

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 948**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**A61K 31/737** (2006.01)

**A61K 36/03** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2008 E 12175889 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2532686**

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

30 Prioridad:

**23.02.2007 US 891287 P**

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

**28.09.2018**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)**

**Zählerweg 4**

**6300 Zug, CH y**

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SHAKLEE, PATRICK N.;**

**BAHR-DAVIDSON, JENNIFER;**

**PRASAD, SRINIVASA y**

**JOHNSON, KIRK**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 683 948 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de procedimiento para la purificación de fucoidano a partir de extractos de algas marinas

5 **Campo técnico**

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

**Antecedentes**

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

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

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

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

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

**Sumario de la invención**

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

Por consiguiente, la invención objeto incluye un método para enriquecer fucoidano de una mezcla heterogénea, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una fuente de fucoidano;

5 (b) eliminar iones de metales pesados de dicha fuente tratando con un agente quelante para producir una primera mezcla de fucoidano;

(c) precipitar selectivamente el fucoidano presente en dicha primera mezcla de fucoidano para eliminar contaminantes;

10 (d) resuspender el precipitado que contiene fucoidano en disolución acuosa para producir una segunda mezcla de fucoidano;

(e) repetir las etapas (c) y (d) una o más veces; y

15 (f) filtrar la disolución acuosa que comprende fucoidano para eliminar contaminantes bacterianos y de endotoxinas para dar extracto de fucoidano purificado.

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

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

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

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

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

55 Estas y otras realizaciones de la invención objeto se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica en vista de la divulgación en el presente documento.

#### Breve descripción de los dibujos

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

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

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

fucoidano.

### Descripción detallada de la invención

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

15 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en el presente documento, ya sea anterior o posteriormente, se incorporan por el presente documento como referencia en su totalidad.

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

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

### 1. Definiciones

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

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

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa  $\pm$  aproximadamente el 10% del valor que modifica.

40 El término "biológicamente activo" se refiere a una proteína que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de una molécula que se produce de manera natural.

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

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

55 Una composición que contiene A está "sustancialmente libre de" B cuando al menos aproximadamente el 80% en

peso de A+B total en la composición es A. Preferiblemente, A comprende al menos aproximadamente del 85% al 95% en peso del total de A+B en la composición.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 60 2. Modos de llevar a cabo la invención

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

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

## 5 A. Producción de fucoidano

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

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

### 15 Fucoidano

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

### Agentes quelantes

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

### Precipitación selectiva de fucoidano

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

### Filtración

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

### Análisis de fucoidano purificado

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

láser (DLL), espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-EM) y CG-EM.

#### B Composiciones farmacéuticas

5 El fucoídano purificado puede formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, hidratos de carbono, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y combinaciones de los mismos. Los excipientes adecuados para composiciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina, aceites vegetales, fosfolípidos y tensioactivos. Un hidrato de carbono tal como un azúcar, un  
10 azúcar derivatizado tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar puede estar presente como excipiente. Los excipientes de hidrato de carbono específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil-sorbitol, mioinositol y similares. El excipiente también puede incluir una sal inorgánica o tampón tal como ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y combinaciones de los mismos.

20 Una composición, tal como se obtiene mediante el método de la invención, también puede incluir un agente antimicrobiano para prevenir o impedir el crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitativos de agentes antimicrobianos adecuados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercurio, timerosal y combinaciones de los mismos.

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

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

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

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

La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la naturaleza y función del excipiente y de las necesidades particulares de la composición. Normalmente, la cantidad óptima de cualquier  
55 excipiente individual se determina mediante experimentación de rutina, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan de entre bajas y altas), examinando la estabilidad y otros parámetros y luego determinando el intervalo en el que se obtiene rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos. Generalmente, sin embargo, el/los excipiente(s) estará(n) presente(s) en la composición en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso, preferiblemente de aproximadamente el  
60 5% a aproximadamente el 98% en peso, más preferiblemente de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 95% en peso del excipiente, siendo las más preferidas concentraciones inferiores al 30% en peso. Estos excipientes farmacéuticos anteriores, junto con otros excipientes, se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19<sup>a</sup> ed., Williams & Williams (1995), la "Physician's Desk Reference", 52<sup>a</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998) y Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>a</sup> edición, American Pharmaceutical  
65 Association, Washington, D.C., 2000.

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

Las preparaciones farmacéuticas en el presente documento también pueden almacenarse en una jeringuilla, un dispositivo de implantación, o similares, dependiendo del modo previsto de administración y uso. Preferiblemente, las composiciones de fucoidano descritas en el presente documento están en forma de dosificación unitaria, que significa una cantidad de un conjugado o composición tal como se obtiene mediante el método de la invención apropiado para una dosis única, en una forma previamente medida o previamente envasada.

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

### C. Administración

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

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

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

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

En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden fucoidano y/u otros agentes se administran

profilácticamente, por ejemplo, antes de la cirugía planeada. Tales usos profilácticos serán de valor particular para sujetos con trastornos de la coagulación de la sangre preexistentes conocidos.

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

10 La memoria descriptiva también proporciona un método para administrar un conjugado que comprende fucoidano tal como se proporciona en el presente documento a un paciente que padece una afección que es sensible al tratamiento con fucoidano contenido en el conjugado o composición. El método comprende administrar, mediante cualquiera de los modos descritos en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz del sistema de administración de conjugado o fármaco, preferiblemente proporcionado como parte de una composición farmacéutica. El procedimiento de administración puede usarse para tratar cualquier afección que sea sensible al tratamiento con fucoidano. Más específicamente, las composiciones en el presente documento son eficaces en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, que incluyen hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto tales como factor XI, factor XII, precalicreína y quininógeno de alto peso molecular (HMWK), una deficiencia de uno o más factores asociados a hemorragia clínicamente significativa, tales como factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, que incluye afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa<sub>2</sub>-antiplasmina y sangrado excesivo tal como el producido por enfermedad del hígado, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo.

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

20 Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará entre aproximadamente 0,01 mg/kg y 200 mg/kg de un fucoidano al día, más preferiblemente entre aproximadamente 0,01 mg/kg y 20 mg/kg al día, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 0,02 mg/kg y 2 mg/kg al día. Preferiblemente, tales dosis están en el intervalo de 0,01-50 mg/kg cuatro veces al día (QID), 0,01-10 mg/kg QID, 0,01-2 mg/kg QID, 0,01-0,2 mg/kg QID, 0,01-50 mg/kg tres veces al día (TID), 0,01-10 mg/kg TID, 0,01-2 mg/kg TID, 0,01-0,2 mg/kg TID, 0,01-100 mg/kg dos veces al día (BID), 0,01-10 mg/kg BID, 0,01-2 mg/kg BID, o 0,01-0,2 mg/kg BID y del 0,1 al 10% para aplicaciones individuales y múltiples tópicos al día. La cantidad del compuesto administrado dependerá de la potencia del fucoidano específico y la magnitud o efecto procoagulante deseado y la vía de administración.

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

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

## F. Aplicaciones

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

En un aspecto, el extracto de fucoidano purificado puede usarse en los métodos de la invención para mejorar la hemostasia en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, particularmente aquellos asociados a deficiencias de los factores de coagulación o para invertir los efectos de anticoagulantes en un sujeto. El fucoidano puede administrarse a un sujeto para tratar trastornos hemorrágicos, que incluyen trastornos de la coagulación congénitos, trastornos de la coagulación adquiridos y afecciones hemorrágicas inducidas por traumatismo. Los ejemplos de trastornos hemorrágicos que pueden tratarse con fucoidano incluyen, pero no se limitan a, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, trombocitopenia idiopática, una deficiencia de uno o más factores de contacto tales como factor XI, factor XII, precalicreína y quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), una deficiencia de uno o más factores asociados a hemorragia clínicamente significativa tales como factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II (hipoprotrombinemia) y factor de von Willebrand, una deficiencia de vitamina K, un trastorno de fibrinógeno, que incluye afibrinogenemia, hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia, una deficiencia de alfa<sub>2</sub>-antiplasmina y sangrado excesivo tal como el producido por enfermedad del hígado, enfermedad renal, trombocitopenia, disfunción plaquetaria, hematomas, hemorragia interna, hemartrosis, cirugía, traumatismo, hipotermia, menstruación y embarazo. En determinadas realizaciones, el fucoidano se usa para tratar trastornos de la coagulación congénitos que incluyen hemofilia A, hemofilia B y enfermedad de von Willebrand. En otras realizaciones, el fucoidano se usa para tratar trastornos de la coagulación adquiridos que incluyen deficiencias del factor VIII, factor de von Willebrand, factor IX, factor V, factor XI, factor XII y factor XIII, particularmente trastornos producidos por inhibidores o autoinmunidad contra factores de la coagulación de la sangre, o trastornos hemostáticos producidos por una enfermedad o afección que produce síntesis reducida de factores de coagulación.

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

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

En determinadas realizaciones, el extracto de fucoidano purificado puede administrarse solo o coadministrarse con

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

En otro aspecto, la memoria descriptiva proporciona un método para mejorar la coagulación en un sujeto que recibe un procedimiento quirúrgico o invasivo, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende fucoidano purificado al sujeto. En determinadas realizaciones, el fucoidano puede administrarse solo o coadministrarse con uno o más fucoidanos diferentes y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos al sujeto que experimenta un procedimiento quirúrgico o invasivo. Por ejemplo, al sujeto puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en factor XI, factor XII, precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II, factor VIIa y factor de von Willebrand. El tratamiento puede comprender además administrar un procoagulante, tal como un activador de la ruta de coagulación intrínseca, que incluye factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y VIIIa, precalicreína y quinínogeno de alto peso molecular; o un activador de la ruta de coagulación extrínseca que incluye factor tisular, factor VIIa, factor Va y factor Xa.

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

### 3. Parte experimental

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

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

#### Ejemplo 1

Ensayo de purificación de fucoidano 1

##### *Día 1*

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

##### *Día 2*

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

##### *Día 3*

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

#### 5 *Día 4*

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

El rendimiento del producto fue de 26,4 gramos (rendimiento del 52,8% en peso). Se etiquetó el producto como lote/ensayo 1 y se colocó en bolsas de polietileno dobles para el almacenamiento.

#### Ejemplo 2

Ensayo de purificación de fucoidano 2

25

#### *Día 1*

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

#### 40 *Día 2*

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

#### *Día 3*

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

#### *Día 4*

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

65

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

### 5 Ejemplo 3

#### Análisis de muestras de fucoidano

10 Se caracterizaron muestras de extractos de fucoidano purificados del ensayo 1 (ejemplo 1) y ensayo 2 (ejemplo 2) y se compararon con extracto de fucoidano en bruto (NPNutra, lote n.º 050316-FU-85). Se realizaron análisis de las muestras por Bay Bioanalytical Laboratory, Inc. (BBL, Hercules, CA). La caracterización de extractos de fucoidano incluyó cromatografía de exclusión molecular con detección de dispersión de luz láser (DLL), contenido de fucosa y xilosa, contenido de agua, metales pesados, sulfato y análisis elemental. Se usó cromatografía de exclusión molecular con DLL para medir el peso molecular promedio. La fucosa y xilosa se determinaron hidrolizando el fucoidano y midiendo el contenido de fucosa y xilosa por HPLC usando una columna diseñada para separar hidratos de carbono pequeños. El contenido de hidratos de carbono total también se estimó usando un ensayo de fenol-ácido sulfúrico con fucosa como el patrón. El contenido de agua se midió usando un ensayo de Karl Fischer (KF). El sulfato se midió por cromatografía de intercambio iónico y los cationes (principalmente sodio, potasio y otros metales pesados) se midieron por ICP-EM. Además, se realizó análisis de la composición elemental (CHNS) en muestras. El 15 20 Centro de Investigación de Hidratos de Carbono Complejos (Universidad de Georgia, Athens, Georgia) realizó análisis de monosacáridos mediante CG/EM tras la preparación de metilglucósidos per-O-trimetilsililados de la muestra. La endotoxina por LAL se determinó en Avigen. Los resultados se resumen en la tabla 1.

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

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

Los análisis de muestras se describen en más detalle a continuación.

#### 30 A. Dispersión de luz láser (DLL)

Los extractos de fucoidano se analizaron para determinar el peso molecular usando HPLC de exclusión molecular

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

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

- 10 Se realizó calibración del instrumento usando NIST BSA lote 927c con un índice diferencial del valor de refracción (dn/dc) de 0,185 ml/g. Los cálculos para el peso molecular del control de dextrano se basaron en un dn/dc de 0,147 ml/g, tal como se informa por American Polymer Standards. Los cálculos de peso molecular de las muestras usaron un dn/dc de 0,137 ml/g, que se obtuvo del soporte técnico de Sigma. Se hicieron inyecciones individuales para cada muestra.

- 15 Los resultados de las mediciones de peso molecular (MW) de las muestras de fucoídano se resumen en la tabla 2.

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

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

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

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

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

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

35 Instrumentación y parámetros

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

Se determinó el contenido de fucosa y xilosa en los tres extractos de fucoídano por HPLC tras la hidrólisis en HCl 2 N a 60°C durante 22 horas. Los resultados se resumen en la tabla 3A. Los valores de % en peso/peso en las

tablas se han corregido para el aumento de agua durante la hidrólisis: ((164-18)/164) % en peso/peso de fucosa o ((150-18)/150) % en peso/peso de xilosa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C. Contenido de agua

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

Tabla 4. Contenido de agua

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

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

D. Metales, análisis elemental y análisis de sulfato

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

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

Tabla 5. Contenido de sulfato

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

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

Tabla 6A. Elementos más abundantes

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

10

Tabla 6B. Contaminantes traza

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

15

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

20

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

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

Nitrógeno	0,7	0,2	0,3	0
Azufre	6,6	6,2	6,0	14,2

Tabla 7B. Balance másico de fucoidano

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

5 E. Composición de monosacáridos

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

Tabla 8: Análisis de monosacáridos

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

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

F. Endotoxina

25 Se determinó la endotoxina bacteriana por LAL según USP<85>. Los resultados se muestran en la tabla 9 a continuación. El procesamiento produjo una reducción de aproximadamente el 50% en los niveles de endotoxinas.

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

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

30 Ejemplo 4

Actividad biológica de muestras de fucoidano

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

40 Ensayos de coagulación en plasma:

#### Tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT)

Se modificó el ensayo de APTT a partir de procedimientos convencionales (Anderson 1976; Staff 2004). Brevemente, se incubaron 5  $\mu$ l de 20X fucoidano en solución salina con 95  $\mu$ l de plasma durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 100  $\mu$ l de reactivo de APTT a 37°C a la mezcla y se incubaron a 37°C durante 3 min, seguido de adición de 100  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  25 mM a 37°C e inicio del cronometraje en un fibrómetro convencional.

#### Tiempo de protrombina diluido (dPT)

El ensayo de dPT fue similar al previamente descrito (14). Se diluyó simplastina (bioMerieux, Durham, NC) con solución salina a 1:100 o 1:300, dependiendo del formato del ensayo y se mezcló con  $\text{CaCl}_2$  25 mM. La muestra de plasma también se calentó previamente hasta 37°C y luego ~75  $\mu$ l de cada una se mezclaron juntas y se midió el tiempo hasta la coagulación con un fibrómetro. Para la evaluación de la actividad de fucoidano, se preincubaron 5  $\mu$ l de 20X fucoidano con plasma a temperatura ambiente durante 30 min antes de iniciarse el ensayo de dPT. Para evaluar la posible inhibición de la actividad de TFPI por fucoidano, se preincubó rTFPI diluido (American Diagnostica, Stamford, CT) con fucoidano durante 5 min a temperatura ambiente, se añadió muestra de plasma y la mezcla se incubó durante 25 min adicionales, seguido del inicio de dPT. Todos los estudios de coagulación se realizaron por duplicado y se reprodujeron.

#### Tromboelastógrafo de plasma (TEG)

*Preparación de muestras* – Muestras de plasma humano deficiente en factor VIII (George King Biomedical, Overland Park, KS) (360  $\mu$ l) precalentadas hasta 37°C se mezclaron con 40  $\mu$ l de fucoidano sin procesar o tratado con EDTA en solución salina. La concentración de fucoidano final en las muestras de plasma osciló entre 1  $\mu$ g/ml y 100  $\mu$ g/ml.

*Análisis de TEG* – Para la activación de las muestras de plasma, se añadieron 20  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  0,2 M a una copa de plástico montada en un soporte para copas de aluminio. Se dispensaron las mezclas de muestra de plasma y fucoidano (340  $\mu$ l) en la disolución de  $\text{CaCl}_2$  y se midieron inmediatamente. El analizador de TEG incubó las muestras continuamente a 37°C. Las pruebas se detuvieron después de que se calcularan los siguientes parámetros de formación de coágulos por el software TEG®Analytical versión 4: R, periodo de latencia para la coagulación inicial a partir del tiempo en que empezó la medición; ángulo  $\alpha$ , que representa la rapidez del fortalecimiento del coágulo; y MA (amplitud máxima), equivalente a la fortaleza máxima del coágulo formado. En muestras de plasma sin formación de coágulos, la medición se terminó después de 2 h. Los valores promedio y desviaciones estándar se calcularon a partir de tres mediciones independientes.

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

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

#### E. Conclusión

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

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

## REIVINDICACIONES

1. Método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo el método:
  - 5 purificar una composición de fucoidano a partir de una mezcla heterogénea, en el que la purificación comprende:
    - eliminar iones de metales pesados de la mezcla heterogénea tratando con un agente quelante para producir una primera mezcla de fucoidano;
    - 10 precipitar selectivamente el fucoidano presente en dicha primera mezcla de fucoidano para eliminar contaminantes;
    - resuspender el precipitado que contiene fucoidano en disolución acuosa para producir una segunda mezcla de fucoidano;
    - 15 repetir las etapas de precipitación y resuspensión una o más veces; y
    - filtrar la disolución acuosa que comprende fucoidano para eliminar contaminantes bacterianos y de endotoxinas para dar una composición de fucoidano purificado; y
    - 20 combinar la composición de fucoidano purificado con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
  - 25 2. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende además combinar la composición de fucoidano purificado con uno o más factores seleccionados de factor XI, factor XII, precalicreína, quininógeno de alto peso molecular (HMWK), factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XIII, factor II y factor de von Willebrand, factor tisular, factor VIIa, factor V, factor Xa, factor IXa, factor XIa, factor XIIa y factor VIIIa.
  - 30 3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el método comprende formular la composición farmacéutica para inyección como polvo o liofilizado; o como suspensión lista para inyección, emulsión o composición insoluble seca para combinación con un vehículo, antes de su uso o emulsión o concentrados de líquido para dilución antes de su administración.
  - 35 4. Método según la reivindicación 3, en el que la composición farmacéutica se formula como inyección.
  5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición de fucoidano purificado tiene niveles no detectables de arsénico, bromo, cerio, cobalto, plomo, litio, molibdeno, estaño, tungsteno y vanadio tal como se determina mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-EM).
  - 40 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición de fucoidano purificado posee desde el 5 hasta el 25 por ciento en peso de azufre.
  - 45 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fucoidano es del género *Fucus* o *Laminaria*.
  8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en ácido etilendiaminatetraacético, ácido etilenglicol-bis-(beta-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético, ácido 2,3-dimercaptopropano-1-sulfónico y ácido 2,3-dimercaptosuccínico.
  - 50 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el agente quelante se inmoviliza sobre un soporte sólido.
  - 55 10. Método según la reivindicación 9, en el que el agente quelante es una resina quelante de iminodiacetato.
  11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el fucoidano tiene actividad procoagulante.
  - 60 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la composición farmacéutica se formula para una administración de fucoidano a una dosificación de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg.

Figura 1

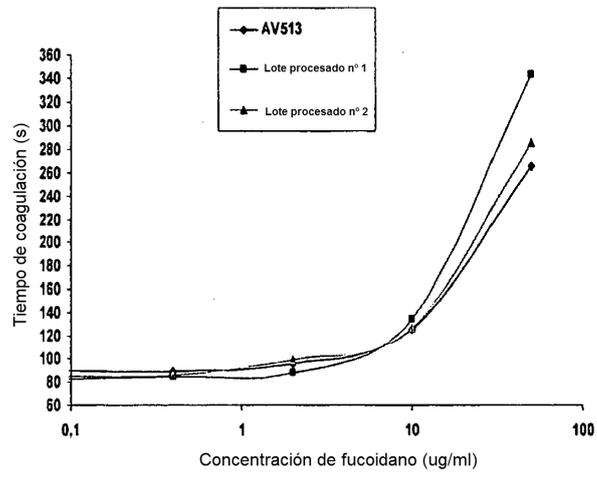


Figura 2

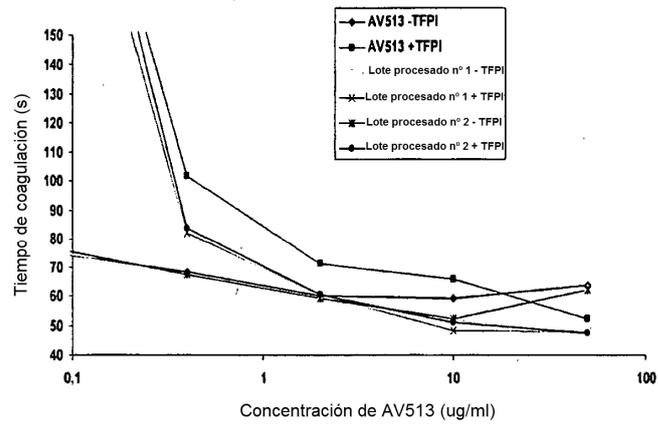
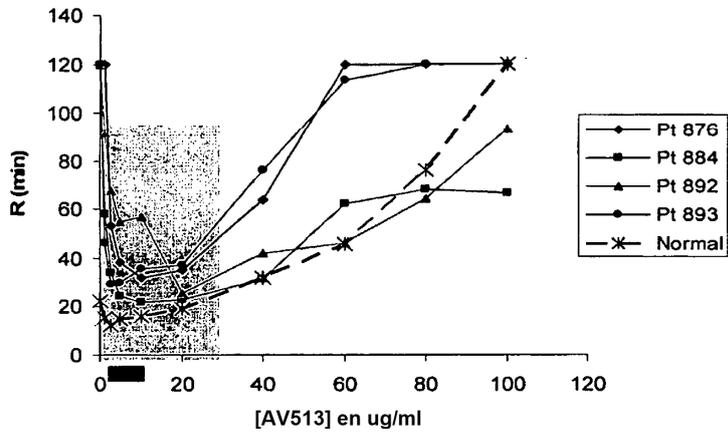
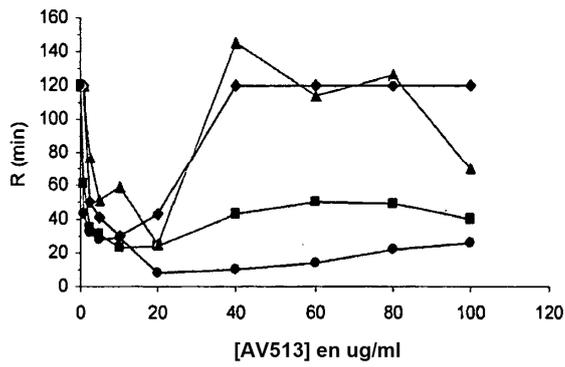


Figura 3

Sin procesar (050316)



Lote procesado n° 1



Lote procesado n° 2

