 36: 821-830; K. Licha et al., *J. Biomed. Opt.*, 2005, 10: 41205; and P. Hauff et al., *Radiology*, 2004, 231: 667-673), péptidos de unión a selectina (S. Gratz et al., *Nucl. Med. Commun.*, 2001, 22:1003-1013) y análogos o derivados de sialil Lewis X (S. Bouty et al., *Contrast Media Mol. Imaging*, 2006, 1: 15-22; F.S. Villanueva et al., *Circulation*, 2007, 115: 345-352). Se ha demostrado que estos agentes de obtención de imágenes permiten la detección no invasiva *in vivo* de selectinas en inflamación, trastornos neurodegenerativos, cáncer y trombosis. Sin embargo, presentan varias desventajas que ciertamente excluirán su desarrollo industrial y comercialización. De hecho, la preparación y purificación de los agentes de obtención de imágenes basadas en sialil Lewis X y de agentes de obtención de imágenes basados en anticuerpos es compleja y muy costosa.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad en la materia de nuevos enfoques para la obtención de imágenes y la detección de interacciones de células en circulación/pared vascular que permitan el diagnóstico no invasivo y/o el cribado preventivo de enfermedades tales como patologías cardio/neurovasculares, trastornos neurodegenerativos y metástasis del cáncer. Son particularmente deseables agentes de obtención de imágenes de selectina que sean fáciles y relativamente baratos de producir.

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a sistemas y estrategias mejorados para la detección de selectinas y el diagnóstico

de enfermedades y trastornos caracterizados por interacciones no deseables o anormales mediados por selectinas. En particular, la invención engloba el reconocimiento por los solicitantes de que los fucoidanos presentan alta afinidad, especificidad y/o selectividad por las selectinas. Más específicamente, los presentes solicitantes han comparado la interacción de P-selectina con varios polisacáridos de peso molecular bajo (LMW): fucoidano, heparina y sulfato de dextrano. Usando ensayo de unión, espectrometría de masas, resonancia de plasmones superficiales y citometría de flujo en plaquetas humanas, encontraron que el fucoidano LMW es el ligando más eficiente de la P-selectina (véase el Ejemplo 1). Sin embargo, no se excluye una unión menos específica del fucoidano a restos de fibrina mediante enlaces de hidrógeno (K.H. Hsieh, *Biochemistry*, 1997, 36: 9381-9387). Los solicitantes también mostraron que el fucoidano LMW radiomarcado con tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) permitió la detección *in vivo* de vegetaciones endocárdicas, trombos aneurismáticos y auriculares en modelos animales (condiciones asociadas a exposición de plaqueta-selectina y formación de fibrina) (véase el Ejemplo 2).

Por consiguiente, la presente invención proporciona agentes de obtención de imágenes que comprenden al menos un fucoidano para la detección y obtención de imágenes de selectinas y para el diagnóstico de enfermedades y trastornos caracterizados por expresión no deseable o anormal de selectinas.

Más específicamente, en un aspecto, la presente invención proporciona un agente de obtención de imágenes que comprende al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un resto detectable, en el que el al menos un resto detectable es detectable por escintigrafía plana (PS, *Planar Scintigraphy*) o tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*). Preferentemente, el agente de obtención de imágenes se dirige a selectina. Más preferentemente, el al menos un resto de fucoidano del agente de obtención de imágenes se une a al menos una selectina humana seleccionada del grupo que consiste en P-selectina, L-selectina y E-selectina con una constante de disociación de entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 500 nM, preferentemente entre aproximadamente 0,5 nM y aproximadamente 10 nM, más preferentemente entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 5 nM.

El resto detectable, que es detectable por escintigrafía plana (PS) o tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), es un radionúclido seleccionado del grupo que consiste en tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), itrio-91 ( $^{91}\text{Y}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ) y talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ). En ciertas realizaciones preferidas, el resto detectable es tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Otro resto detectable desvelado en el presente documento puede comprender un resto quelante de metal formando complejo con un resto detectable. Otro resto detectable desvelado en el presente documento puede ser detectable por tomografía de emisión de positrones (PET). Por ejemplo, el resto detectable puede seleccionarse del grupo que consiste en carbono-11 ( $^{11}\text{C}$ ), nitrógeno-13 ( $^{13}\text{N}$ ), oxígeno-15 ( $^{15}\text{O}$ ) y flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ).

Otro resto detectable desvelado en el presente documento puede ser detectable por ultrasonografía de contrastes potenciados (CEUS). Por ejemplo, el resto detectable puede seleccionarse del grupo que consiste en microburbujas acústicamente activas y liposomas acústicamente activos.

Otro resto detectable desvelado en el presente documento puede ser detectable por imagen por resonancia magnética (IRM). Por ejemplo, el resto detectable puede seleccionarse del grupo que consiste en gadolinio III ( $\text{Gd}^{3+}$ ), cromo III ( $\text{Cr}^{3+}$ ), disprosio III ( $\text{Dy}^{3+}$ ), hierro III ( $\text{Fe}^{3+}$ ), europio ( $\text{Eu}^{3+}$ ), manganeso II ( $\text{Mn}^{2+}$ ) e iterbio III ( $\text{Yb}^{3+}$ ), preferentemente, el resto detectable es gadolinio III ( $\text{Gd}^{3+}$ ). Alternativamente, el resto detectable puede ser una partícula superparamagnética ultrapequeña de óxido de hierro (USPIO).

Otro resto detectable desvelado en el presente documento puede ser detectable por espectroscopía de fluorescencia. Por ejemplo, el resto detectable puede seleccionarse del grupo que consiste en europio ( $\text{Eu}^{3+}$ ), puntos cuánticos, Texas red, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), rodamina, carboxicianina, Cy-3, Cy-5, Cy5,5, Cy7, DY-630, DY-635, DY-680, colorantes Atto 565, merocianina, colorante de estirilo, colorante de oxonol, colorantes BODIPY, y análogos, derivados o combinaciones de estas moléculas. En particular, el resto detectable puede ser detectable por fluorometría resuelta en el tiempo. Por ejemplo, el resto detectable puede ser europio ( $\text{Eu}^{3+}$ ).

Un agente de obtención de imágenes puede ser detectable por más de una técnica de obtención de imágenes y puede, por tanto, usarse en obtención de imágenes multimodal. Por ejemplo, un agente de obtención de imágenes puede ser detectable por cualquier combinación adecuada de técnicas de obtención de imágenes seleccionadas del grupo que consiste en ultrasonografía, imagen por resonancia magnética (IRM), tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), espectroscopía de fluorescencia, tomografía computarizada y radiografía de rayos X. Un agente de obtención de imágenes tal puede comprender al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un resto detectable que es detectable por más de una técnica de obtención de imágenes. Un agente de obtención de imágenes tal puede comprender al menos un resto de fucoidano asociado a un primer resto detectable y un segundo resto detectable, en el que el primer resto detectable es detectable por un primer resto detectable y el segundo resto detectable es detectable por un segundo resto detectable.

En ciertas realizaciones, el resto de fucoidano tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 a aproximadamente 8000 Da. En otras realizaciones, el resto de fucoidano tiene un peso molecular promedio de

aproximadamente 20.000 a aproximadamente 70.000 Da. En todavía otras realizaciones, el resto de fucoidano tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 500.000 Da.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un agente de obtención de imágenes de la invención, o una sal fisiológicamente tolerable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona el uso de un agente de obtención de imágenes según la invención para la fabricación de una composición para la detección y/u obtención de imágenes de selectinas. La presente invención también proporciona el uso de un agente de obtención de imágenes inventivo para la fabricación de una composición para el diagnóstico de un estado clínico asociado a selectinas.

15 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina para su uso en un método de diagnóstico de un estado clínico asociado a selectinas en un paciente, comprendiendo dicho método las etapas de: administrar al paciente una cantidad eficaz de un agente de obtención de imágenes o una composición farmacéutica del mismo; y detectar cualquier selectina unida al agente de obtención de imágenes usando una técnica de obtención de imágenes.

20 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un agente de obtención de imágenes desvelado en el presente documento para su uso en un método *in vitro* de diagnóstico de estados clínicos asociados a selectinas.

25 Ejemplos de estados clínicos que pueden diagnosticarse usando un agente de obtención de imágenes y/o un método de la invención son miembros del grupo que consiste en trombosis, lesión por isquemia miocárdica/reperfusión, accidente cerebrovascular y traumatismo cerebral isquémico, trastornos neurodegenerativos, metástasis tumoral y crecimiento tumoral, y artritis reumatoide.

30 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método de detección de la presencia de selectinas anormales en un sistema biológico, comprendiendo el método las etapas de: poner en contacto el sistema biológico con una cantidad eficaz de un agente de obtención de imágenes o una composición farmacéutica del mismo; y detectar cualquier selectina unida al agente de obtención de imágenes usando una técnica de obtención de imágenes. La muestra biológica puede ser una célula, un fluido biológico o un tejido biológico.

35 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un agente de obtención de imágenes desvelado en el presente documento para su uso en un método *in vitro* de diagnóstico de estados clínicos asociados a selectinas.

En ciertas realizaciones, la muestra biológica se origina de un paciente que se sospecha que tiene un estado clínico asociado a selectinas, y el método se usa para diagnosticar el estado clínico.

40 En otras realizaciones, la muestra biológica se origina de un paciente que ha recibido un tratamiento para un estado clínico asociado a selectinas, y el método se usa para monitorizar la respuesta de un paciente al tratamiento.

45 En aún todavía otro aspecto, la presente invención proporciona kits para el diagnóstico de un estado clínico asociado a selectinas en un paciente o para la detección de selectinas anormales en un tejido biológico, comprendiendo el kit un resto de fucoidano, un resto detectable, e instrucciones para preparar un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina descrito en el presente documento, en el que el resto detectable es un radionúclido de vida corta seleccionado del grupo que consiste en tecnecio-99m (<sup>99m</sup>Tc), galio-67 (<sup>67</sup>Ga), itrio-91 (<sup>91</sup>Y), indio-111 (<sup>111</sup>In), renio-186 (<sup>186</sup>Re) y talio-201 (<sup>201</sup>Tl).

50 El kit puede comprender además instrucciones para diagnosticar el estado clínico usando el agente de obtención de imágenes dirigido a selectina.

Estos y otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos habituales en la materia que han leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

## 55 Descripción de las figuras

60 La **Figura 1** es un gráfico que muestra la inhibición de la unión SLe<sup>x</sup>/P-selectina por polisacáridos sulfatados. La unión de SLe<sup>x</sup>-poliacrilamida-biotina a P-selectina inmovilizada sobre una placa de microtitulación se cuantificó por complejación de estreptavidina-peroxidasa y reacción de peroxidasa registrada a 405 nm en presencia de concentraciones crecientes de sulfato de dextrano (**▲**), heparina (**■**) y fucoidano (**●**), como se describe en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados de un experimento representativo [media ± DE (n≥3)].

65 La **Figura 2** es un conjunto de sensogramas representativos que muestran los perfiles de asociación y disociación de polisacáridos sulfatados sobre IgG o P-selectina inmovilizadas. Se inyectaron fucoidano (**A**), heparina (**B**) y sulfato de dextrano (**C**) sobre chips sensores SPR CM5 sobre los que se inmovilizaron IgG de cabra anti-Fc humano (grabación gris, control no específico) más quimera de P-selectina/Fc (grabación negra).

Se realizaron estudios cinéticos a un caudal de 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Sensogramas representativos en unidades de resonancia (UR) se superponen a una concentración 1  $\mu\text{M}$  similar para todos los polisacáridos LMW sulfatados. Las constantes de disociación se calcularon usando una representación del modelo de unión de Langmuir 1:1 (**D**) para la unión específica de P-selectina con fucoidano (curva superior), heparina (curva inferior) o sulfato de dextrano (curva central). Se observó unión no específica sobre IgG para cada uno de los polisacáridos.

La **Figura 3** es un gráfico que muestra la unión de fucoidano LMW acoplado a FITC a plaquetas humanas en sangre completa. Se incubó fucoidano LMW acoplado a FITC a 140  $\mu\text{M}$  (1 mg/ml) durante 20 minutos a temperatura ambiente con sangre humana citrada diluida 10 veces en PBS. La activación de plaquetas se indujo con ADP 2,5  $\mu\text{M}$  (activador medio; línea de puntos) o TRAP 200  $\mu\text{M}$  (activador fuerte; línea continua). Las plaquetas se identificaron por su dispersión lateral y frontal y su positividad para un anticuerpo para plaquetas específico fluoromarcado en citometría de flujo. La unión de fucoidano LMW acoplado a FITC a plaquetas se detectó en el canal FL1. Se obtuvieron resultados similares usando otros dos donantes.

La **Figura 4** es un gráfico que muestra la inhibición de la unión del anticuerpo CD62P marcado a plaquetas en presencia de fucoidano LMW. El anticuerpo CD62P se incubó en presencia o en ausencia de fucoidano LMW no marcado, como se describe en el Ejemplo 1. La activación de plaquetas se indujo por TRAP 200  $\mu\text{M}$ . Las plaquetas se identificaron por su dispersión lateral y frontal y su positividad para un anticuerpo para plaquetas específico fluoromarcado en citometría de flujo. Se informa la unión a plaquetas activadas de anticuerpo IgG marcado con PC5 no relevante para comparación. La unión de anticuerpo CD62P marcado con PC5 a plaquetas, observada en el canal FL4, disminuyó significativamente en presencia de fucoidano LMW. Los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) se normalizaron al valor obtenido por incubación con IgG no relevante sola. \* $p < 0,05$  entre datos con CD62P solo con prueba de la t de Student.

La **Figura 5** muestra secciones de histología (izquierda) y de autorradiografía (derecha) de corazones en el modelo de rata de endocarditis izquierda con vegetaciones de la válvula aórtica. (**A**) Una vegetación de sección histológica está limitada a la válvula (3) mientras que la aorta (1) y el miocardio sub-valvular (2) fueron normales. En la autorradiografía, la señal de fucoidano marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , inyectado *in vivo*, está exactamente co-localizada con la vegetación valvular. (**B**) Un control negativo de un miocardio sin vegetación da el fondo en autorradiografía. (**C**) En la autorradiografía, la señal de fucoidano marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  está exactamente co-localizada con el manguito de fibrinoide que rodea al catéter.

La **Figura 6** muestra la sección de obtención de imágenes *in vivo* de tomografía-SPECT (izquierda), histología (centro) y autorradiografía (derecha) en el modelo de rata de trombo auricular. La tomografía-SPECT muestra retención de fucoidano marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en la aurícula izquierda de la rata. Los resultados de histología muestran que hay trombo fibrinoso en la luz auricular con músculo en ambos lados. En la autorradiografía, la señal de fucoidano marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  está localizada en el miocardio orientado al trombo.

La **Figura 7** muestra secciones de histología (izquierda) y de autorradiografía (derecha) de una aneurisma aórtica abdominal en un modelo de rata de trombo aneurismático. En la autorradiografía, la señal de fucoidano marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  está localizada en la interfase luz/pared del vaso donde está localizado un delgado trombo (azul) en la imagen de histología.

## Definiciones

En toda la memoria descriptiva, se emplean varios términos que se definen en los siguientes párrafos.

Como se usa en el presente documento, el término "**selectina**" tiene su significado entendido en la técnica y se refiere a cualquier miembro de la familia de moléculas de adhesión celular dependientes de calcio de unión a hidratos de carbono que están constitutivamente o inductivamente presentes sobre la superficie de leucocitos, células endoteliales o plaquetas. El término "**E-selectina**", como se usa en el presente documento, tiene su significado entendido en la técnica y se refiere a la molécula de adhesión celular también conocida como SELE; CD62E; ELAM; ELAM1; ESEL; o LECAM2 (números de acceso de GenBank para E-selectina humana: NM\_000450 (ARNm) y NP\_000441 (proteína)). Como se usa en el presente documento, el término "**L-selectina**" tiene su significado entendido en la técnica y se refiere a la molécula de adhesión celular también conocida como SELL; CD62L; LAM-1; LAM1; LECAM1; LNHR; LSEL; LYAM1; Leu-8; Lyam-1; PLNHR; TQ1; o hLHRc (números de acceso de GenBank para L-selectina humana: NM\_000655 (ARNm) y NP\_000646 (proteína)). El término "**P-selectina**", como se usa en el presente documento, tiene su significado entendido en la técnica y se refiere a la molécula de adhesión celular también conocida como SELP; CD62; CD62P; FLJ45155; GMP140; GRMP; PADGEM; o PSEL (números de acceso de GenBank para P-selectina humana: NM\_003005 (ARNm) y NP\_002996 (proteína)).

Como se usa en el presente documento, el término "**agente de obtención de imágenes**" se refiere a un compuesto que puede usarse para detectar elementos biológicos específicos (por ejemplo, biomoléculas) usando técnicas de obtención de imágenes. Agentes de obtención de imágenes de la invención son moléculas que comprenden al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un resto detectable. Pueden usarse agentes de obtención de imágenes de la presente invención para detectar selectinas en sistemas biológicos *in vitro* y *ex vivo*, además de en

sujetos.

El término "**resto de fucoidano**" se refiere a cualquier entidad de fucoidano que presente alta afinidad, especificidad y/o selectividad por selectinas. En el contexto de la presente invención, cuando un resto de fucoidano es parte de una molécula (por ejemplo, un agente de obtención de imágenes), confiere su propiedad de especificidad/selectividad/afinidad a la molécula, y la molécula llega a ser "**dirigida a selectina**" (es decir, la molécula interacciona específicamente y/o eficientemente con y/o se une a selectinas).

Los términos "**afinidad de unión**" y "**afinidad**" se usan en el presente documento indistintamente y se refieren al nivel de atracción entre entidades moleculares. Las afinidades pueden expresarse cuantitativamente como una constante de disociación ( $K_d$  o  $K_D$ ), o su inversa, la constante de asociación ( $K_a$  o  $K_A$ ).

El término "**resto detectable**", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier entidad que, cuando es parte de una molécula, permite la visualización de la molécula, por ejemplo usando técnicas de obtención de imágenes.

Los términos "**afección patológica asociada a selectinas**", "**enfermedad asociada a selectinas**" y "**trastorno asociado a selectinas**" se usan en el presente documento indistintamente. Se refieren a cualquier patología caracterizada por interacciones mediadas por selectina no deseables o anormales. Tales afecciones incluyen, por ejemplo, patologías asociadas a o resultante de la recirculación de leucocitos a sitios de inflamación, la recirculación normal de linfocitos a órganos linfáticos secundarios, la interacción de plaquetas con endotelio activado, interacciones plaqueta-plaqueta y plaqueta-leucocito en el compartimento de sangre vascular, y similares. Ejemplos de tales patologías incluyen, pero no se limitan a, rechazo de trasplante de tejido, enfermedades mediadas por plaquetas (por ejemplo, aterosclerosis y coagulación), circulación coronaria hiperactiva, lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos (por ejemplo, síndrome disneico del adulto - SDA), enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias (por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino), enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, esclerosis múltiple, miastenia grave), infección, cáncer (incluyendo metástasis), trombosis, heridas y septicemia asociada a herida, quemaduras, daño de la médula espinal, trastornos de la mucosa de la membrana del tubo digestivo (por ejemplo, gastritis, úlceras), osteoporosis, artritis reumatoide, osteoartritis, asma, alergia, psoriasis, choque séptico, accidente cerebrovascular, nefritis, dermatitis atópica, lesión por congelación, síndrome de disnea del adulto, colitis ulcerosa, eritematosis por lupus sistémico, diabetes y lesión por reperusión tras episodios isquémicos.

Como se usa en el presente documento, el término "**sujeto**" se refiere a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, perro, gato, ganado vacuno, cerdo, oveja, caballo o primate). En muchas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En tales realizaciones, el sujeto se denomina frecuentemente un "**individuo**", o un "**paciente**" si el sujeto está aquejado de una enfermedad o estado clínico. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" no indican una edad particular, y así engloban adultos, niños y recién nacidos.

El término "**muestra biológica**" se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Una muestra biológica se obtiene generalmente de un sujeto. Una muestra puede ser de cualquier tejido biológico o fluido que pueda producir y/o contener selectinas. Frecuentemente, una muestra será una "muestra clínica", es decir, una muestra derivada de un paciente. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales que pueden o pueden no contener células, por ejemplo, sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo (CSF), líquido sinovial, tejido o muestras de biopsia de aguja fina, y muestras de archivo con historia conocida de diagnóstico, tratamiento y/o resultado. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas tomadas para fines histológicos. El término "muestra biológica" también engloba cualquier material derivado por procesamiento de una muestra biológica. Los materiales derivados incluyen, pero no se limitan a, células (o su progenie) aisladas de la muestra, proteínas u otras moléculas extraídas de la muestra. El procesamiento de una muestra biológica puede implicar uno o más de: filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos, y similares.

El término "**cantidad eficaz**", cuando se usa en el presente documento en referencia a un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina de la invención, o una composición farmacéutica del mismo, se refiere a cualquier cantidad del agente de obtención de imágenes, o composición farmacéutica, que es suficiente para cumplir su(s) fin(es) previsto(s) (por ejemplo, el fin puede ser la detección y/u obtención de imágenes de selectinas presentes en un sistema biológico o en un sujeto, y/o el diagnóstico de una enfermedad asociada a selectinas).

Una "**composición farmacéutica**", como se usa en el presente documento, se define como que comprende al menos un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina, o una sal tolerable fisiológica del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "**sal fisiológicamente tolerable**" se refiere a cualquier sal de adición de ácido o de adición de base que tiene la actividad biológica y propiedades de la base libre o ácido libre, respectivamente, y que no es biológicamente o de otro modo no deseable. Sales de adición de ácido se forman con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, y similares); y ácidos orgánicos (por ejemplo,

ácidos acéticos, propiónico, pirúvico, maleico, malónico, succínico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico, y similares). Pueden formarse sales de adición de base con bases inorgánicas (por ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, cinc, aluminio, y similares) y bases orgánicas (por ejemplo, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que existen de forma natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetil-aminoetanol, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromo, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina, y similares).

Como se usa en el presente documento, el término "**vehículo farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un medio de vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que no es excesivamente tóxico para los huéspedes a las concentraciones a las que se administra. El término incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasan la adsorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA).

El término "**tratamiento**" se usa en el presente documento para caracterizar un método o proceso que pretende (1) retrasar o prevenir la aparición de una enfermedad o afección (por ejemplo, un estado o afección asociado a selectina); (2) ralentizar o detener la progresión, empeoramiento o deterioro de los síntomas del estado o afección; (3) provocar la mejora de los síntomas del estado o afección; y/o (4) curar el estado o afección. Un tratamiento puede administrarse antes de la aparición de la enfermedad, para una acción profiláctica o preventiva. Alternativamente o adicionalmente, puede administrarse un tratamiento después del inicio de la enfermedad o afección, para una acción terapéutica.

Los términos "**aproximadamente**" y "**alrededor de**", como se usan en el presente documento en referencia a un número, generalmente incluyen números que entran dentro de un intervalo del 10 % en cualquier dirección del número (superior o inferior al número), a menos que se establezca de otro modo o sea de otro modo evidente del contexto (excepto donde un número tal superaría el 100 % de un posible valor).

### Descripción detallada de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere al uso de fucoidanos para la obtención de imágenes de selectinas y el diagnóstico de afecciones fisiopatológicas asociadas a las selectinas. En particular, la invención engloba agentes de obtención de imágenes, kits y estrategias para detectar específicamente la presencia de selectinas *in vitro*, *ex vivo*, además de *in vivo*, usando técnicas de obtención de imágenes.

#### I - Agente de obtención de imágenes dirigido a selectinas

En un aspecto, la invención se refiere a una nueva clase de agentes de obtención de imágenes que tienen alta afinidad y especificidad por selectinas. Más específicamente, se proporcionan agentes de obtención de imágenes dirigidos a selectina que comprenden al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un resto detectable.

#### Restos de fucoidano

Los fucoidanos (también llamados fucosanos o fucanos sulfatados) son polisacáridos sulfatados con un amplio espectro de actividades biológicas, que incluyen actividades anticoagulantes, antitrombóticas, antiviral, antitumorales, inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes (B. Li et al., *Molecules*, 2008, 13: 1671-1695; D. Logeart et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, 30: 501-508). Los fucoidanos se encuentran principalmente en diversas especies de algas marinas marrones (B. Li et al., *Molecules*, 2008, 13: 1671-1695; M. Kusaykin et al., *Biotechnol. J.*, 2008, 3: 904-915). También se han encontrado formas de variante de fucoidanos en especies de animales marinos, que incluyen el pepino de mar. Así, en comparación con otros polisacáridos sulfatados, los fucoidanos están ampliamente disponibles de diversos tipos de fuentes baratas, y se obtienen fácilmente usando métodos de extracción conocidos en la técnica (C. Collic et al., *Phytochemistry*, 1994, 35(3): 697-700). Estos métodos de extracción generalmente dan fucoidanos con pesos moleculares en el intervalo de 70-800 kDa. También se han desarrollado procesos para preparar fucoidanos de bajo peso molecular a partir de fucoidanos de alto peso molecular, por ejemplo, inferior a aproximadamente 20 kDa (documento EP 0 403 377B, patente de EE.UU. N.º 5.321.133), o inferior a aproximadamente 10 kDa (documento EP 0 846 129 B; patente de EE.UU. N.º 6.028.191; A. Nardella et al., *Carbohydr. Res.*, 1996, 289: 201-208).

Los fucoidanos son polímeros de L-fucosa unidos en  $\alpha$ -1,2 o  $\alpha$ -1,3 que están sulfatados en la posición 4 y la posición 2 o 3 que sigue al enlace glucosídico. Sin embargo, además de los restos de fucosa y sulfato, los fucoidanos también contienen otros monosacáridos (por ejemplo, manosa, galactosa, glucosa, xilosa, etc.) y grupos de ácido urónico. Se conoce en la técnica que la estructura de los fucoidanos de las diferentes algas marrones varía de especie a especie. Además, la estructura de los fucoidanos también puede ser químicamente modificada. Por

ejemplo, se han desarrollado métodos para aumentar el porcentaje de grupos sulfato de fucoidanos con el fin de obtener fucoidanos sulfatados en exceso o fragmentos de fucoidano sulfatados en exceso (T. Nishino et al., Carbohydr. Res., 1992, 229: 355-362; S. Soeda et al., Thromb. Res., 1993, 72: 247-256).

5 Restos de fucoidano adecuados para su uso en la presente invención son restos de fucoidano que tienen algún grado de atracción por selectinas y pueden desempeñar una función de direccionamiento cuando están comprendidos en un agente de obtención de imágenes. Preferentemente, los restos de fucoidano son entidades no tóxicas estables que retienen sus propiedades de afinidad/especificidad/selectividad en condiciones *in vitro* e *in vivo*.  
 10 En realizaciones preferidas, los restos de fucoidano presentan alta afinidad y especificidad por selectinas, es decir, interaccionan específica y eficientemente con, se unen a, o se asocian a las selectinas. Restos de fucoidano adecuados incluyen fucoidanos que presentan afinidad y especificidad por solo una de las selectinas (es decir, por L-selectina, E-selectina o P-selectina), además de fucoidanos que presentan afinidad y especificidad por más de una selectina, que incluyen aquellos restos que pueden interaccionar eficientemente con, se unen a o se asocian a las tres selectinas. Preferentemente, la interacción entre una selectina y un resto de fucoidano dentro de un agente de  
 15 obtención de imágenes es suficientemente fuerte durante al menos el tiempo necesario para detectar la selectina usando una técnica de obtención de imágenes. En ciertas realizaciones, un resto de fucoidano adecuado interacciona con una selectina con una constante de disociación ( $K_d$ ) entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 500 nM, preferentemente entre aproximadamente 0,5 nM y aproximadamente 10 nM, más preferentemente entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 5 nM.

20 El diseño de un agente de obtención de imágenes inventivo vendrá impuesto por su(s) fin(es) previsto(s) y las propiedades que son deseables en el contexto particular de su uso. Así, se elegirán restos de fucoidano basándose en sus propiedades conocidas, observadas o esperadas. Por ejemplo, en realizaciones donde un agente de obtención de imágenes de la invención va a usarse en el diagnóstico de trastornos neurodegenerativos  
 25 caracterizados por interacciones mediadas por selectina no deseables o anormales en el cerebro, el agente de obtención de imágenes será preferentemente capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. Por tanto, un agente de obtención de imágenes tal contendrá preferentemente un resto de fucoidano de bajo peso molecular (por ejemplo, 2-8 kDa o inferior a 5 kDa). A diferencia, un agente de obtención de imágenes que contiene un resto de fucoidano de alto peso molecular será más apto para situaciones en las que el agente va a usarse para obtener imágenes de selectinas en el sistema vascular. De hecho, debido a su alto peso molecular, el agente de obtención de imágenes no será capaz de difundir fácilmente y, por tanto, será más probable que permanezca dentro del sistema vascular, permitiendo así un direccionamiento más selectivo del sistema de interés.

35 Un resto de fucoidano de alto peso molecular también puede tener la ventaja de ser capaz de llevar un alto número de restos detectables, aumentando así la sensibilidad del agente de obtención de imágenes (es decir, permitiendo la detección de concentraciones más bajas de selectinas). Además de su peso molecular, los restos de fucoidano pueden seleccionarse basándose en su contenido de sulfato. Variando el contenido de sulfato (tanto por selección de fucoidanos que existen de forma natural como por modificación química), puede ser posible modular la especificidad del resto de fucoidano (y agente de obtención de imágenes correspondiente) para una de las  
 40 selectinas (L-selectina, E-selectina o P-selectina). Se conoce, por ejemplo, que la unión a P- y E-selectinas aumenta con la presencia de grupos sulfato en el ligando (T.V. Pochechueva et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003, 13: 1709-1712).

45 Alternativamente o adicionalmente, puede seleccionarse un resto de fucoidano basándose en su estructura y, en particular, basándose en la presencia de al menos un grupo funcional que puede usarse (o que puede ser fácilmente químicamente convertido en un grupo funcional diferente que puede usarse) para asociar el resto de fucoidano a un resto detectable. Ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos carboxi, tioles, grupos amino (preferentemente aminas primarias), y similares.

#### 50 **Restos detectables**

Restos detectables desvelados en el presente documento son entidades que son detectables por técnicas de obtención de imágenes tales como ultrasonografía, imagen por resonancia magnética (IRM), tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), espectroscopía de fluorescencia,  
 55 tomografía computerizada, radiografía de rayos X, o cualquier combinación de estas técnicas. Preferentemente, los restos detectables son entidades no tóxicas estables que, cuando son parte de un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina, retienen sus propiedades bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*.

60 **Restos de obtención de imágenes radiactivos.** El agente de obtención de imágenes dirigido a selectina desvelado en el presente documento puede diseñarse para ser detectable por una técnica de obtención de imágenes de medicina nuclear tal como escintigrafía plana (PS), tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT). En tales casos, el agente de obtención de imágenes de la invención comprende al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un radionúclido (es decir, un isótopo radiactivo) como se define en las reivindicaciones.

65 Se han usado SPECT y PET para detectar tumores, aneurismas, circulación sanguínea irregular o inadecuada a

diversos tejidos, trastornos de los glóbulos sanguíneos y funcionamiento inadecuado de órganos, tales como deficiencias de la función tiroidea y pulmonar. Ambas técnicas adquieren información sobre la concentración de radionúclidos introducidos en una muestra biológica o el cuerpo de un paciente. PET genera imágenes detectando pares de rayos gamma emitidos indirectamente por un radionúclido emisor de positrones. Un análisis de PET produce una serie de imágenes de rebanada delgada del cuerpo sobre la región de interés (por ejemplo, cerebro, mama, hígado). Estas imágenes de rebanada delgada pueden ensamblarse en una representación tridimensional del área examinada. Sin embargo, solo hay algunos centros de PET debido a que deben estar localizados cerca de un dispositivo acelerador de partículas que se requiere para producir los radioisótopos de vida corta usados en la técnica. SPECT es similar a PET, pero las sustancias radiactivas usadas en SPECT tienen tiempos de desintegración más largos que aquellas usadas en PET y emiten rayos gamma simples en lugar de dobles. Aunque las imágenes de SPECT presentan menos sensibilidad y son menos detalladas que las imágenes de PET, la técnica SPECT es mucho menos cara que PET y ofrece la ventaja de no requerir la proximidad de un acelerador de partículas. La escintigrafía plana (PS) es similar a SPECT en que usa los mismos radionúclidos. Sin embargo, PS solo genera información 2D.

Así, el resto detectable en un agente de obtención de imágenes desvelado en el presente documento puede ser un radionúclido detectable por PET. Ejemplos de tales radionúclidos incluyen carbono-11 ( $^{11}\text{C}$ ), nitrógeno-13 ( $^{13}\text{N}$ ), oxígeno-15 ( $^{15}\text{O}$ ) y flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ).

En la presente invención, el resto detectable es un radionúclido detectable por escintigrafía plana o SPECT. Ejemplos de tales radionúclidos incluyen tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), itrio-91 ( $^{91}\text{Y}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ) y talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ). Preferentemente, el radionúclido es tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ). Más del 85 % de los procedimientos de medicina nuclear rutinarios que son actualmente realizados usan metodologías radiofarmacéuticas basadas en  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

*Restos de obtención de imágenes de IRM.* El agente de obtención de imágenes dirigido a selectina desvelado en el presente documento puede diseñarse para ser detectable por imagen por resonancia magnética (IRM). IRM, que es una aplicación de la resonancia magnética nuclear (RMN), ha evolucionado en una de las técnicas no invasivas más poderosas en la medicina clínica de diagnóstico e investigación biomédica. Se usa ampliamente como herramienta de diagnóstico no invasiva para identificar anomalías fisiológicas posiblemente malignas, para observar la circulación sanguínea o para determinar el estado general del sistema cardiovascular. La IRM tiene la ventaja (con respecto a otros métodos de obtención de imágenes de alta calidad) de no basarse en radiación ionizante posiblemente perjudicial.

Así, los agentes de obtención de imágenes desvelados en el presente documento pueden comprender al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un ión metálico paramagnético. Ejemplos de iones metálicos paramagnéticos detectables por IRM son gadolinio III ( $\text{Gd}^{3+}$ ), cromo III ( $\text{Cr}^{3+}$ ), disprosio III ( $\text{Dy}^{3+}$ ), hierro III ( $\text{Fe}^{3+}$ ), manganeso II ( $\text{Mn}^{2+}$ ) e iterbio III ( $\text{Yb}^{3+}$ ), preferentemente gadolinio III ( $\text{Gd}^{3+}$ ). El gadolinio es un agente de contraste autorizado por la FDA para IRM.

Los agentes de obtención de imágenes desvelados en el presente documento pueden comprender al menos un resto de fucoidano asociado a al menos una partícula superparamagnética ultrapequeña de óxido de hierro (USPIO). Las partículas de USPIO están actualmente en investigación como agentes de contraste para la obtención de imágenes de patologías humanas (C. Corot et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2006, 56: 1472-1504). Están compuestas de un núcleo de óxido de hierro cristalino que contiene miles de átomos de hierro que proporcionan una gran alteración de la señal de resonancia magnética que rodea el agua. A diferencia de otros tipos de nanopartículas tales como puntos cuánticos (actualmente en investigación como sondas fluorescentes extremadamente sensibles), las partículas de USPIO presentan una biocompatibilidad muy buena. Se requiere el recubrimiento químico de partículas de USPIO para garantizar su dispersión en medios biológicos. La presencia de un recubrimiento apropiado también puede producir una disminución en la eliminación de las partículas (efecto "furtivo") y puede proporcionar un medio para unir estas partículas a moléculas que son capaces de dirigirse a un tejido específico (R. Weissleder et al., Magn. Reson. Q, 1992, 8: 55-63). Actualmente se usan polisacáridos, tales como dextrano y sus derivados carboximetilados, como recubrimientos. Las partículas de USPIO pueden recubrirse con restos de fucoidano y los agentes de obtención de imágenes resultantes pueden usarse para detectar selectinas por IRM. Tales agentes de obtención de imágenes pueden encontrar aplicaciones en el diagnóstico de patologías cardiovasculares asociadas a selectinas. De hecho, con un radio de aproximadamente 15 nm, es probable que las partículas de USPIO difundan solo débilmente fuera del espacio vascular, con la excepción de tejidos vasculares patológicos más permeables tales como paredes ateroscleróticas. Por tanto, constituyen un buen agente de agrupación de sangre (J. Bremerich et al., Eur. Radiol., 2007, 17: 3017-3024).

Se conocen en la técnica partículas de USPIO y se han descrito (véanse, por ejemplo, J. Petersein et al., Magn. Reson. Imaging Clin. Am., 1996, 4: 53-60; B. Bonnemain, J. Drug Target, 1998, 6: 167-174; E.X. Wu et al., NMR Biomed., 2004, 17: 478-483; C. Corot et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2006, 58: 1471-1504; M. Di Marco et al., Int. J. Nanomedicine, 2007, 2: 609-622). Las partículas de USPIO están comercialmente disponibles, por ejemplo, de AMAG Pharmaceuticals, Inc. con los nombres comerciales Sinerem® y Combidex®.

*Restos de obtención de imágenes de ultrasonografía de contrastes potenciados.* El agente de obtención de imágenes dirigido a selectina desvelado en el presente documento puede diseñarse para ser detectable por ultrasonografía de contrastes potenciados (CEUS). El ultrasonido es una tecnología extendida para el cribado y la detección temprana de enfermedades humanas. Es menos cara que la IRM o la escintigrafía y más segura que las modalidades de obtención de imágenes moleculares tales como obtención de imágenes de radionúclidos debido a que no implican radiación.

Así, los agentes de obtención de imágenes desvelados en el presente documento pueden comprender al menos un resto de fucoidano asociado a al menos una microburbuja acústicamente activa (rellena de gas). Puede usarse una variedad de microburbujas acústicamente activas (A.L. Klibanov, *Bioconj. Chem.*, 2005, 16: 9-17; J.R. Lindner, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, 3: 527-532; M. McCulloch et al., *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, 2000, 13: 959-967; A.M. Takalkar et al., *J. Contr. Release*, 2004, 96: 473-482; G.E. Weller et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 92: 780-788).

Generalmente, tales microburbujas comprenden un núcleo de gas y una envoltura. El núcleo de gas es la parte más importante de la microburbuja debido a que permite la detección. Cuando las burbujas de gas son atrapadas en un campo de frecuencia ultrasónica, se comprimen, oscilan y reflejan un eco característico, que genera un sonograma fuerte y único en CEUS. Los núcleos de gas pueden estar compuestos de aire, o gases pesados tales como perfluorocarbono o nitrógeno. Es probable que las microburbujas con núcleos de gas pesado duren más en la circulación en comparación con las microburbujas con núcleos que comprenden aire. El material de envoltura determina cómo de fácil es absorbida la microburbuja por el sistema inmunitario. Una microburbuja con una envoltura hecha de un material más hidrófilo tiende a ser absorbida más fácilmente por el sistema inmunitario, mientras que un material de envoltura más hidrófobo tiende a aumentar el tiempo de residencia de la microburbuja en la circulación, aumentando así el tiempo disponible para la obtención de imágenes de contraste. Las envolturas de las microburbujas pueden estar hechas de albúmina, galactosa, lípidos o polímeros (J.R. Lindner, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, 3: 527-532). Independientemente de la composición de la envoltura o núcleo de gas, el tamaño de microburbuja es casi uniforme. Su diámetro está generalmente en el intervalo de 1-4 micrómetros. Por tanto, son más pequeñas que los glóbulos rojos, que les permite fluir fácilmente a través de la circulación, además de la microcirculación (F.S. Vallanueva et al., *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 2008, 5 Suppl. 2: S26-S32).

El agente de obtención de imágenes desvelado en el presente documento puede comprender al menos un resto de fucoidano asociado a al menos una partícula de lípido acústicamente activa (es decir, un liposoma relleno de gas). Se conocen en la técnica una variedad de partículas de lípido acústicamente activas y pueden usarse en la práctica de la presente invención (H. Alkan-Onyuksel et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85: 486-490; S.M. Demos et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1999, 33: 867-875; S.L. Huang et al., *J. Pharm. Sci.*, 2001, 90: 1917-1926; S.L. Huang et al., *J. Ultrasound Med.*, 2002, 28: 339-348; A. Hamilton et al., *Circulation*, 2002, 105: 2772-2778).

*Restos de obtención de imágenes de fluorescencia.* El agente de obtención de imágenes dirigido a selectina desvelado en el presente documento puede diseñarse para ser detectable por espectroscopía de fluorescencia. En tales casos, los agentes de obtención de imágenes pueden comprender al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un resto fluorescente.

Propiedades ópticas adecuadas de los restos fluorescentes incluyen alto coeficiente de absorción molecular, alto rendimiento cuántico de fluorescencia y fotoestabilidad. Restos fluorescentes preferidos presentan longitudes de onda de absorción y de emisión en el visible (es decir, entre 400 y 700 nm) o el infrarrojo cercano (es decir, entre 700 y 950 nm). La selección de un resto fluorescente particular estará gobernada por la naturaleza y las características de los sistemas de iluminación y detección usados en el método de diagnóstico. La obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo* usa una cámara sensible para detectar la emisión de fluorescencia de fluoróforos en mamíferos que viven en el cuerpo entero. Para vencer la atenuación fotónica en tejido vivo, generalmente se prefieren fluoróforos con emisión en la región de infrarrojos cercana (NIR) (J. Rao et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, 18: 17-25). La lista de sondas de NIR continúa aumentando con la reciente adición de nanopartículas orgánicas, inorgánicas y biológicas fluorescentes. Avances recientes en las estrategias de obtención de imágenes y técnicas indicadoras para la obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo* incluyen enfoques novedosos para mejorar la especificidad y afinidad de las sondas, y para modular y amplificar la señal en sitios diana para sensibilidad potenciada. Desarrollos emergentes adicionales tienen como objetivo lograr la alta resolución, multimodalidad y obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo* basados en la duración.

Son adecuados numerosos restos fluorescentes con una amplia variedad de estructuras y características. Marcas fluorescentes adecuadas incluyen, pero no se limitan a, puntos cuánticos (es decir, nanocristales semiconductores inorgánicos fluorescentes) y colorantes fluorescentes tales como Texas red, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), rodamina, fluoresceína, carbocianina, Cy-3™ y Cy-5™ (es decir, 3- y 5-N,N'-dietiltetrametilindodicarbocianina, respectivamente), Cy5.5, Cy7, DY-630, DY-635, DY-680 y colorantes Atto 565, merocianina, colorante de estirilo, colorante de oxonol, colorante BODIPY (es decir, fluoróforo de difluoruro de dipirrometeno de boro), y análogos, derivados o combinaciones de estas moléculas.

El resto detectable desvelado en el presente documento puede ser detectable por fluorometría resuelta en el tiempo. Por ejemplo, el resto detectable es europio (Eu<sup>3+</sup>).

Como se entenderá por un experto en la materia, la selección de un tipo particular de resto detectable en el diseño de un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina vendrá impuesta por el fin previsto del agente de obtención de imágenes, además de por la técnica de obtención de imágenes que va a usarse en la detección.

- 5 Puede diseñarse un agente de obtención de imágenes para ser detectable por más de una técnica de obtención de imágenes, por ejemplo, por una combinación de IRM-PET, IRM-SPECT, fluorescencia-IRM, radiografía de rayos X-escintigrafía, y similares. La obtención de imágenes multimodal proporciona diferentes tipos de información sobre tejidos biológicos, tales como tanto propiedades estructurales como funcionales. Así, por ejemplo, un agente de obtención de imágenes puede comprender al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un resto detectable que es detectable por más de una técnica de obtención de imágenes. Ejemplos de tales restos detectables incluyen, pero no se limitan a, europio, que es fluorescente y detectable por IRM; y nanopartículas híbridas luminiscentes con un núcleo paramagnético de  $Gd_2O_3$  que se desarrolla como agentes de contraste para tanto la fluorescencia *in vivo* como IRM (J.L; Bridot et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129: 5076-5084). Alternativamente, un agente de obtención de imágenes puede comprender al menos un resto de fucoidano asociado a un primer resto detectable y un segundo resto detectable, en el que el primer resto detectable es detectable por una primera técnica de obtención de imágenes y el segundo resto detectable es detectable por una segunda técnica de obtención de imágenes. Así puede obtenerse una gran variedad de agentes de obtención de imágenes con doble detectabilidad. También se contempla el uso simultáneo de dos agentes de obtención de imágenes diferentes (es decir, de un primer agente de obtención de imágenes detectable por una primera técnica de obtención de imágenes y un segundo agente de obtención de imágenes detectable por una segunda técnica de obtención de imágenes).

#### **Síntesis de agentes de obtención de imágenes dirigidos a selectina**

- 25 Los agentes de obtención de imágenes descritos en el presente documento pueden prepararse por cualquier método sintético conocido en la técnica, siendo el único requisito que, después de la reacción, el resto de fucoidano y el resto detectable retengan su propiedad de afinidad y detectabilidad, respectivamente. Los restos de fucoidano y detectables pueden asociarse en cualquiera de una gran variedad de formas. La asociación puede ser covalente o no covalente. Cuando la asociación es covalente, los restos de fucoidano y detectables pueden unirse entre sí tanto directa como indirectamente (por ejemplo, mediante un conector). Cuando el resto detectable es una entidad metálica, el resto de fucoidano puede asociarse a la entidad metálica detectable mediante un resto quelante de metal.

- 35 Más específicamente, en ciertas realizaciones, el resto de fucoidano y el resto detectable se unen directamente covalentemente entre sí. La unión covalente directa puede ser mediante un enlace amida, éster, carbono-carbono, disulfuro, carbamato, éter, tioéter, urea, amina o carbonato. La unión covalente puede lograrse sacando ventaja de los grupos funcionales presentes en el resto de fucoidano y los restos detectables. Grupos funcionales adecuados que pueden usarse para unir los dos restos juntos incluyen, pero no se limitan a, aminas (preferentemente aminas primarias), anhídridos, grupos hidroxilo, grupos carboxilo y tioles. También puede formarse un enlace directo usando un agente de activación, tal como una carbodiimida, para unir, por ejemplo, el grupo amino primario presente en un resto con el grupo carboxilo presente en el otro resto. Agentes de activación adecuados para su uso en la preparación son muy conocidos en la técnica.

- 45 El resto de fucoidano y el resto detectable pueden unirse indirectamente covalentemente entre sí mediante un grupo conector. Esto puede llevarse a cabo usando cualquier número de agentes bifuncionales estables muy conocidos en la técnica, que incluyen conectores homofuncionales y heterofuncionales. El uso de un conector bifuncional se diferencia del uso de un agente de activación en que el primero produce un resto de enlace que está presente en el agente de obtención de imágenes inventivo después de la reacción, mientras que el último produce un acoplamiento directo entre los dos restos implicados en la reacción. La principal función del conector bifuncional es permitir la reacción entre dos restos de otro modo químicamente inertes. Sin embargo, el conector bifuncional, que llega a ser parte del producto de reacción, también puede seleccionarse de forma que confiera algún grado de flexibilidad conformacional al agente de obtención de imágenes (por ejemplo, el conector bifuncional puede comprender una cadena de alquilo lineal que contiene varios átomos).

- 55 Puede usarse un amplio intervalo de conectores homofuncionales y heterofuncionales adecuados conocidos en la técnica en el contexto de la preparación. Conectores preferidos incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo y arilo, que incluyen grupos alquilo de cadena lineal y ramificada, grupos alquilo y arilo sustituidos, grupos heteroalquilo y heteroarilo, que tienen funcionalidades químicas reactivas tales como amino, anhídrido, hidroxilo, carboxilo, grupos carbonilo, y similares.

- 60 Pueden usarse métodos de asociación covalente directa o indirecta, por ejemplo, en la síntesis de agentes de obtención de imágenes dirigidos a selectina que comprenden un resto fluorescente. Similarmente, tales métodos pueden emplearse para el recubrimiento de partículas de USPIO por restos de fucoidano (véase el Ejemplo 3), o para injertar fucoidano sobre microburbujas o liposomas acústicamente activos (véase el Ejemplo 4).

- 65 Los restos de fucoidano y detectables pueden asociarse directamente, pero no covalentemente, entre sí. Asociaciones no covalentes incluyen, pero no se limitan a, interacciones hidrófobas, interacciones electrostáticas,

interacciones dipolares, interacciones de van der Waals y enlace de hidrógeno. Por ejemplo, pueden asociarse un resto de fucoidano y una entidad metálica detectable por complejación. Métodos de complejación adecuados incluyen, por ejemplo, incorporación directa de la entidad metálica en el resto de fucoidano y transmetalación. Cuando sea posible, se prefiere incorporación directa. En un método tal, una solución acuosa del resto de fucoidano se expone generalmente a o se mezcla con una sal metálica. El pH de la mezcla de reacción puede estar entre aproximadamente 4 y aproximadamente 11. Los métodos de incorporación directa son muy conocidos en la técnica y se han descrito diferentes procedimientos (véase, por ejemplo, el documento WO 87/06229). Los presentes solicitantes han mostrado que un fucoidano de bajo peso molecular puede complejarse fácilmente con tecnecio-99m (véase el Ejemplo 2). Se usa un método de transmetalación cuando la entidad metálica necesite reducirse a un estado oxidativo diferente antes de la incorporación. Los métodos de transmetalación son muy conocidos en la técnica. Debe entenderse que, dada la corta vida de ciertos radionúclidos (por ejemplo, <sup>99m</sup>Tc), la incorporación directa puede tener que realizarse poco antes del uso del agente de obtención de imágenes.

Cuando no sea posible la asociación no covalente directa entre los restos de fucoidano y de metal detectable, el agente de obtención de imágenes dirigido a selectina puede comprender al menos un resto de fucoidano asociado a al menos un resto detectable, en el que el resto detectable comprende un resto quelante de metal formando complejo con un resto de metal detectable. La asociación entre el resto de fucoidano y el resto quelante de metal es preferentemente covalente. Restos quelantes de metal adecuados pueden ser cualquiera de un gran número de quelantes de metal y moléculas complejantes de metal conocidas por unirse a restos metálicos detectables. Preferentemente, los restos quelantes de metal son entidades no tóxicas estables que se unen a radionúclidos o iones metálicos paramagnéticos con alta afinidad.

Ejemplos de restos quelantes de metal que se han usado para la complejación de iones metálicos paramagnéticos, tales como gadolinio III (Gd<sup>3+</sup>), incluyen DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético); DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético); y derivados de los mismos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.885.363; 5.087.440; 5.155.215; 5.188.816; 5.219.553; 5.262.532; y 5.358.704; y D. Meyer et al., Invest. Radiol. 1990, 25: S53-55), en particular, derivados de DTPA-bis(amida) (patente de EE.UU. N.º 4.687.659). Otros restos quelantes de metal que complejan iones metálicos paramagnéticos incluyen entidades acíclicas tales como ácidos aminopolicarboxílicos y análogos de oxiácido de fósforo de los mismos (por ejemplo, ácido trietilentetraminahexaacético o TTHA) y difosfato de dipiridoxal (DPDP) y entidades macrocíclicas (por ejemplo, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N''-triacético o DO3A). Restos quelantes de metal también pueden ser cualquiera de las entidades descritas en las patentes de EE.UU. N.º 5.410.043; 5.277.895; y 6.150.376; o en F.H. Arnold, Biotechnol. 1991, 9: 151-156.

Ejemplos de restos quelantes de metal que complejan radionúclidos, tales como tecnecio-99m, incluyen, por ejemplo, quelantes de N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> y N<sub>3</sub>S (A.R. Fritzberg et al., J. Nucl. Med. 1982, 23:592-598; patentes de EE.UU. N.º 4.444.690; 4.670.545; 4.673.562; 4.897.255; 4.965.392; 4.980.147; 4.988.496; 5.021.556 y 5.075.099). Otros restos quelantes de metal adecuados pueden seleccionarse de polifosfatos (por ejemplo, diaminatetrametileno-tetra-fosfonato de etileno, EDTMP); ácidos aminocarboxílicos (por ejemplo, EDTA, ácido N-(2-hidroxi)etileno-diaminatricacético, ácido nitrilotriacético, N,N-di(2-hidroxi)etilglicina, etilbis(hidroxifenilglicina) y ácido dietilentriaminapentaacético); 1,3-dicetonas (por ejemplo, acetilacetona, trifluoroacetilacetona y tenoiltrifluoroacetona); ácidos hidroxicarboxílicos (por ejemplo, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido glucónico y ácido 5-sulfosalicílico); poliaminas (por ejemplo, etilendiamina, dietilentriammina, trietilentetraammina y triaminotrietilammina); aminoalcoholes (por ejemplo, trietanolamina y N-(2-hidroxi)etil)etilendiamina); bases heterocíclicas aromáticas (por ejemplo, 2,2'-diimidazol, amina de picolina, amina de dipicolina y 1,10-fenantrolina); fenoles (por ejemplo, salicilaldehído, disulfopirocatecol y ácido cromotrópico); aminofenoles (por ejemplo, 8-hidroxiquinolina y ácido oximasulfónico); oximas (por ejemplo, hexametilpropilenoamina-oxima, HMPAO); bases de Schiff (por ejemplo, disalicilaldehído 1,2-propilendiimina); tetrapirroles (por ejemplo, tetrafenilporfina y ftalocianina); compuestos de azufre (por ejemplo, toluenoditiol, ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico, dimercaptopropanol, ácido tioglicólico, etilxantato de potasio, dietilditiocarbamato de sodio, ditizona, ácido dietilditiofosfórico y tiourea); compuestos macrocíclicos sintéticos (por ejemplo, dibenzo[18]corona-6), o combinaciones de dos o más de los agentes anteriores.

Como puede apreciarse fácilmente por aquellos expertos en la materia, un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina como se describe en el presente documento puede comprender cualquier número de restos de fucoidano y cualquier número de restos detectables, unidos entre sí por cualquier número de formas diferentes. Los restos de fucoidano dentro de un agente de obtención de imágenes pueden ser todos idénticos o diferentes. Similarmente, los restos detectables dentro de un agente de obtención de imágenes inventivo pueden ser todos idénticos o diferentes. El diseño preciso de un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina estará influido por su fin(es) previsto(s) y las propiedades que son deseables en el contexto particular de su uso.

## II - Usos de agentes de obtención de imágenes dirigidos a selectina

La invención proporciona reactivos y estrategias para obtener imágenes y detectar la presencia de selectinas. Más específicamente, la invención proporciona reactivos elegidos como diana que son detectables por técnicas de obtención de imágenes y métodos que permiten la detección, localización y/o cuantificación de selectinas en sistemas *in vitro* y *ex vivo*, además de en sujetos vivos, que incluyen pacientes humanos. Los métodos descritos en

el presente documento se basan en el uso de agentes de obtención de imágenes dirigidos a selectina que comprenden al menos un resto de fucoidano que tiene una alta afinidad y especificidad por selectinas, asociados a al menos un resto detectable que permite la visualización del agente de obtención de imágenes usando técnicas de obtención de imágenes.

5 Más específicamente, el presente documento describe métodos de detección de la presencia de selectinas en un sistema biológico que comprenden la etapa de poner en contacto el sistema biológico con una cantidad eficaz de un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina, o una composición farmacéutica del mismo. La puesta en contacto se lleva a cabo preferentemente en condiciones que permiten que el agente de obtención de imágenes interactúe con las selectinas presentes en el sistema de manera que la interacción produzca la unión del agente de obtención de imágenes a las selectinas. El agente de obtención de imágenes que está unido a selectinas presentes en el sistema se detecta entonces usando una técnica de obtención de imágenes. Pueden generarse una o más imágenes de al menos parte del sistema biológico.

15 La puesta en contacto puede llevarse a cabo por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la puesta en contacto puede llevarse a cabo por incubación.

20 El sistema biológico puede ser cualquier entidad biológica que pueda producir y/o contener selectinas. Por ejemplo, el sistema biológico puede ser una célula, un fluido biológico o un tejido biológico. El sistema biológico puede originarse a partir de un sujeto vivo (por ejemplo, puede obtenerse por extracción de sangre, o por biopsia) o un sujeto fallecido (por ejemplo, puede obtenerse en la autopsia). El sujeto puede ser humano u otro mamífero. El sistema biológico puede originarse a partir de un paciente que se sospecha que tiene un estado clínico asociado a selectinas.

25 El presente documento también describe métodos de detección de la presencia de selectinas en un paciente. Los métodos comprenden administrar al paciente una cantidad eficaz de un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina, o una composición farmacéutica del mismo. La administración se lleva a cabo preferentemente en condiciones que permitan que el agente de obtención de imágenes (1) llegue a el (las) área(s) del cuerpo del paciente que pueden contener selectinas anormales (es decir, selectinas asociadas a un estado clínico) y (2) interactúe con tales selectinas de manera que la interacción produzca la unión del agente de obtención de imágenes a las selectinas. Después de la administración del agente de obtención de imágenes dirigido a selectina y después de transcurrir el tiempo suficiente para que tenga lugar la interacción, el agente de obtención de imágenes unido a selectinas anormales presente en el paciente se detecta por una técnica de obtención de imágenes. Puede generarse una o más imágenes de al menos parte del cuerpo del paciente.

35 La administración del agente de obtención de imágenes dirigido a selectina, o composición farmacéutica del mismo, puede llevarse a cabo por cualquier método adecuado conocido en la técnica tal como administración por métodos orales y parenterales, que incluyen administraciones intravenosas, intrarteriales, intratecales, intradérmicas e intracavitarias, y métodos enterales.

40 Como se ha mencionado anteriormente, el agente de obtención de imágenes unido a selectinas (presente tanto en un sistema biológico como en un paciente) se detecta usando una técnica de obtención de imágenes tal como ultrasonografía de contrastes potenciados, escintigrafía plana, SPECT, espectroscopía de fluorescencia, o una combinación de las mismas.

45 Los métodos descritos en el presente documento que proporcionan detectar la presencia de selectinas en un paciente o en un sistema biológico obtenido de un paciente pueden usarse para diagnosticar una afección patológica asociada a selectinas. El diagnóstico puede lograrse examinando y obteniendo imágenes de partes de o el cuerpo completo del paciente o examinando y obteniendo imágenes de un sistema biológico (tal como una o más muestras de fluido biológico o tejido biológico) obtenidas del paciente. Se seleccionará uno o el otro método, o una combinación de ambos, dependiendo del estado clínico que se sospecha que afecta al paciente. La comparación de los resultados obtenidos del paciente con datos de estudios de individuos clínicamente sanos permitirá la determinación y confirmación del diagnóstico.

55 Estos métodos también pueden usarse para seguir la progresión de una afección patológica asociada a selectinas. Por ejemplo, esto puede lograrse repitiendo el método durante un periodo de tiempo con el fin de establecer un transcurso de tiempo para la presencia, localización, distribución y cuantificación de selectinas "anormales" en un paciente.

60 Estos métodos también pueden usarse para monitorizar la respuesta de un paciente a un tratamiento para una afección patológica asociada a selectinas. Por ejemplo, se genera una imagen de parte del cuerpo del paciente que contiene selectinas "anormales" (o una imagen de parte de un sistema biológico que se origina del paciente y que contiene selectinas "anormales") antes y después de enviar el paciente a un tratamiento. La comparación de las imágenes "antes" y "después" permite monitorizar la respuesta del paciente a ese tratamiento particular.

65 Afecciones patológicas que pueden diagnosticarse, o cuya progresión puede ser seguida por los métodos descritos

en el presente documento, pueden ser cualquier enfermedad y trastorno conocido por estar asociado a selectinas, es decir, cualquier afección que se caracterice por interacciones no deseables o anormales mediadas por selectinas. Ejemplos de tales afecciones que pueden ser ventajosamente diagnosticadas usando los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan, trombosis, lesión por isquemia miocárdica/reperfusión, accidente cerebrovascular y traumatismo cerebral isquémico, trastornos neurodegenerativos, metástasis tumoral y crecimiento tumoral, y artritis reumatoide.

### III - Composiciones farmacéuticas

En los métodos de detección/obtención de imágenes de selectinas y de diagnóstico de afecciones patológicas asociadas a selectinas descritos en el presente documento, los agentes de obtención de imágenes de la presente invención pueden usarse por sí mismos o como una composición farmacéutica. Por consiguiente, en un aspecto, el presente documento describe el uso de fucoidano para la fabricación de una composición para el diagnóstico de estados clínicos asociados a selectinas. En otro aspecto, el presente documento describe composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina (o cualquier sal fisiológicamente tolerable del mismo), y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La formulación específica dependerá de la vía de administración seleccionada. Dependiendo del tipo particular de afección patológica que se sospecha que afecta al paciente y el sitio del cuerpo que va a examinarse, el agente de obtención de imágenes puede administrarse por vía local o sistémica, administrarse por vía oral (como sólidos, soluciones o suspensiones) o mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, intrarterial, intratecal (es decir, mediante el líquido cefalorraquídeo), intradérmica o intracavitaria).

Frecuentemente, las composiciones farmacéuticas se administrarán mediante inyección. Para administración mediante inyección, las composiciones farmacéuticas de agentes de obtención de imágenes pueden formularse como soluciones acuosas o no acuosas estériles o alternativamente como polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. Tales composiciones farmacéuticas deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y deben preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Vehículos farmacéuticamente aceptables para administración mediante inyección son disolventes o medios de dispersión tales como soluciones acuosas (por ejemplo, solución de Hank, soluciones alcohólicas/acuosas, o soluciones salinas) y vehículos no acuosos (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo). Las composiciones farmacéuticas inyectables también pueden contener vehículos parenterales (tales como cloruro sódico y dextrosa de Ringer) y/o vehículos intravenosos (tales como reforzadores de fluidos y de nutrientes); además de otros excipientes y aditivos no tóxicos farmacéuticamente aceptables convencionales que incluyen sales, tampones y conservantes tales como agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares). La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse añadiendo agentes que pueden retardar la absorción (por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina). El pH y la concentración de los diversos componentes pueden ser fácilmente determinados por aquellos expertos en la materia.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando el (los) compuesto(s) activo(s) y otros componentes en la cantidad requerida de un disolvente apropiado, y entonces esterilizando la mezcla resultante, por ejemplo, por filtración o irradiación. Los métodos de fabricación de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles incluyen técnicas de secado a vacío y de liofilización.

En general, la dosificación de un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina (o composición farmacéutica del mismo) variará dependiendo de consideraciones tales como la edad, sexo y peso del paciente, además de la afección patológica particular que se sospecha que afecta al paciente, el grado de la enfermedad, el (las) área(s) del cuerpo que van a examinarse, y la sensibilidad del resto detectable. También deben tenerse en cuenta factores tales como contraindicaciones, terapias y otras variables para ajustar la dosificación del agente de obtención de imágenes que va a administrarse. Esto, sin embargo, puede ser fácilmente logrado por un médico especializado.

En general, una dosis diaria adecuada de un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina (o composición farmacéutica del mismo) se corresponde con la cantidad más baja de agente de obtención de imágenes (o composición farmacéutica) que es suficiente para permitir la detección/obtención de imágenes de cualquier selectina relevante (es decir, generalmente expresada en exceso) presente en el paciente. Para minimizar esta dosis, se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y preferentemente proximal al sitio que va a examinarse. Por ejemplo, la administración intravenosa es apropiada para la obtención de imágenes del sistema cardio/neurovascular; mientras que la administración intraespinal es más apta para la obtención de imágenes del cerebro y sistema nervioso central.

### IV - Kits

En otro aspecto, la presente invención describe kits que comprenden materiales útiles para llevar a cabo los

métodos de diagnóstico de la invención. Los procedimientos de diagnóstico descritos en el presente documento pueden realizarse por laboratorios clínicos, laboratorios experimentales, o médicos.

5 Un kit comprende puede comprender al menos un fucoidano y al menos una entidad detectable, y, opcionalmente, instrucciones para asociar el fucoidano y la entidad detectable para formar un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina descrito en el presente documento.

10 La entidad detectable es preferentemente un radionúclido de vida corta tal como tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), itrio-91 ( $^{91}\text{Y}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ) y talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ). Preferentemente, el fucoidano y la entidad detectable están presentes, en el kit, en cantidades que son suficientes para preparar una cantidad de agente de obtención de imágenes que es adecuada para la detección de selectinas y el diagnóstico de un estado clínico particular en un sujeto.

15 Además, el kit puede comprender además uno o más de: tampón y/o reactivo de marcado; tampón, reactivo y/o medio de purificación; medios y/o reactivos de inyección. Pueden incluirse en el kit protocolos para usar estos tampones, reactivos y medios para realizar diferentes etapas del procedimiento de preparación y/o administración.

20 Los diferentes componentes incluidos en un kit inventivo pueden suministrarse en una forma sólida (por ejemplo, liofilizado) o líquida. Los kits descritos en el presente documento pueden comprender opcionalmente diferentes recipientes (por ejemplo, vial, ampolla, tubo de ensayo, matraz o botella) para cada componente individual. Cada componente generalmente será adecuado dividido en alícuotas en su recipiente respectivo o provisto en una forma concentrada. También pueden proporcionarse otros recipientes adecuados para realizar ciertas etapas de los métodos de preparación. Los recipientes individuales del kit se mantienen preferentemente en estrecho confinamiento para venta comercial.

25 En ciertas realizaciones, un kit comprende además instrucciones para usar sus componentes para el diagnóstico de estados clínicos asociados a selectinas según un método descrito en el presente documento. Instrucciones para usar el kit según un método descrito en el presente documento pueden comprender instrucciones para preparar un agente de obtención de imágenes del fucoidano y entidad detectable, instrucciones referentes a la dosificación y modo de administración del agente de obtención de imágenes obtenido, instrucciones para realizar la detección de selectinas, y/o instrucciones para interpretar los resultados obtenidos. Un kit también puede contener un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos.

### 35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferidos de preparación y puesta en práctica de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que los ejemplos son para fines ilustrativos solo. Además, a menos que la descripción en un ejemplo se presente en el tiempo pasado, el texto, al igual que el resto de la memoria descriptiva, no pretende sugerir que los experimentos fueran en realidad realizados o los datos fueran en realidad obtenidos.

45 Algunos de los resultados informados a continuación se presentaron en un artículo científico (L. Bachelet et al., "Affinity of low molecular weight fucoïdan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets", *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1790: 141-146). Otros resultados informados más adelante se presentaron en el International Carbohydrate Symposium, Oslo, Noruega, 24 de julio-1 de agosto de 2008 (L. Bachelet et al., "Fucoïdan: A sulfated polysaccharide to target activated platelets in atherosclerosis").

#### 50 Ejemplo 1: Los fucoïdanos LMW son ligandos altamente específicos de P-Selectina

##### Materiales y métodos

55 **Productos químicos.** Se compró isotiocianato de fluoresceína (FITC) de Fluka (Saint-Quentin Fallavier, Francia); conjugado de estreptavidina-peroxidasa de Dako (Trappes, Francia); diaminopropano, cianobromohidruro de sodio y sustrato de peroxidasa ABTS de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia); solución de ácido sinapínico de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE.UU.); y el kit de acoplamiento de aminas y tampón de electroforesis de BIAcore (Uppsala, Suecia).

60 **Polisacáridos.** El fucoïdano de bajo peso molecular (basado en la unidad de fucosa repetitiva sulfatada;  $M = 7200$  g/M;  $\text{SO}_4 = 30\%$  (peso/peso)) se preparó a partir de alga marina marrón como se ha descrito previamente (A. Nardella et al., *Carbohydr. Res.*, 1996, 289: 201-208). La heparina de bajo peso molecular ( $M = 5700$  g/M;  $\text{SO}_4 = 45\%$  (peso/peso)) y el sulfato de dextrano de bajo peso molecular ( $M = 8000$  g/M;  $\text{SO}_4 = 52\%$  (peso/peso)), se suministraron de Sigma-Aldrich; y el glucoconjugado tipo poli(acrilamida) biotinilado que contenía 20 % en moles de SLe<sup>x</sup> se obtuvo de Lectinity Holding (Moscú, Rusia).

65 **Compuestos biológicos.** Se obtuvieron P-selectina humana recombinante (121-124 kDa por SDS-PAGE) y

quimera de P-selectina humana recombinante/Fc (146-160 kDa por SDS-PAGE) de R&D Systems (Lille, Francia); albúmina de suero bovino (BSA), péptido activante de receptor de trombina (TRAP) y adenosín difosfato (ADP) de Sigma-Aldrich, y patrones de péptido y proteína purificados de Bio-Rad Laboratories.

- 5 **Anticuerpos.** La IgG marcada con PC5 (clon MOPC-21), anti-P-selectina humana marcada con PC5 (CD62P, clon AK-4), IgM marcada con FITC y PAC-1 marcado con FITC (dirigido a la conformación activa del complejo de integrina GPIIb/IIIa) se suministraron de BD Biosciences (Le Pont de Claix, Francia); IgG marcada con FITC (clon MOPC-21), anti-CD41 humano marcado con FITC (integrina GPIIb) y IgG de cabra anti-Fc humano-peroxidasa de Beckman-Coulter (Roissy, Francia); IgG de cabra anti-Fc humana de Sigma-Aldrich; anti-P-selectina humana  
10 (CD62P, clon G1) de COGER (Paris, Francia).

**Otros materiales.** Las placas de microtitulación Immulon 1B fueron un regalo de VWR (Fontenay sous Bois, Francia). Se obtuvieron chips de proteínas aniónicas CM10 de Bio-Rad Laboratories; chips sensores CM5 de BIAcore.

- 15 **Marcado con FITC de polisacáridos.** Se añadieron quinientos (500) miligramos de polisacárido y 250 mg de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  a 4 ml de solución de clorhidrato de diaminopropano a 2,5 M. Después de 24 horas a 60 °C, se añadieron 250 mg de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  a la mezcla y la reacción continuó durante 48 horas. Las muestras se dializaron (corte 1000 Da) antes de la liofilización. Se disolvieron ciento cincuenta (150) miligramos de polisacárido aminado en 6 ml de tampón carbonato 0,5 M (pH 9,6). Se añadieron seis (6) miligramos de FITC a la solución que se agitó a 4 °C en la oscuridad durante 2 horas. Después de la neutralización, la solución se dializó (corte 1000 Da) y se liofilizó. El compuesto coloreado se disolvió entonces a 150 mg/ml en NaCl 1 M, se precipitó por etanol y se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos para eliminar la fluoresceína libre. El fucoidano se fluoromarcó satisfactoriamente usando este protocolo con un injerto de  $0,19 \pm 0,06$  de fluoróforo por cadena de polisacárido.

- 25 **Ensayo de unión de P-selectina con sialil Lewis X.** Este protocolo se adaptó de un método previamente descrito (Weitz-Schmidt et al., Anal. Biochem., 1999, 273: 81-88). Se recubrió quimera de P-selectina/Fc (5 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato, PBS, NaCl 137 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM y KCl 2,7 mM, pH=7,2) sobre placas de microtitulación durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con el tampón de ensayo (Hepes 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM y  $\text{CaCl}_2$  1 mM), se bloquearon durante 4 horas a 4 °C con 3 % de BSA en el mismo tampón, y se lavaron otra vez. Se diluyeron polisacáridos o anti-P-selectina humana (clon G1) y polímero de SLe<sup>x</sup> biotinilado en el tampón de ensayo y se añadieron a los pocillos recubiertos de P-selectina o los pocillos recubiertos de BSA (control no específica) para la incubación durante la noche a 4 °C. Entonces se lavaron las placas y se añadió estreptavidina-peroxidasa diluida 1:1000 en el tampón de ensayo a los pocillos. Después de 4 horas a 4 °C, las placas se lavaron con tampón de ensayo. Se añadió solución de sustrato de peroxidasa ABTS y la reacción de color se detuvo después de 10 minutos con 2 % de ácido oxálico. Se determinó el polímero de SLe<sup>x</sup> unido midiendo la densidad óptica a 405 nm usando un lector de microplacas.

- 40 **Ensayo de unión de P-Selectina con PSGL-1.** Se recubrió P-selectina (5 µg/ml en PBS, NaCl 137 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM y KCl 2,7 mM, pH=7,2) sobre placas de microtitulación durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con el tampón de ensayo (Hepes 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM y  $\text{CaCl}_2$  1 mM), se bloquearon durante 4 horas a 4 °C con 3 % de BSA en el mismo tampón, y se lavaron otra vez. Se diluyeron fucoidano y quimera de PSGL-1/Fc en el tampón de ensayo y se añadieron a los pocillos recubiertos de P-selectina o los pocillos recubiertos de BSA (control no específico) para la incubación durante la noche a 4 °C. Entonces se lavaron las placas y se añadió IgG anti-Fc-peroxidasa diluida 1:1000 en el tampón de ensayo a los pocillos. Después de 4 horas a 4 °C, las placas se lavaron con el tampón de ensayo. Se añadió solución de sustrato de peroxidasa ABTS y la reacción de color se detuvo después de 5 minutos con 2 % de ácido oxálico. Se determinó PSGL-1 unido midiendo la densidad óptica a 405 nm usando un lector de microplacas.

- 50 **Análisis de SELDI-TOF.** Se emplearon matrices de chip de proteína aniónica CM10. Los puntos se humedecieron previamente dos veces durante 5 minutos con 5 µl de Hepes a pH 7,0. Las muestras se prepararon mezclando 500 ng de P-selectina humana recombinante en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de polisacáridos (relación molar entre P-selectina y polisacárido de 1 por 1 a 1 por 100), se diluyeron en Hepes 1 M a pH 7,0, en un volumen total de 5 µl, y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Las muestras se aplicaron a los puntos y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Los puntos se lavaron tres veces con 5 µl de Hepes 1 M a pH 7,0 y dos veces con 5 µl de agua destilada y luego se secaron al aire durante 10 minutos. Se aplicó (1) µl de una solución saturada de ácido sinapínico (en 50 % de acetonitrilo, 0,5 % de ácido trifluoroacético) dos veces a cada punto. Las matrices de chip de proteína se analizaron usando un lector de chip de proteína (PBS II, Bio-Rad). Las masas de proteína se calibraron externamente usando patrones de péptido y proteína purificados. Los espectros se analizaron con el software de chip de proteína 3.1.1 (Bio-Rad).

- 65 **Resonancia de plasmones superficiales.** Se usó el biosensor óptico BIAcore 2000. El chip de sensor CM5 de dextrano carboximetilado se acopló con IgG de cabra anti-Fc humano usando química de acoplamiento de amina estándar (promedio 6500 UR). Entonces se capturó la quimera P-selectina humana recombinante/Fc al chip (promedio 1750 UR). Se usó IgG de cabra anti-Fc humano como control no específico. Las muestras se diluyeron en tampón de electroforesis (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y 0,005 % de Tween-20, pH 7,4). Se

seleccionaron celda de flujo, temperatura, caudal, volumen de muestra y mezcla usando el software de control BIAcore. Los sensogramas se analizaron usando el software BIAevaluation.

5 **Citometría de flujo.** Se recogió sangre de donantes adultos sanos en citrato de sodio al 3,8 % (peso/volumen). Se diluyó sangre completa humana citrada (5 µl) a 40 µl con PBS (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM y KCl 2,7 mM, pH=7,2). Las plaquetas se activaron añadiendo ADP a una concentración final de 2,5 µM o TRAP a una concentración final de 200 µM. Se añadieron cinco µl de polisacáridos LMW (marcados con FITC o no, diluidos en PBS) y 5 µl de anticuerpo fluoromarcado (clon AK-4 anti-CD62P marcado con PC5 o PAC-1 marcado con FITC o anti-CD41 marcado con FITC; diluido 8:100; 5:100 y 3:100 en PBS) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las soluciones se diluyeron a 1 ml con PBS antes del análisis por citometría de flujo. Los datos se recogieron en un citómetro de flujo Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter). El análisis de muestras se realizó en dispersión lateral y frontal, y se adquirió fluorescencia en FL1 (fluoresceína) o FL4 (PC5) usando el modo logarítmico. Se recogieron 7500 eventos de cada muestra. El nivel de activación de plaquetas se evaluó por la positividad de anticuerpo anti-P-selectina (CD62P, clon AK-4) (0,4 %, 73,4 % y 97,8 % para plaquetas no activadas, activadas con ADP y activadas con TRAP, respectivamente). Los datos se procesaron usando el software GEN S® System II (Beckman Coulter) y los histogramas se presentan solapados para las diferentes condiciones.

10  
15  
20 **Análisis estadístico.** Los datos mostrados son resultados representativos de al menos tres experimentos idénticos e independientes llevados a cabo cada vez con n≥3 muestras por condiciones. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba de la t de Student.

## Resultados

25 **Fucoidano LMW inhibe la unión de SLe<sup>x</sup> y PSGL-1 a P-selectina.** Se midió la unión de SLe<sup>x</sup>-poliacrilamida-biotina a P-selectina inmovilizada en presencia de fucoidano LMW, heparina y sulfato de dextrano. En este ensayo, un anticuerpo anti-P-selectina humana (clon G1, como control positivo) bloqueó completamente la unión de SLe<sup>x</sup> a P-selectina. La cantidad de SLe<sup>x</sup> unida a P-selectina disminuyó con concentraciones crecientes de polisacáridos. Sin embargo, se observaron diferencias importantes entre los polisacáridos sulfatados (Figura 1). La inhibición por fucoidano fue mucho más pronunciada que con heparina y sulfato de dextrano, con una CI<sub>50</sub> de 20 nM, 400 nM y >25.000 nM, respectivamente. La unión de la quimera de PSGL-1/Fc a P-selectina inmovilizada también se evaluó en presencia de fucoidano LMW. La cantidad de PSGL-1 unido a P-selectina disminuyó al aumentar la concentración de fucoidano con una CI<sub>50</sub> de 5 nM.

30  
35 **Unión de fucoidano LMW a P-selectina.** Entonces se analizó la unión de P-selectina por espectrometría de masas y por resonancia de plasmones superficiales (SPR).

Se analizó la formación de un complejo entre P-selectina y los tres polisacáridos LMW sulfatados y dextrano nativo usando EM SELDI-TOF. Se usaron chips aniónicos sobre la P-selectina unida (punto isoelectrico ~6,5) a pH fisiológico = 7. Entonces, la P-selectina se desorbió por láser y se detectó como un pico ancho de SELDI-TOF de ~100 kDa. La cantidad de P-selectina disminuyó marcadamente en presencia de fucoidano LMW, y en un modo dependiente de la dosis. La retención de P-selectina al chip también disminuyó con heparina, pero no estuvo afectada por la incubación con dextrano nativo o sulfato de dextrano. Estos resultados demuestran que el fucoidano LMW forma un complejo con P-selectina en solución, previniendo así su retención a la superficie aniónica.

40  
45 Las características de unión de polisacáridos LMW sulfatados a P-selectina se compararon además usando análisis de resonancia de plasmones superficiales. Se hicieron circular fucoidano LMW, heparina y sulfato de dextrano sobre un chip sensor recubierto tanto con IgG anti-Fc humano como con quimera de P-selectina humana recombinante/Fc (Figura 2). Todos los polisacáridos unidos a P-selectina y, a un menor grado, a IgG anti-Fc humano, se usaron como control. La diferencia de señal obtenida en P-selectina frente a IgG fue más alta con fucoidano que con heparina o sulfato de dextrano, que sugiere que el fucoidano presenta una mejor selectividad (Figura 2A). Se encontró que las constantes de disociación del fucoidano LMW, heparina y sulfato de dextrano para P-selectina, calculadas usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Figura 2D), eran 1,2 nM, 577 nM y 118 nM, respectivamente. Estos resultados confirmaron que el fucoidano LMW tiene una afinidad por P-selectina al menos dos órdenes de magnitud superior a por los otros dos polisacáridos.

50  
55 **Unión de fucoidano LMW a plaquetas humanas.** Se informó previamente que la heparina se unía a plaquetas (J. Hirsh et al., Chest, 2004, 126: 188S-203S; R. Verhaege, Acta Cardiol., 1998, 53: 15-21). Se realizaron experimentos de citometría de flujo incubando sangre completa citrada humana con fucoidano LMW marcado con FITC. Se informa un experimento representativo en la Figura 3. Las plaquetas se clasificaron en dispersión lateral y frontal y su positividad para un anticuerpo para plaquetas específico fluoromarcado (CD41). El fucoidano marcado con FITC se unió a plaquetas activadas como se demuestra por un desplazamiento de la fluorescencia a la derecha. La unión del fucoidano aumentó con el nivel de activación de plaquetas como se indica por el porcentaje de plaquetas positivas, 34,7 %, 51,4 % y 69,1 % para plaquetas no activadas, activadas con ADP y activadas con TRAP, respectivamente.

60  
65 Las plaquetas activadas con TRAP se incubaron entonces con un anticuerpo anti-CD62P fluoromarcado en sangre

completa en presencia o en ausencia de fucoidano LMW no fluoromarcado. La inhibición de la unión del anticuerpo CD62P a plaquetas activadas se observó en presencia de fucoidano LMW como se indica por una disminución en la intensidad media de fluorescencia (Figura 4). Además, el fucoidano LMW no inhibió la unión del anticuerpo CD41 (integrina GPIIb) o PAC-1 (dirigido a la conformación activa del complejo de integrina GPIIb/IIIa) a plaquetas activadas, que indica que su efecto sobre la unión del anticuerpo CD62P a plaquetas activadas era específico. En conjunto, estos resultados indican que la unión de fucoidano LMW a plaquetas activadas observada en sangre humana completa estuvo mediada por P-selectina.

## Discusión

Los hidratos de carbono sulfatados son conocidos por tener una amplia variedad de actividades biológicas (S. Soeda et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1497: 127-137). Los polisacáridos sulfatados se han descrito previamente como ligandos de P-selectina (A. Varki et al., *PNAS*, 1994, 91: 7390-7397; D. Simonis et al., *Biochemistry*, 2007, 46: 6156-6164), por ejemplo, heparina y heparinas modificadas (A. Koenig et al., *J. Clin. Invest.*, 1998, 101: 877-889), fucoidano de alto peso molecular y sulfato de dextrano (M.P. Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266: 5371-5374). En el presente estudio, se caracterizó la interacción de tres polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular (fucoidano, heparina y sulfato de dextrano) con P-selectina usando cuatro métodos diferentes. El fucoidano LMW es un candidato prometedor para el tratamiento de trastornos inflamatorios (K. Senni et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 2006, 445: 56-64) y enfermedades cardiovasculares (33; 34; F. Zemani et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2008, 28: 644-650). La heparina LMW se usa en el tratamiento de trastornos tromboticos (K.A. Fox et al., *Eur. Heart J.*, 2000, 21: 1440-1449). El sulfato de dextrano sintético y los miméticos también se investigaron como supuestos fármacos en diversas enfermedades, que incluyen enfermedades de infección (J. Neyts et al., *Biochem. Pharmacol.*, 1995, 50: 743-751).

Se cuantificó la inhibición de la unión de SLe<sup>x</sup>/P-selectina en experimentos de ensayos de unión clasificando los polisacáridos del siguiente modo (CI<sub>50</sub>): fucoidano (20 nM) > heparina (400 nM) > sulfato de dextrano (25.000 nM). Como una comparación, Koenig et al. establecieron por ensayos de inhibición que la heparina inhibió P-selectina uniéndose a sialil Lewis X con CI<sub>50</sub> entre 82 y 2400 μM dependiendo del tamaño del fragmento de heparina (A. Koenig et al., *J. Clin. Invest.*, 1998, 101: 877-889). Sin embargo, en su trabajo, sialil Lewis X se inmovilizó, mientras que, en el presente enfoque, es la P-selectina la que se inmovilizó. La importancia funcional de la unión de fucoidano LMW a P-selectina se evidenció por la interferencia en la interacción entre la glucoproteína con su ligando natural PSGL-1.

Se usó espectrometría de masas SELDI-TOF para resaltar la formación de un complejo entre P-selectina y polisacáridos LMW. Esta herramienta ha permitido demostrar la unión de heparina y fucoidano a trombina y la proteasa nexina-I (B. Richard et al., *Thromb. Haemost.*, 2006, 95: 229-235). Los experimentos de EM SELDI-TOF mostraron que, en solución, el fucoidano LMW formó un complejo con P-selectina a pH fisiológico de un modo dependiente de la dosis. La formación de complejos disminuyó la retención de P-selectina a una superficie aniónica.

Se ha estudiado previamente la interacción de polisacáridos sulfatados tales como heparina o fucoidano con diversas proteínas por resonancia de plasmones superficiales (BIAcore®) (32; H. Yu et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1726: 168-176). Por ejemplo, se mostró que un mimético de SLe<sup>x</sup> se une a P-selectina con K<sub>D</sub> de 114 μM (M.E. Beauharnois et al., *Biochemistry*, 2005, 44: 9507-9519) y PSGL-1 se une a P-selectina con K<sub>D</sub> de 320 nM (P. Mehta et al., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 32506-32513). La constante de disociación de heparina LMW para P-selectina calculada aquí, con una K<sub>D</sub> superior a 500 nM, está en el mismo intervalo que aquella de las tres heparinas sin fraccionar determinada por mediciones de microscopio de cristal de cuarzo en el estudio de Simonis et al. (*Biochemistry*, 2007, 46: 6156-6164). De forma interesante, este resultado demostró que el fucoidano LMW con un K<sub>D</sub> en el intervalo nanomolar es el ligando de P-selectina más eficaz y selectivo cuando se compara con otros polisacáridos LMW, PSGL-1 y el mimético de SLe<sup>x</sup>. Además, la interacción P-selectina/fucoidano LMW es más fuerte que la interacción de L-selectina/GlyCAM-1, también implicada en el rodamiento de leucocitos en el endotelio de vasos sanguíneos. Se determinó que la constante de interacción de esta interacción era 108 μM por Nicholson et al. (*J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 763-770).

Se mostró que las heparinas nativas y fraccionadas interaccionaban con P-selectina en células HL-60 (Y. Gao et al., *Mol. Cells*, 2005, 19: 350-355). Con el fin de determinar si la unión de fucoidano a P-selectina observada usando proteínas purificadas podría producirse en condiciones más complejas, se analizó la interacción de polisacáridos LMW con plaquetas humanas en sangre completa. Usando citometría de flujo, se encontró que el fucoidano LMW se unía a plaquetas activadas y se encontró que el nivel de unión se correlacionaba con el grado de activación de plaquetas. Además, el fucoidano LMW fue capaz de inhibir la unión de un anticuerpo anti P-selectina a plaquetas humanas activadas.

### Ejemplo 2: Fucoidano marcado con <sup>99m</sup>Tc como agente de obtención de imágenes dirigido a P-selectina para la detección escintigráfica *in vivo* de la activación y acumulación de plaquetas

Se marcó fucoidano con tecnecio-99m (<sup>99m</sup>Tc) usando la reacción estannosa clásica en solución. Brevemente, se añadieron 4 μl de cloruro estannoso, seguido de 2 μl de borohidruro de potasio, a 10 μl de fucoidano (1 mg/ml,

MW=7200). Inmediatamente después de la combinación de estos reactivos, se añadieron suavemente 50 µl de <sup>99m</sup>Tc (correspondiente a 15-30 mCi) a la mezcla. La reacción de marcado se completó después de 1 hora de incubación. El control del marcado se realizó usando cromatografía en papel de capa fina y metilcetona como eluyente. El porcentaje de marcado fue del 100 %.

5 Se usaron modelos de rata de vegetaciones endocárdicas, trombos aneurismáticos y auriculares como modelos animales de estados clínicos asociados a la activación de plaquetas y formación de fibrina. La inyección intravenosa de 1 µg de fucoidano marcado con <sup>99m</sup>Tc permitió la visualización *in vivo* de vegetaciones endocárdicas ricas en plaquetas (Figura 5), trombos auriculares (Figura 6) y aneurismáticos (Figura 7). Estos datos *in vivo* se confirmaron por autorradiografía *ex vivo* que muestra la co-localización histológica exacta de la señal con vegetaciones de las válvulas o trombo con una relación de señal cuantitativa con respecto a fondo muy alta de 8 a 10.

15 El desarrollo de fucoidano como radiotrazador para la obtención de imágenes de selectina puede considerarse en varias etapas: (1) capacidad para visualizar la expresión de P-selectina en exceso por endotelio agudamente activado (modelo de isquemia-reperusión); (2) capacidad para visualizar la expresión de E-selectina en exceso por endotelio crónicamente estimulado (modelo L-NAME de hipertensión); y (3) capacidad o no para visualizar la acumulación de L-selectina en la formación de ganglios linfáticos terciarios (aloinjerto aórtico en ratas) y en miocarditis autoinmune.

### 20 **Ejemplo 3: Preparación de partículas de USPIO recubiertas de fucoidano**

(no forma parte de la invención reivindicada)

25 30 Los presentes solicitantes han desarrollado cinco estrategias diferentes para recubrir fucoidano sobre partículas de USPIO.

30 La primera estrategia implica la síntesis de partículas de hierro en presencia de fucoidano sin modificar. Los solicitantes han aplicado un método de síntesis previamente descrito con dextrano (R.S. Molday et al., J. Immunol. Methods, 1982, 52: 353-367) sustituyendo dextrano MW 40000 con fucoidano MW 50500. Se obtuvieron nanopartículas de hierro recubiertas con fucoidano. Sin embargo, se encontró que estas partículas eran inestables en agua.

35 La segunda estrategia comprende el recubrimiento de un ferrofluido ácido con fucoidano sin modificar. El fucoidano se incubó con ferrofluido ácido. Se obtuvieron nanopartículas de hierro recubiertas con fucoidano que eran estables en medio acuoso a pH 7,4, pero inestables en tampones con fuerza iónica de 0,15 M, que se usan en la mayoría de las aplicaciones. La síntesis podría obtenerse en presencia de un conector (A. San Juan et al., J. Biomed. Mater. Res. A, 2007, 82: 354-362) para aumentar la estabilidad de las nanopartículas.

40 Se han desarrollado otras tres estrategias que se basan en el injerto de fucoidano a nanopartículas de magemita γFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mediante un conector cruzado (estrategia 3), o el acoplamiento de fucoidano a nanopartículas de magemita γFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> recubiertas con dextrano, es decir, recubiertas con carboximetildextrano o CMD (estrategia 4) o recubiertas con dextrano oxidado (estrategia 5). En todas estas estrategias, la primera etapa es funcionalizar el extremo reductor del fucoidano con una amina primaria para permitir la posterior reacción sin alterar la estructura de la cadena de fucoidano y, por tanto, su afinidad por P-selectina.

45 En la estrategia 3, las nanopartículas de hierro se tiolaron con ácido dimercaptosuccínico (DMSA) como se describe previamente (patente francesa N.º 2 736 197; N. Fauconnier et al., J. Colloid Interface Sci., 1997, 194: 427-433), y entonces se unieron al fucoidano aminado por un puente disulfuro usando un conector heterobifuncional, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (J. Roger et al., Eur. Phys. J. Applied Phys., 1999, 5: 321-325). Se obtuvieron nanopartículas de hierro recubiertas con un fucoidano LMW (MW = 7200) que se encontró que eran estables en tampón acuoso usual a pH 7,4 con fuerza iónica de 0,15 M.

50 En la estrategia 4, se incubó CMD (MW = 15000) con ferrofluido ácido para obtener nanopartículas de hierro recubiertas con CMD estables en tampón acuoso usual a pH 7,4 con fuerza iónica de 0,15 M. El fucoidano aminado se injertó en estas nanopartículas usando química de acoplamiento de aminas estándar (con el sistema EDC/NHS).

En la estrategia 5, se injerta fucoidano aminado en nanopartículas recubiertas de dextrano oxidadas por formación de bases de Schiff.

### 60 **Ejemplo 4: Preparación de microburbujas y liposomas acústicamente activos recubiertos de fucoidano**

(no forma parte de la invención reivindicada)

65 Se investigan varias estrategias para injertar fucoidano en agentes de obtención de imágenes de contraste basados en ultrasonidos. En un primer enfoque, el fucoidano aminado se injerta a microburbujas rellenas de perfluorobutano basadas en fosfolípidos usando química de acoplamiento de amina estándar como se describe previamente por

5 Villanueva et al. (Circulation, 1998, 98: 1-5). Brevemente, el perfluorobutano se dispersó por sonicación en medio acuoso que contenía fosfatidilcolina, un tensioactivo, un derivado de fosfatidiletanolamina y un derivado de fosfolípido que contiene grupos carboxilo que se activaron con 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y fucoidano aminado, luego se unieron covalentemente mediante grupos amino primarios con formación de enlaces amina.

10 Una segunda estrategia es injertar fucoidano biotinilado a microburbujas rellenas de perfluorobutano basadas en fosfolípidos mediante una química de conexión multi-etapa de avidina/biotina como se describe previamente por Weller et al. (Biotechnol. Bioeng., 2005, 92: 780-788). Brevemente, se sonicó una solución salina acuosa que contenía fosfatidilcolina, estearato de polietilenglicol y un derivado biotinilado de fosfatidiletanolamina con perfluorobutano. Las microburbujas formadas se incubaron con estreptavidina, y luego una cantidad de saturación de fucoidano biotinilado.

15 Se obtuvo fucoidano biotinilado usando un método previamente descrito por Osmond et al. (Anal. Biochem., 202, 310(2), 199-207) para la biotinilación de una heparina aminada. Brevemente, se añadió 6-(biotinamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-NHS-LC-biotina) a una solución de fucoidano aminado en tampón carbonato 0,1 M a pH=8 con una relación molar entre fucoidano aminado y sulfo-NHS-LC-biotina de 1 a 10. La mezcla se agitó con vórtex y se removió durante la noche a 4 °C, y entonces se dializó (corte 1000 Da) contra agua bidestilada antes de la liofilización.

20 Finalmente, un tercer enfoque es injertar fucoidano a liposomas acústicamente activos usando una química de tiol como se describe previamente por Hamilton et al. (Circulation, 2002, 105: 2772-2778). Brevemente, se disolvieron los fosfolípidos componentes (fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, derivado de fosfatidiletanolamina y colesterol) en cloroformo y se mezclaron y la película resultante se sonicó en agua para formar liposomas; se hizo reaccionar fucoidano aminado con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridiltio)propiónico (SPDP). El derivado de fucoidano se redujo entonces en solución de ditiotretol y el fucoidano tiolado se conjugó entonces con liposomas.

#### 30 **Ejemplo 5: Fucoidano sustituido con tirosina yodada para radiografía de rayos X**

(no forma parte de la invención reivindicada)

35 Otra posibilidad para el radiomarcado del fucoidano es el uso de yoduro de sodio después del injerto de un resto de tirosina en el extremo reductor del polisacárido. La etapa de sustitución es similar a la etapa de aminación descrita en el Ejemplo 1.

40 Brevemente, se añadieron 200 mg de polisacárido y 100 mg de NaBH<sub>3</sub>CN a 1,6 ml de una solución de clorhidrato de tirosina a 2,5 M. Después de 24 horas a 60 °C, se añadieron 100 mg de NaBH<sub>3</sub>CN a la mezcla y la reacción se prolongó durante 48 horas. La muestra se dializó (corte 1000 Da) contra agua bidestilada antes de la liofilización; se recuperó fucoidano modificado en un rendimiento del 50-70 % con un injerto de 0,05 de tirosina por cadena de polisacárido.

45 La yodación se realizó usando cloramina-T del siguiente modo: Se añadieron 20 µmoles de fucoidano modificado (14,5 mg) en 450 µl de solución salina de tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4 (PBS) a una solución de NaI (150 µl de 8 % en peso/volumen de solución en PBS), seguido de la adición de 350 µl de una solución de cloramina-T (40 mg/ml en PBS). La mezcla se agitó con vórtex y se removió durante la noche a 4 °C. La mezcla de reacción se dializó entonces contra agua bidestilada (corte 1000 Da) y se liofilizó para conseguir el fucoidano modificado yodado en rendimiento cuantitativo.

#### 50 **Otras realizaciones**

55 Otras realizaciones de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de una consideración de la memoria descriptiva o práctica de la invención desvelada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren a modo de ejemplo solo, estando el verdadero alcance de la invención indicado por las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un agente de obtención de imágenes que comprende al menos un fucoidano formando directamente complejo con al menos un resto detectable, en el que el agente de obtención de imágenes se dirige a selectina, en el que el resto detectable es detectable por escintigrafía plana (PS) o por tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), y en el que el resto detectable está seleccionado del grupo que consiste en tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), itrio-91 ( $^{91}\text{Y}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ) y talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ).
2. El agente de obtención de imágenes dirigido a selectina según la reivindicación 1, en el que el al menos un fucoidano se une a al menos una selectina humana seleccionada del grupo que consiste en P-selectina, L-selectina y E-selectina, con una constante de disociación de entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 500 nM, preferentemente entre aproximadamente 0,5 nM y aproximadamente 10 nM, más preferentemente entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 5 nM.
3. El agente de obtención de imágenes según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el al menos un fucoidano tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 a aproximadamente 8000 Da, o de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 70.000 Da, o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 500.000 Da.
4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una sal fisiológicamente tolerable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en la detección y/u obtención de imágenes de selectinas.
6. Un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una composición farmacéutica según la reivindicación 4 para su uso en el diagnóstico de un estado clínico asociado a selectinas.
7. Un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina o una composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 6, en el que el estado clínico asociado a selectinas es un miembro del grupo que consiste en trombosis, lesión por isquemia miocárdica/reperfusión, accidente cerebrovascular y traumatismo cerebral isquémico, trastornos neurodegenerativos, metástasis tumoral y crecimiento tumoral, y artritis reumatoide.
8. Un método de detección de la presencia de selectinas anormales en una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de:
- poner en contacto la muestra biológica con una cantidad eficaz de un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una composición farmacéutica según la reivindicación 4, y detectar cualquier selectina unida al agente de obtención de imágenes usando una técnica de obtención de imágenes.
9. El método según la reivindicación 8, en el que la muestra biológica está seleccionada del grupo que consiste en una célula, un fluido biológico y un tejido biológico.
10. El método según la reivindicación 8, en el que la muestra biológica es una muestra biológica obtenida de un paciente que se sospecha que tiene un estado clínico asociado a selectinas, y dicho método se usa para diagnosticar el estado clínico asociado a selectinas o en el que el sistema biológico es un sistema biológico obtenido de un paciente que ha recibido un tratamiento para un estado clínico asociado a selectinas, y dicho método se usa para monitorizar la respuesta del paciente al tratamiento.
11. El método según la reivindicación 10, en el que el estado clínico asociado a selectinas es un miembro del grupo que consiste en trombosis, lesión por isquemia miocárdica/reperfusión, accidente cerebrovascular y traumatismo cerebral isquémico, trastornos neurodegenerativos, metástasis tumoral y crecimiento tumoral, y artritis reumatoide.
12. Un kit para el diagnóstico *in vitro* de un estado clínico asociado a selectinas en un paciente o para la detección de selectinas anormales en un sistema biológico, comprendiendo el kit un fucoidano, un resto detectable seleccionado del grupo que consiste en tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), itrio-91 ( $^{91}\text{Y}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ) y talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), e instrucciones para preparar un agente de obtención de imágenes dirigido a selectina según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y opcionalmente que comprende además instrucciones para diagnosticar el estado clínico usando el agente de obtención de imágenes dirigido a selectina y/o instrucciones para detectar selectinas anormales en el sistema biológico usando el agente de obtención de imágenes dirigido a selectina.

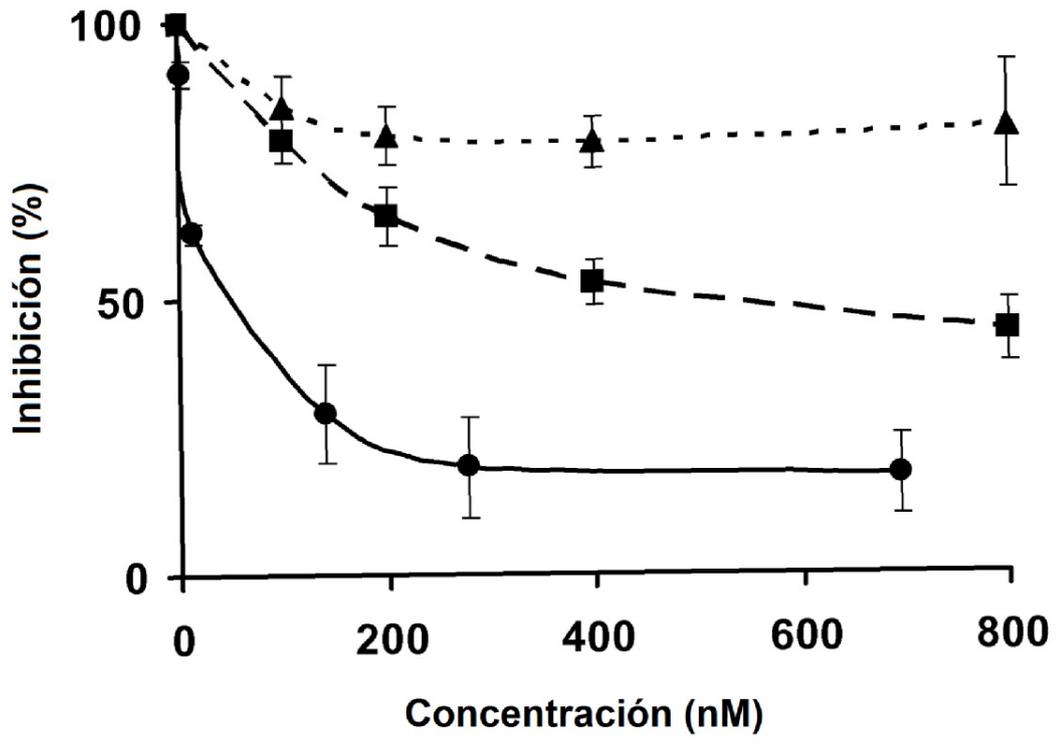


Figura 1

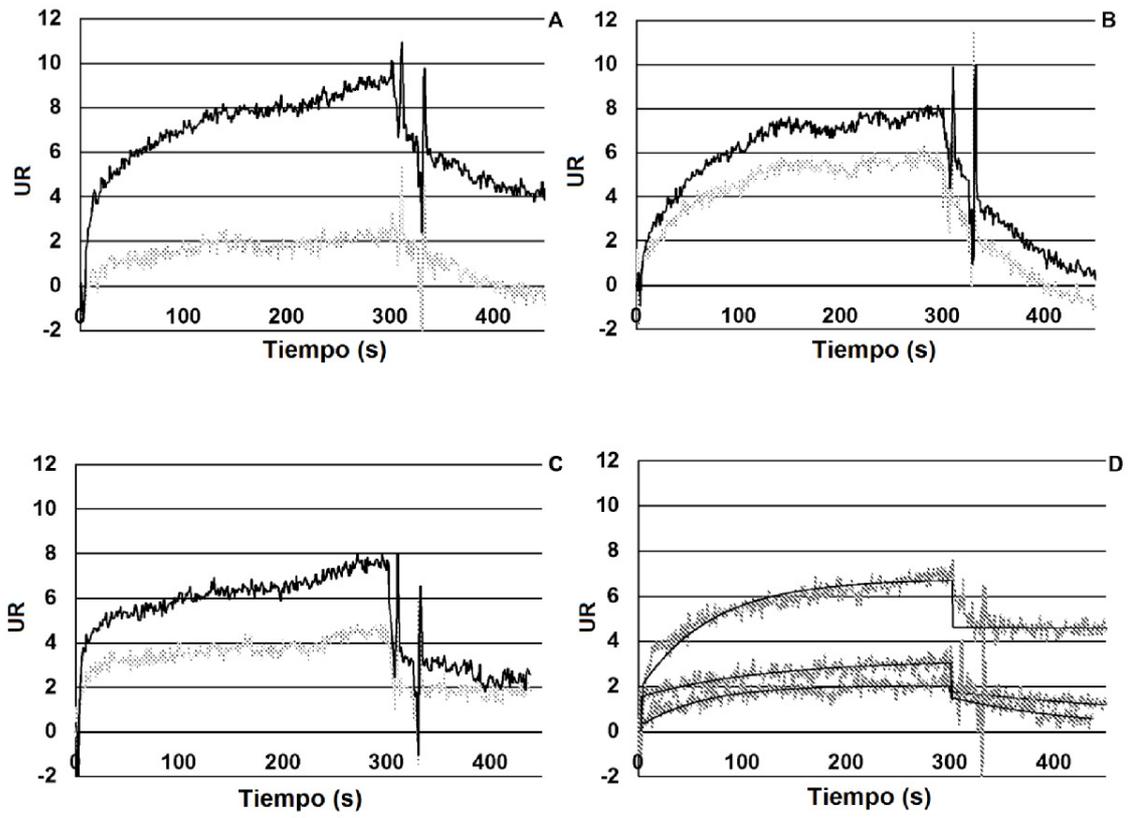


Figura 2

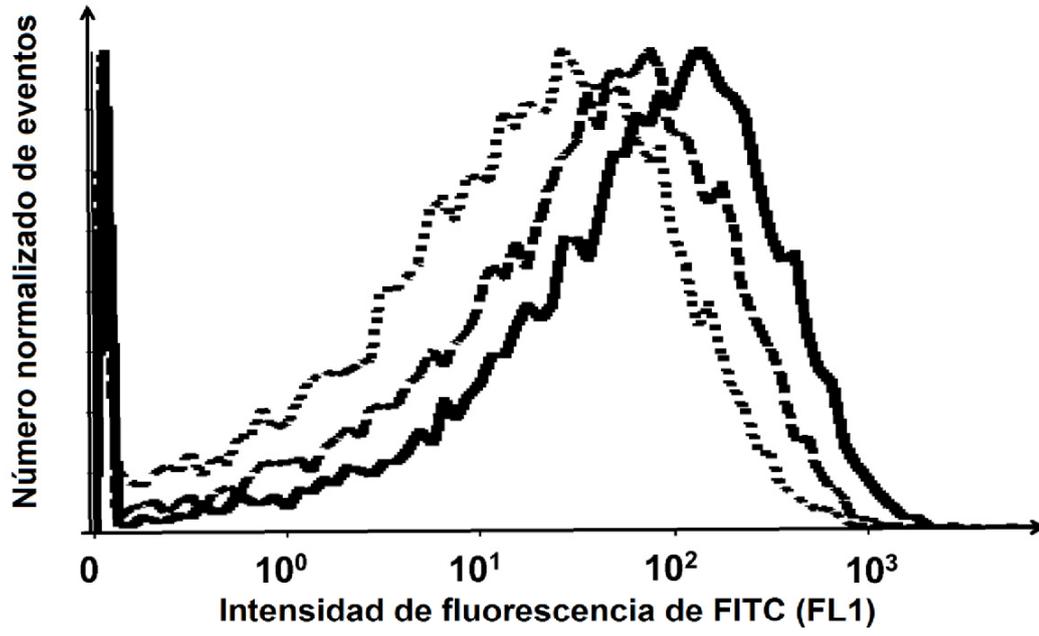


Figura 3

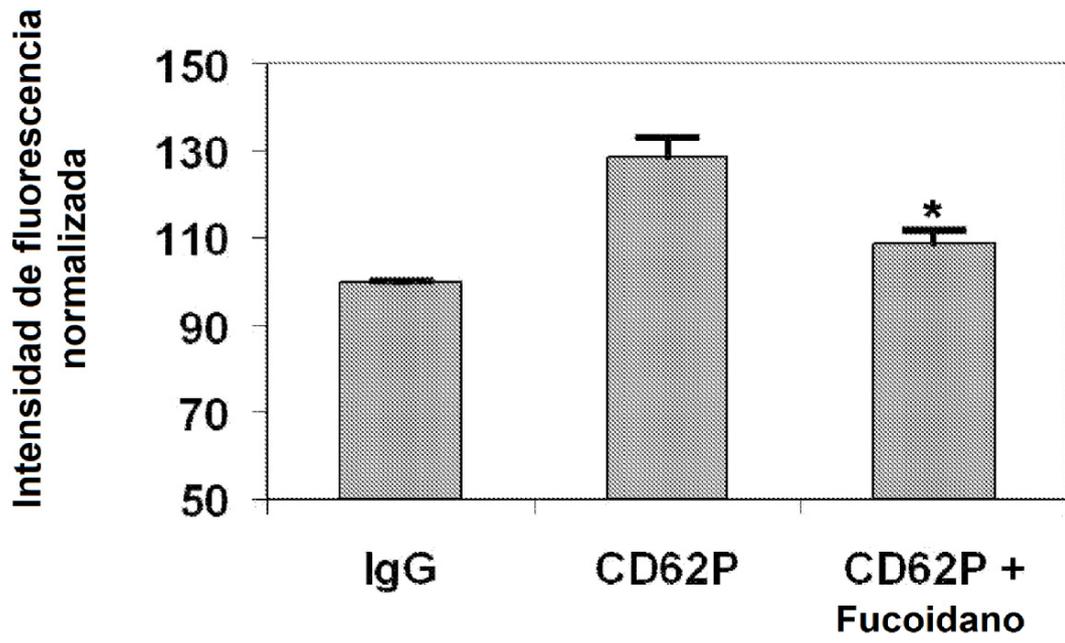
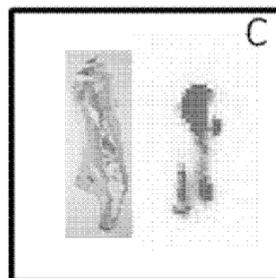
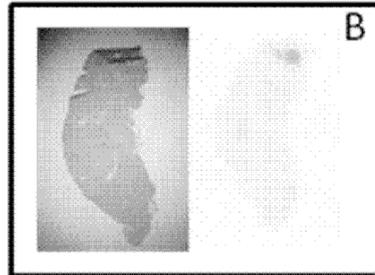
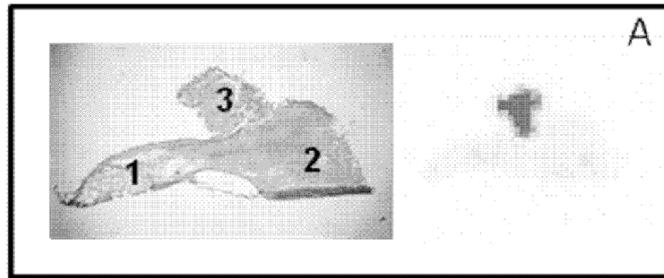
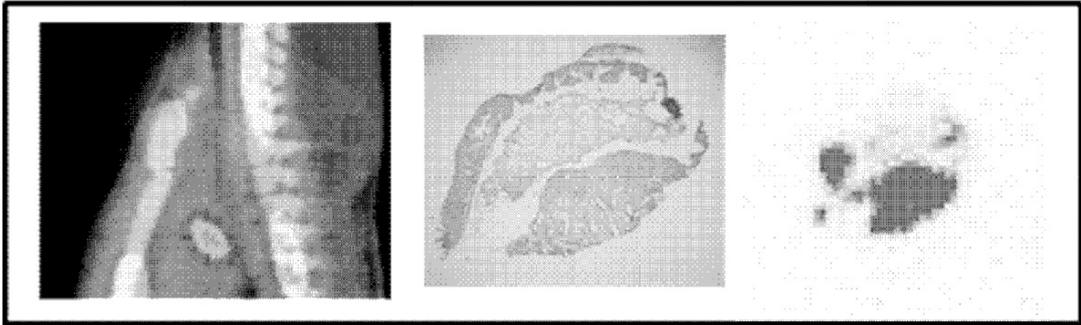


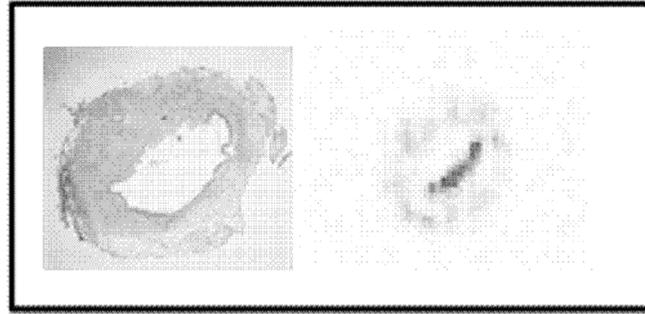
Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**