

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 872**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/49** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/737** (2006.01)  
**A61P 7/02** (2006.01)  
**A61P 7/04** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2014 PCT/IB2014/060039**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14147597**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2014 E 14715449 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2976099**

54 Título: **Aminofucoidan como un vector para la fibrinólisis en enfermedades trombóticas**

30 Prioridad:

**21.03.2013 EP 13305340**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2018**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)**  
**101 Rue de Tolbiac**  
**75013 Paris, FR;**  
**UNIVERSITÉ PARIS 13 PARIS NORD (33.3%) y**  
**UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT (PARIS 7) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LOYAU, STÉPHANE;**  
**JANDROT-PERRUS, MARTINE;**  
**LETOURNEUR, DIDIER;**  
**CHAUBET, FRÉDÉRIC;**  
**HO-TIN-NOE, BENOÎT;**  
**MAIRE, MURIELLE y**  
**MICHEL, JEAN-BAPTISTE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 691 872 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

Aminofucoidan como un vector para la fibrinólisis en enfermedades trombóticas

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a sistemas mejorados y estrategias moleculares para la prevención y el tratamiento de enfermedades trombóticas vasculares agudas.

Más particularmente, la invención se refiere a fibrinólisis inducida por el activador del plasminógeno tisular recombinante por vía intravenosa utilizando vectorización del activador del plasminógeno tisular (también denominado aquí como t-PA) a trombo por una molécula bipolar quimérica que incluye un resto que contiene amina que se une al activador del plasminógeno del tejido, y un resto fucoidan que se une al trombo y realiza un sistema de vectorizarlo al trombo intravascular.

Por lo tanto, de acuerdo con uno de sus aspectos, la invención se refiere a un vector que tiene propiedad de unión a t-PA que consiste en un resto fucoidan, que está aminado por un enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y un grupo químico que comprende uno o más grupos amino.

15 De acuerdo con otro de sus aspectos, la invención se refiere a un t-PA vectorizado y/o a composiciones farmacéuticas que lo comprenden, así como a métodos para preparar dicho t-PA vectorizado al trombo o composiciones farmacéuticas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La hemostasia se puede definir como un sistema homeostático esencial que conduce a la formación de un coágulo hemostático. La hemostasia debe ajustarse con precisión con el fin de evitar el riesgo de sangrado, o hemorragia, y la aparición de coágulos de sangre obstructivos patológicos, a lo que se alude también en esta memoria como trombosis. Los eventos trombóticos agudos siguen siendo la principal causa de mortalidad y morbilidad en los países occidentales.

25 La formación de un coágulo resulta de la activación coordinada de la cascada de coagulación y de las plaquetas. Este es un proceso amplificado con plaquetas activantes que soporta el ensamblaje de complejos enzimáticos de coagulación y la enzima final de la coagulación, siendo la trombina un potente activador de plaquetas. El producto final está compuesto de agregados de plaquetas que expresan sitios específicos en su superficie y de fibras de fibrina polimerizadas. El papel respectivo de la coagulación y las plaquetas puede variar de acuerdo con el lecho vascular y las condiciones reológicas, siendo las plaquetas y la fibrina más predominantes en los trombos arteriales y venosos, respectivamente.

Para una mejor comprensión de la coagulación como un proceso dinámico, el experto en la técnica también puede consultar información complementaria de Kottke-Marchant & Lefkowitz (KOTTKE-MARCHANT & LEFKOWITZ, 2008, Capítulo 1 – Coagulation Pathway and Physiology. An Algorithmic Approach to Hemostasis Testing).

35 Cuando se forma un coágulo hemostático, se tienen que considerar mecanismos biológicos adicionales que provocan la reabsorción secundaria del coágulo, permitiendo la reparación del tejido (cicatrización). Esos mecanismos secundarios pueden denominarse comúnmente sistema de eliminación de coágulos, o «fibrinólisis».

40 Se ha de considerar que un coágulo está en equilibrio permanente entre la construcción y la destrucción. Cuando se forma un coágulo trombótico en una arteria o vena, la reabsorción espontánea del coágulo se retrasa demasiado como para que sea eficaz para proteger el tejido aguas abajo de una isquemia irreversible. Por lo tanto, actualmente se utilizan dos estrategias para tratar la trombosis: (i) limitar la formación incremental del coágulo por fármacos antiplaquetarios y anticoagulantes y (ii) mejorar la destrucción del coágulo mediante la inducción de fibrinólisis.

La invención se refiere a esta segunda estrategia.

45 La vía fibrinolítica se compone de activadores e inhibidores. Así, un «activador» de la vía fibrinolítica puede tener la capacidad de provocar la lisis de la fibrina, mientras que un «inhibidor» de la vía fibrinolítica puede tener el efecto opuesto.

Durante su formación, el coágulo expone los elementos requeridos para su reabsorción: la fibrina expone los sitios de unión para el zimógeno plasminógeno circulante y su activador, el activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA). La formación de un complejo ternario en el que se asocian la fibrina, el plasminógeno y el t-PA garantiza la eficacia de la fibrinólisis y evita su extensión al torrente sanguíneo (fibrinogenólisis). El plasminógeno unido a fibrina

se escinde en Arg-561-Val562 por su activador t-PA, generando el enlace disulfuro que une la plasmina de proteasa de dos cadenas.

5 Es bien conocido que el t-PA y la plasmina se unen a residuos catiónicos, principalmente grupos amina (NH<sub>2</sub>) de residuos de lisina expresados en la red de fibrina (Lijnen et al, 2001, Elements of the fibrinolytic system. Ann N Y Acad Sci, 936, 226-236).

Además, el plasminógeno se une con una alta afinidad a lisinas (Lys) carboxi terminales. La escisión de la fibrina por parte de la plasmina expone una nueva Lys carboxi-terminal, lo que conduce a más sitios de unión al plasminógeno y a más plasmina formada (proceso de amplificación). En contraposición, TAFI (siglas inglesas de inhibidor de fibrinólisis activable por trombina), una carboxipeptidasa, separa la Lys carboxi terminal, evitando la unión del plasminógeno e inhibiendo la fibrinólisis. El t-PA también se une a la cadena lateral de la amina libre.

10 Miméticos de lisina tales como el ácido  $\alpha$ -aminocaproico o el ácido tranexámico (Royston, 1995, Blood-sparing drugs: Aprotinin, tranexamic acid and epsilon-aminocaproic acid, Int Anesthesiol Clin) desplazan el plasminógeno de los residuos lisina C-terminales, limitando así la fibrinólisis. Por otro lado, el t-PA unido a amina está protegido de la inhibición por las serpinas, principalmente el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), también conocido como inhibidor del activador del plasminógeno endotelial o como serpina E1.

El tratamiento no intervencionista agudo sigue siendo principalmente la inyección intravenosa de activador del plasminógeno tisular recombinante, también denominado en esta memoria rt-PA (Alteplase, Actilyse® o Tenecteplase, Metalyse®, Boehringer Ingelheim). Por ejemplo, las directrices internacionales recomiendan la inyección IV más temprana de t-PA recombinante en la apoplejía aguda (grupo IST et al, 2012, The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [ist-3]): A randomised controlled trial, Lancet). Pero la eficacia de la inyección periférica de t-PA recombinante se limita al 10% debido a:

- la dilución del compuesto potente en la sangre entera,
- la inhibición de t-PA recombinante por quelantes circulantes tales como PAI-1 durante su tráfico en plasma,
- 25 - el bajo nivel inicial de unión de rt-PA al trombo.
- el mayor riesgo de hemorragia por altas dosis e inyección retrasada.

Además, aunque los efectos trombolíticos del t-PA son beneficiosos, su neurotoxicidad, en los intervalos de dosis alta requeridos que se usan actualmente, es problemática.

30 Para proteger provisionalmente el rt-PA de los inhibidores del plasma, se condiciona en presencia de Arg (formulación Alteplase). El efecto protector de los residuos amina también se ha explotado con el uso de anexina 2 como una chaperona. De hecho, la co-localización de plasminógeno y t-PA en la superficie de la célula permite que las células desempeñen un papel regulador en la fibrinólisis. El complejo anexina2-S100A10 proporciona una plataforma de este tipo para la activación del plasminógeno gracias a la presentación de una Lys C-terminal en la orientación tridimensional correcta para el reconocimiento de t-PA y plasminógeno (Madureira et al, 2011 The role of the annexin A2 heterotetramer in vascular fibrinolysis, Blood). En este contexto, la anexina A2 se ha propuesto con éxito como una chaperona para la inyección IV de t-PA (Zhu et al., 2010, Annexin 2 combined with low-dose t-PA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke, J Cereb Blood Flow Metab). Las limitaciones de esta estrategia son la ausencia de vectorización de t-PA y el hecho de que la anexina A2 es una proteína recombinante muy costosa de producir.

40 Existe una necesidad general de tratamientos mejorados relacionados con enfermedades trombóticas vasculares agudas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevas formas de t-PA o compuestos activos derivados de t-PA más terapéuticamente efectivos en cantidades de t-PA más bajas que las administradas actualmente, con el fin de al menos moderar los efectos secundarios tóxicos de este ingrediente activo.

45 Por lo tanto, la protección del t-PA durante su circulación en el plasma y su eficiente vectorización al trombo representan un desafío importante.

### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un compuesto que tiene la capacidad de unirse tanto a t-PA como al trombo y que es capaz de vectorizar el t-PA terapéutico en su diana biológica.

50 Esta invención concierne a un compuesto de vector de este tipo, que comprende un resto fucoidan que fija como objetivo el trombo unido covalentemente a un grupo que contiene amina con propiedades de unión a t-PA y de protección de t-PA.

La propiedad de unión al trombo del resto fucoidan se utiliza para fijar como objetivo el compuesto terapéutico al coágulo.

5 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un vector que tiene una propiedad de unión a t-PA que consiste en un resto fucoidan, que está aminado por un enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y un grupo químico que comprende uno o más grupos amino (-NH<sub>2</sub>), tales como grupos amina primaria o grupos guanidina.

En determinadas realizaciones, dicho vector es un compuesto de fórmula (I):



en donde

- 10 - "FUCO" significa un resto fucoidan, que opcionalmente contiene uno o más grupos amina primaria enlazados covalentemente a la cadena de fucoidan,  
 - x, y y z son números enteros independientes que significan 0 o 1,  
 - C1 es el átomo de carbono en la posición 1 de la unidad de sacárido ubicada en el extremo reductor del resto fucoidan,  
 15 - L es un enlazador, y  
 - R1 es un grupo químico que comprende uno o más grupos amino, o que consiste en un grupo amino,  
 - L y R1 son independientes y pueden ser iguales o diferentes.

En algunas realizaciones, dicho vector es un compuesto de fórmula (I), en donde:

- 20 - R1 es un grupo químico que comprende o consiste en una cadena hidrocarbonada terminada en amina primaria, lineal o ramificada; un aminoácido; un poliaminoácido; y/o un grupo químico seleccionado en la lista que comprende, o que consiste en: lisina, polilisina, arginina, poliarginina, ornitina, poliornitina, ácido γ-aminobutírico, poliaminas, polieteraminas, o cualquier otro grupo químico que comprenda un grupo guanidina o una amina primaria,  
 en donde:  
 25 - dicho grupo químico está interrumpido opcionalmente por uno o más anillos de hidrocarburos no aromáticos que tienen 5 o 6 átomos de carbono, y preferiblemente no más de un anillo de hidrocarburo no aromático que tiene 5 o 6 átomos de carbono,  
 - dicho grupo químico está interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos,  
 - dicho grupo químico contiene opcionalmente uno o más grupos amida y/o uno o más grupos éster, en particular uno o más grupos amida,  
 30 - dicho grupo químico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos amina,  
 - dicho grupo químico está opcionalmente interrumpido y/o sustituido con uno o más grupos, idénticos o diferentes, y seleccionados de: (a) una cadena de hidrocarburos lineal o ramificada, (b) un aminoácido o un poliaminoácido, (c) una poliamina o una polieteramina, (d) un ácido γ-aminobutírico, (e) un grupo guanidina y (f) una amina primaria.

35 En algunas realizaciones de dicho vector, el resto fucoidan tiene un peso molecular medio que es menor que 100 000 Da, preferiblemente menor que 20 000 Da, y en particular que oscila entre 2000 Da y 15 000 Da.

Esta invención también se refiere a un t-PA vectorizado que comprende complejos de un vector tal como se definió arriba con t-PA.

En algunas realizaciones, dicho t-PA vectorizado tiene una relación molar de vector a t-PA que oscila entre 40:1 y 1:1; preferiblemente entre 20:1 y 3:1, y lo más preferiblemente entre 15:1 y 5:1.

40 Esta invención también concierne a un método para preparar un t-PA vectorizado, que comprende las etapas de:  
 a) proporcionar un vector tal como se define arriba,  
 b) proporcionar t-PA, y  
 c) poner en contacto el vector proporcionado en la etapa a) con el t-PA proporcionado en la etapa b), con el fin de obtener complejos entre dicho vector y t-PA.

45 También se refiere a un kit que comprende:  
 - un primer recipiente que comprende un vector tal como se define arriba, y  
 - un segundo recipiente que comprende t-PA.

La presente invención pertenece también a una composición farmacéutica que comprende complejos de un vector tal como se define arriba con t-PA, así como a los usos terapéuticos de dicha composición farmacéutica.

## 50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Lisis *in vitro* de un trombo rico en plaquetas por t-PA vectorizado con aminofucoidan.

Coágulos ricos en plaquetas se incubaron con rt-PA (*control, primera columna*), o rt-PA complejo con aminofucoidanos (*segunda, tercera y cuarta columnas*) o fucoidan no aminado (*columna 7*) o fucoidan solo (*columna 6*). Se midió la lisis de fibrina y se expresa como un porcentaje en el eje y. El valor de la mediana se indica con una barra horizontal (n = 3 por condición). Di-lys y Tri lys (*segunda y tercera columnas*) representan, respectivamente, di-lisina y tri-lisina. Ac-Tran (*cuarta columna*) representa ácido tranexámico y DETA (*quinta columna*) representa dietilentriamina.

**Figura 2: Lisis *in vivo* de trombos mesentéricos por t-PA vectorizado en ratones.**

En el momento 0, la trombosis de los vasos mesentéricos se indujo por exposición a FeCl<sub>3</sub> y ocurrió a T = 10/15 minutos. La trombolisis fue inducida por rt-PA (control) o rtPA acoplado a aminofucoidan. La lisis se observó solo cuando fue inducida por aminofucoidan en 40 a 50 min. Los vasos expuestos mesentéricos se observan tanto con luz visible (*columna izquierda*) como fluorescencia (*columna derecha*) utilizando t-PA-FITC.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Fucoidan, en referencia a un tipo de polisacárido sulfatado (polianión) derivado principalmente de algas pardas, es un imitador que se produce de forma natural de Sialyl-Lewis<sup>X</sup> (Li et al, 2008, Fucoidan: Structure and bioactivity, Molecules).

Sialyl Lewis<sup>X</sup>, también conocido como sialyl Le<sup>X</sup> y SLe<sup>X</sup>, es un hidrato de carbono tetrasacárido que se puede unir a O-glicanos o N-glicanos en la superficie de las células, y eso es importante para el reconocimiento célula-célula.

Es capaz de unir P-selectina plaquetaria (Bachelet, 2009, Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets, Biochim Biophys Acta) y trombo intraluminal *in vivo* (Rouzet et al, 2011, Radiolabeled fucoidan as a P-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation, J Nucl Med).

Ahora se demuestra que un aminofucoidan puede actuar como un agente vectorizante para el activador del plasminógeno tisular al coágulo vascular intraluminal. En particular, se demuestra que un aminofucoidan puede actuar como vector para la prevención y/o el tratamiento de patologías asociadas con la aparición de trombo intraluminal en un sujeto y/o en enfermedades trombóticas.

De acuerdo con la invención, un «vector» o «agente vectorizante» se refiere a un agente biológico que comprende un fucoidan o un resto fucoidan como un vehículo para transportar una molécula, en particular una proteína, a un coágulo de sangre.

El «sujeto», o «diana biológica», puede ser cualquier entidad biológica que pueda producir y/o contener selectinas. Por ejemplo, la diana biológica puede ser una célula, un fluido biológico o un tejido biológico. La diana biológica puede proceder de un sujeto vivo (p. ej., puede obtenerse extrayendo sangre o mediante biopsia) o en un sujeto fallecido (p. ej., puede obtenerse en la autopsia). El sujeto puede ser un ser humano u otro mamífero. En determinadas realizaciones preferidas, la diana biológica procede de un paciente sospechoso de tener una afección clínica asociada con la aparición de un trombo intravascular. En particular, dicho sujeto puede sufrir una enfermedad trombótica crónica o aguda o un trastorno trombótico.

De acuerdo con la invención, la expresión «activador de plasminógeno», o t-PA, también abarca t-PA nativo y recombinante, por ejemplo, un t-PA de dos cadenas o un t-PA recombinante de una sola cadena. En seres humanos, t-PA es una proteína de SEQ ID NO1, o tal como se describe en Harris *et al.* (Harris *et al.*, 1986, Cloning of cDNA coding for human tissue-type plasminogen activator and its expression in Escherichia coli, Mol. Biol. Med. 3 (3), 279-292).

De acuerdo con la invención, los fucoidanos se refieren a un tipo de polisacárido, que contiene porcentajes sustanciales de grupos éster de L-fucosa y sulfato, principalmente derivados de algas pardas y algunos otros invertebrados marinos. Dichos fucoidanos pueden obtenerse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que se desarrollarán más adelante. Para una revisión más completa sobre la estructura y bioactividad de los fucoidanos, el experto en la técnica puede referirse a Li *et al.* (Li *et al.*, 2008, Fucoidan: Structure and Bioactivity, Molecules).

Los términos y expresiones «fucoidan», «fracción de fucoidan», «fucan», «fucosan» y «fucan sulfatado» son equivalentes para los fines de la presente descripción.

De acuerdo con una realización preferida, la invención se refiere a cualquier entidad de fucoidan que exhibe una alta afinidad, especificidad y/o selectividad por selectinas y, por lo tanto, por el trombo. En el contexto de la presente invención, cuando se utiliza un resto fucoidan como agente vectorizante, el primero confiere su propiedad de

- 5 especificidad/selectividad/afinidad a la molécula, y la molécula se convierte en "objetivo de trombo" (es decir, la molécula interactúa específica y/o eficientemente con y/o se une a selectinas y fibrina). La expresión "afinidad de unión" y el término "afinidad" se utilizan en esta memoria de manera indistinta y se refieren al nivel de atracción entre entidades moleculares. Las afinidades se pueden expresar cuantitativamente como constante de disociación ( $K_D$ ), o su inversa, la constante de asociación ( $K_A$ ).
- De acuerdo con la invención, el término «aproximadamente» puede entenderse como más o menos 10%.
- De acuerdo con la invención, las «enfermedades trombóticas» y los «trastornos trombóticos» son enfermedades y/o trastornos que están asociados con la aparición o persistencia de coágulos de sangre intravasculares y/o trombos no deseados.
- 10 Los trastornos y las enfermedades trombóticas de acuerdo con la invención pueden dar como resultado, por ejemplo, la formación de trombosis venosa tal como trombosis venosa profunda, trombosis de la vena porta, trombosis de la vena renal, trombosis de la vena yugular o trombosis del seno venoso cerebral. En algunos casos, dicha trombosis puede conducir a flebitis, a la que también se alude en esta memoria como "tromboflebitis" y, en ocasiones, a embolias pulmonares. También puede implicar trombos auriculares y ventriculares relacionados con las
- 15 arritmias cardíacas.
- También pueden resultar en una trombosis arterial, que a menudo es consecuencia de la ruptura de una placa aterosclerótica, en cuyo caso también puede denominarse «aterotrombosis». Una trombosis arterial puede conducir, por ejemplo, a una apoplejía, un infarto de miocardio y/o una embolia arterial.
- 20 Las enfermedades trombóticas son bien conocidas en la técnica y pueden tener diversas causas. Pueden ser enfermedades primarias o adquiridas. En particular, pueden ser hereditarias y/o estar vinculadas a predisposiciones genéticas. Ejemplos de este tipo de enfermedades comprenden, por ejemplo, hemofilias, enfermedad de Von Willebrand y otras coagulopatías relacionadas con la hiper- e hipo-coagulabilidad.
- 25 Fucoidan es capaz de fijar como objetivo *in vivo* trombo que contiene plaquetas y fibrina con excelente sensibilidad y especificidad (Rouzet *et al.*, 2011, Radiolabeled fucoidan as a P-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. J Nucl Med).
- De acuerdo con la invención, un «aminofucoidan» es un resto fucoidan, que está aminado por un enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y un grupo químico que comprende uno (fucoidan mono-amina) o más grupos amino ( $-NH_2$ ) (fucoidan poli-amina) como grupos de amina primaria o grupos guanidina. Preferiblemente, dicho grupo químico solo comprende, como sustituyente(s) terminal(es), uno o más grupos amino ( $-NH_2$ ).
- 30 Incluso más preferiblemente, dicho grupo químico solo comprende, como sustituyente(s) terminal(es) una o más aminas primarias.
- De acuerdo con la invención, un grupo amino ( $-NH_2$ ) se refiere a cualquier grupo químico con un radical ( $-NH_2$ ) libre, en particular grupos de amina primaria y grupos guanidina, y más particularmente grupos amina primaria. De manera no limitativa, se puede seleccionar un grupo químico en el grupo que consiste en lisina, arginina, ornitina o
- 35 ácido  $\gamma$ -aminobutírico.
- De acuerdo con la invención, un "sustituyente terminal" se refiere a cualquier sustituyente en el extremo de una cadena hidrocarbonada.
- De acuerdo con la invención, una «cadena hidrocarbonada» puede comprender, en particular, entre 1 y 44 átomos de carbono, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,
- 40 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44 átomos de carbono, más particularmente entre 1 y 22 átomos de carbono, e incluso más particularmente entre 1 y 10 átomos de carbono.
- De acuerdo con una realización preferida, dicho grupo químico comprende como sustituyente o sustituyentes terminales, solo sustituyente o sustituyentes terminales que consiste(n) en un grupo amino primario. Por lo tanto, a dicho aminofucoidan también se le puede aludir en esta memoria como un "fucoidan modificado terminado en amina
- 45 primaria, similar/mimético de la lisina".
- De acuerdo con la invención, el aminofucoidan es un fucoidan que está modificado en su extremo reductor. Debido a ello, no se altera la actividad biológica de dicho fucoidan, que depende de la cantidad y la distribución de los grupos sulfato a lo largo de su cadena. Sin embargo, también es posible introducir aminas primarias adicionales directamente en los grupos hidroxilo de fucosas que componen dicha cadena.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización particular, dicho fucoidan comprende grupos que contienen aminas primarias enlazadas covalentemente a la cadena de fucoidan.

5 De acuerdo con esa realización particular, dicha cadena comprende, por término medio, entre 1 y 10 grupos que contienen aminas primarias por cadena de fucoidan, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 grupos que contienen aminas primarias.

De acuerdo con la invención, un "heteroátomo" se refiere a un átomo que se selecciona preferiblemente de nitrógeno (N), azufre (S) y oxígeno (O), e incluso más preferiblemente se selecciona de nitrógeno y oxígeno.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una plataforma molecular bipolar y métodos para preparar dichos vectores bipolares, a los que también se alude en esta memoria como aminofucoidanes.

10 Se demuestra, de acuerdo con la invención, que dichos vectores bipolares tienen dos características principales:  
- un polo (fucoidan aniónico) es capaz de vectorizar al trombo,  
- un polo es capaz de interactuar con y proteger t-PA a través de al menos una función de unión a amina primaria.

Por lo tanto, la invención se refiere a un complejo entre un aminofucoidan y un activador de plasminógeno tisular (t-PA). Dicho complejo es un complejo no covalente.

15 En particular, la fijación como objetivo de selectina P (que se expresa en la superficie de las plaquetas) por un resto fucoidán aumenta ventajosamente la concentración local de t-PA en o cerca del trombo, que luego es la responsable de una tasa incrementada de fibrinólisis.

20 Ventajosamente, la amina primaria en un polo del aminofucoidan es parte de o, alternativamente, imita a un aminoácido o un poli-aminoácido, en particular una lisina, una polisilina o un derivado de lisina. Lisinas, polilisinas o derivados de lisina de este tipo sirven como residuos de anclaje entre t-PA, plasminógeno y fibrina.

A menos que se especifique lo contrario, un "aminoácido", tal como una "lisina", se refiere tanto a un aminoácido como a sus derivados.

De una manera no limitativa, el polo de la amina también puede implicar un resto que contiene amina primaria capaz de unirse a t-PA, tal como lisina, arginina, ornitina o ácido  $\gamma$ -aminobutírico.

25 Por supuesto, el aminoácido o poli-aminoácido se puede acoplar al fucoidan mediante cualquier método conocido en la técnica, siempre que el aminofucoidan resultante comprenda al menos un grupo amino libre ( $-NH_2$ ), tal como una amina primaria o un grupo guanidina, como sustituyente terminal.

De acuerdo con una realización preferida, un aminoácido o un poli-aminoácido se acopla a un fucoidan, o a un enlazador L a través de un grupo amida.

30 Sin desear estar ligada a teoría particular alguna, la solicitante cree que se supone que la unión no covalente de t-PA al resto amina del compuesto lo protege de las serpinas y permite que se administre a la fibrina.

35 La solicitante también cree que vincular un resto fucoidan a t-PA a través de un grupo amino, tal como una amina primaria, en particular aminoácidos y derivados de aminoácidos, induce un cambio conformacional dentro del t-PA. Este cambio conformacional puede entonces proteger su sitio activo de los inhibidores circulantes y, así, aumentar la semivida y la biodisponibilidad de un complejo de t-PA/aminofucoidan hacia el trombo.

De acuerdo con la invención, los aminoácidos y/o sus derivados pueden tener una configuración L o una configuración D, en particular una configuración L.

40 De acuerdo con la invención, un «derivado de aminoácido» es un aminoácido modificado que tiene una configuración L o una configuración D, en particular una configuración L, y al menos un grupo amino libre, en particular una amina primaria libre, preferiblemente dos o más de dos aminas primarias libres.

Un aminoácido modificado es un aminoácido, en el que la cadena lateral está opcionalmente interrumpida o sustituida con uno o más grupos químicos, idénticos o diferentes.

A menos que se especifique, un «aminoácido» de acuerdo con la invención puede abarcar tanto dicho «aminoácido» como sus derivados.

45 Ventajosamente, los aminoácidos pueden enlazarse covalentemente entre sí mediante enlaces peptídicos (o grupos amida) para formar poli-aminoácidos.

Los poli-aminoácidos están compuestos ventajosamente de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos, en particular 2 o 4 aminoácidos.

En particular, los poliaminoácidos pueden seleccionarse en la lista que consiste en: polilisinas, poliargininas, poliglutaminas, policitrulinas, poliornitinas y preferiblemente polilisinas.

- 5 Cuando el resto fucoidan está unido a t-PA a través de poli-lisina(s), dicha o dichas poli-lisinas están compuestas ventajosamente de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 lisinas, en particular 2 o 4 lisinas.

Por lo tanto, los dendrímeros de lisinas también son considerados por la invención como "derivados de lisina". Si no están disponibles comercialmente, pueden sintetizarse de acuerdo con el protocolo descrito en Kim & Zimmerman *et al.*, (Y. Kim y SC Zimmerman, 1998, «Applications of dendrimers in bioorganic chemistry», Current Opinion in Chemical Biology, vol. 2, págs. 733-742).

10

Tal como se mencionó arriba, la vectorización con dicho aminofucoidan permite un aumento de la concentración de t-PA en o cerca del trombo, y protege dicho t-PA durante su suministro plasmático. Por lo tanto, dicha vectorización tiene la doble ventaja de aumentar la concentración local de t-PA, pero también de proteger t-PA de otros compuestos y/o inhibidores tales como PAI-1.

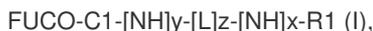
15

Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la invención se refiere a un vector que tiene propiedad de unión a t-PA que consiste en un resto fucoidan que está aminado por un enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y un grupo químico que comprende uno o más grupos amino.

De acuerdo con la invención, la expresión «extremo reductor» es el extremo en el que el átomo de carbono anomérico (C1 para una hexosa tal como glucosa y C2 para una pentosa tal como fructosa) está libre y no se ha utilizado para formar un enlace glicosídico.

20

De acuerdo con una realización particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I):



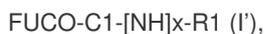
en donde

- 25 - "FUCO" significa un resto fucoidan, que opcionalmente contiene uno o más grupos amina primaria enlazados covalentemente a la cadena de fucoidan,  
 - x, y y z son números enteros independientes que significan 0 o 1,  
 - C1 es el átomo de carbono en la posición 1 de la unidad de sacárido ubicada en el extremo reductor del resto fucoidan,  
 - L es un enlazador, y  
 30 - R1 es un grupo químico que comprende uno o más grupos amino, o que consiste en un grupo amino,  
 - L y R1 son independientes y pueden ser iguales o diferentes.

Un «enlazador» L puede aludir a cualquier grupo químico, que incluye grupos químicos con y sin aminas primarias.

De acuerdo con una realización más particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I), en donde y y z significan 0.

- 35 Así, de acuerdo con dicha realización, dicho vector es un compuesto de fórmula (I'):



en donde

- 40 - "FUCO" significa un resto fucoidan, que opcionalmente contiene uno o más grupos amina primaria enlazados covalentemente a la cadena de fucoidan,  
 - x es un número entero que significa 0 o 1,  
 - C1 es el átomo de carbono en la posición 1 de la unidad de sacárido ubicada en el extremo reductor del resto fucoidan,  
 - L es un enlazador, y  
 - R1 es un grupo químico que comprende uno o más grupos amino, o que consiste en un grupo amino,  
 45 - L y R1 son independientes y pueden ser iguales o diferentes.

En algunas realizaciones, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde:

- R1 es un grupo químico que comprende o consiste en una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que termina en amina primaria; un aminoácido; un poli-aminoácido; y/o un grupo químico seleccionado en la lista que

comprende, o que consiste en: lisina, polilisina, arginina, poliarginina, ornitina, poliornitina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, poliaminas, polieteraminas, o cualquier otro grupo químico que comprenda un grupo guanidina o una amina primaria, en donde:

- 5 - dicho grupo químico está interrumpido opcionalmente por uno o más anillos hidrocarbonados no aromáticos que tienen 5 o 6 átomos de carbono, y preferiblemente no más de un anillo hidrocarbonado no aromático que tiene 5 o 6 átomos de carbono,  
 - dicho grupo químico está interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos,  
 - dicho grupo químico contiene opcionalmente uno o más grupos amida y/o uno o más grupos éster, en particular uno o más grupos amida,  
 10 - dicho grupo químico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos amina,  
 - dicho grupo químico está opcionalmente interrumpido y/o sustituido con uno o más grupos, idénticos o diferentes, y se selecciona de: (a) una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, (b) un aminoácido o un poli-aminoácido, (c) una poliamina o una polieteramina, (d) un ácido  $\gamma$ -aminobutírico, (e) un grupo guanidina y (f) una amina primaria.

15 De acuerdo con una realización, L es un enlazador que comprende o consiste en una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada terminada en amina primaria; un aminoácido; un poli-aminoácido; y/o un grupo químico seleccionado en la lista que comprende o consiste en: lisina, polilisina, arginina, poliarginina, glutamina, poliglutamina, citrulina, policitrulina, ornitina, poliornitina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, poliaminas, polieteraminas, o cualquier otro grupo químico que comprenda un grupo guanidina o una amina primaria, en donde:

- 20 - dicho grupo químico está interrumpido opcionalmente por uno o más anillos de hidrocarburos no aromáticos que tienen 5 o 6 átomos de carbono, y preferiblemente no más de un anillo de hidrocarburo no aromático que tiene 5 o 6 átomos de carbono,  
 - dicho grupo químico está interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos,  
 - dicho grupo químico contiene opcionalmente uno o más grupos amida y/o uno o más grupos éster, en particular uno o más grupos amida,  
 25 - dicho grupo químico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos amina,  
 - dicho grupo químico está opcionalmente interrumpido y/o sustituido con uno o más grupos, idénticos o diferentes, y seleccionados de: (a) una cadena de hidrocarburos lineal o ramificada, (b) un aminoácido o un poli-aminoácido, (c) una poliamina o una polieteramina, (d) un ácido  $\gamma$ -aminobutírico, (e) un grupo guanidina y (f) una amina primaria.

30 De acuerdo con otra realización particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde:  
 - R1 es un grupo químico que comprende o consiste en una cadena hidrocarbonada que termina en amina primaria, lineal o ramificada; un aminoácido; un poli-aminoácido; y/o un grupo químico seleccionado en la lista que comprende, o que consiste en: lisina, polilisina, arginina, poliarginina, glutamina, poliglutamina, citrulina, policitrulina, ornitina, poliornitina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, poliaminas, polieteraminas, o cualquier otro grupo químico que  
 35 comprenda un grupo guanidina o una amina primaria.

De acuerdo con otra realización particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde R1 o L está sustituido con 1 a 4 grupos amina, lo que significa 1, 2, 3 o 4 grupos amina.

40 De acuerdo con otra realización particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde R1 y/o L está sustituido con 1 a 4 grupos amida y/o 1 a 4 grupos éster, lo que significa 1, 2, 3 o 4 grupos amina y/o 1, 2, 3 o 4 grupos éster.

De acuerdo con una realización más particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde L significa una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, en particular una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 22 átomos de carbono, en particular 1 a 10 átomos de carbono, y más particularmente de 1 a 5 átomos de carbono, en donde:  
 45 - dicha cadena hidrocarbonada está interrumpida opcionalmente por uno o más heteroátomos,  
 - dicha cadena hidrocarbonada contiene opcionalmente uno o más grupos amida,  
 - dicha cadena hidrocarbonada está opcionalmente sustituida con uno o más grupos amina.

De acuerdo con una realización particular, L se selecciona en un grupo que consiste en  $(CH_2)_2$ ,  $(CH_2)_3$  y  $(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2$ , y preferiblemente  $(CH_2)_3$  y  $(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2$ .

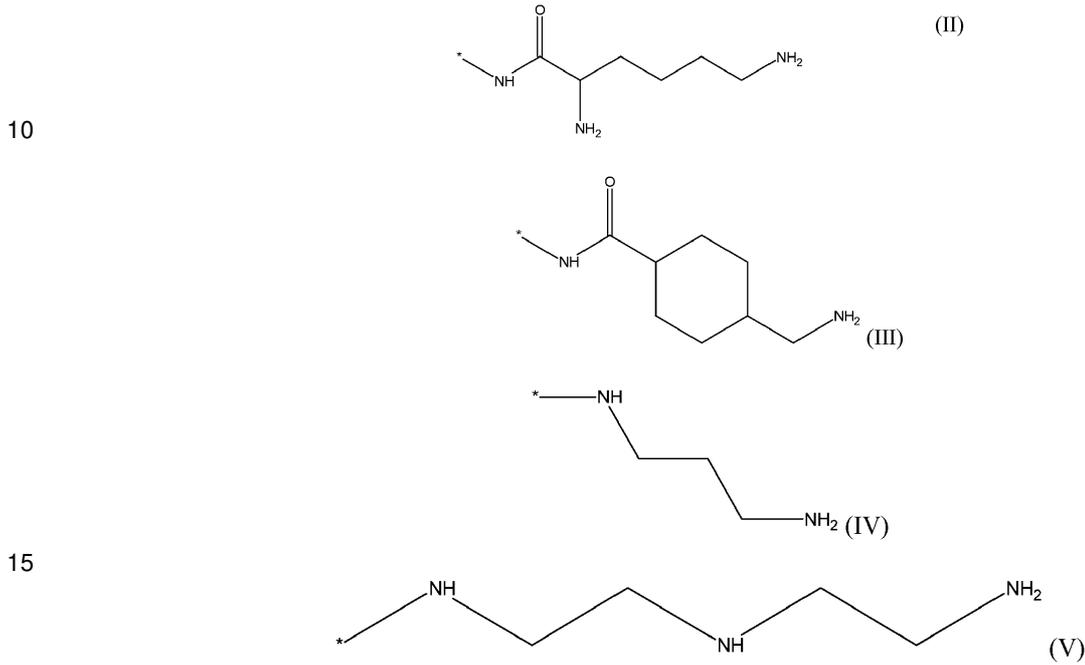
50 Ventajosamente, cuando R1 es un grupo químico elegido en una lista de aminoácidos o poli-aminoácidos, dicho aminoácido o poli-aminoácido puede estar enlazado al fucoidan a través de (a) el extremo C-terminal (-COOH), o (b) el extremo N-terminal (-NH<sub>2</sub>) de dicho aminoácido.

Preferiblemente, el aminoácido o poli-aminoácido está unido al fucoidan a través del extremo C-terminal (-COOH) de dicho aminoácido.

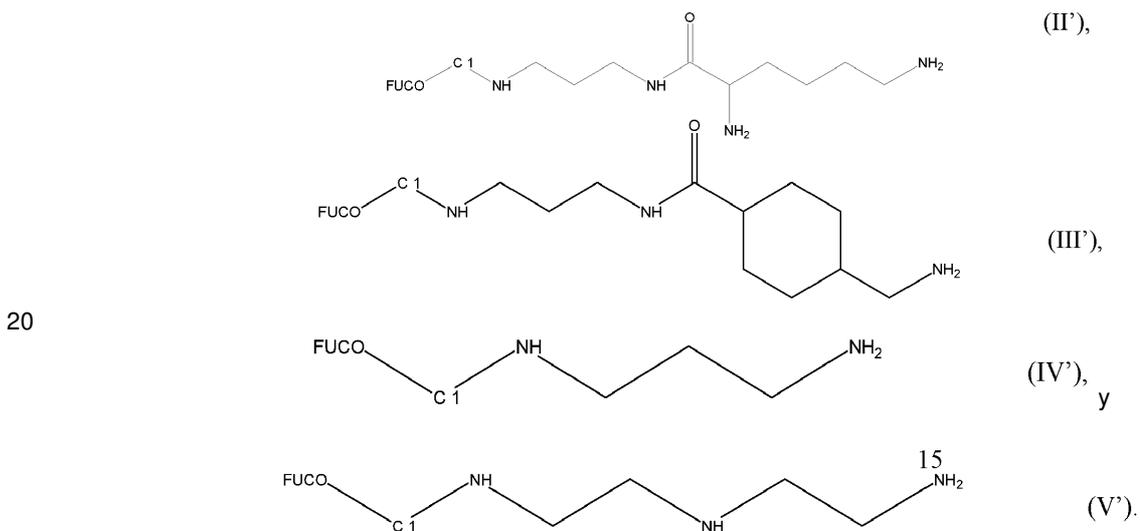
De acuerdo con la invención, el "extremo N-terminal" o el "extremo C-terminal" de un aminoácido o un poli-aminoácido debe entenderse como respectivamente la amina primaria (-NH<sub>2</sub>) y el grupo carboxílico (-COOH) nacidos por el carbono α de este aminoácido.

5 Por supuesto, cuando el aminoácido o poli-aminoácido está enlazado a través de su extremo N-terminal (-NH<sub>2</sub>), se tiene que elegir un aminoácido, o un derivado que porte al menos una amina primaria libre adicional o un grupo guanidina libre como un sustituyente terminal, con el fin de obtener un aminofucoidan que contenga al menos un grupo amino libre adecuado para vectorizar t-PA al trombo.

De acuerdo con otra realización particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde -[NH]<sub>x</sub>-R1 se selecciona del grupo que consiste en:



De acuerdo con una realización preferida, dicho vector se selecciona del grupo que consiste en:

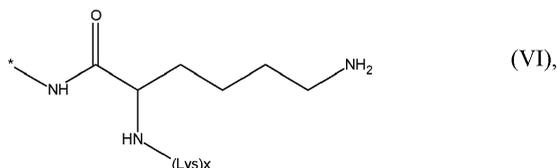


25 en donde  
 - "FUCO" significa un resto fucoidan, que opcionalmente contiene uno o más grupos amina primaria enlazados covalentemente a la cadena de fucoidan,

- C1 es el átomo de carbono en la posición 1 de la unidad de sacárido ubicada en el extremo reductor del resto fucoidan.

De acuerdo con una realización particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I') que comprende una poli-lisina o un derivado de lisina, en particular una poli-lisina.

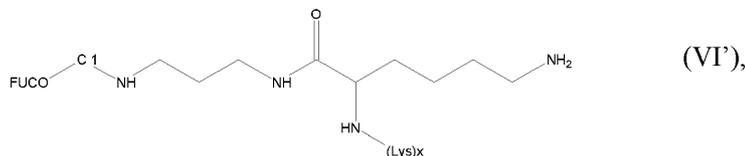
5 De acuerdo con esta realización particular,  $-\text{[NH]}_x\text{-R1}$  puede ser de fórmula (VI):



en donde:

- «Lys» es una lisina o un derivado de lisina, y preferiblemente una lisina,
- x es al menos igual o superior a 1, preferiblemente igual a 2, 3, 4, 5 o 6 y lo más preferiblemente igual a 2 o 4.

10 Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida, dicho vector es un compuesto de fórmula (VI'):

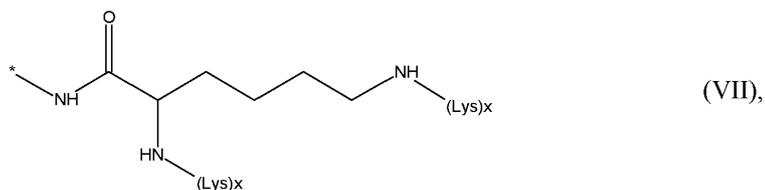


en donde

- "FUCO" significa un resto fucoidan, que opcionalmente contiene uno o más grupos amina primaria enlazados covalentemente a la cadena de fucoidan,
- C1 es el átomo de carbono en la posición 1 de la unidad de sacárido ubicada en el extremo reductor del resto fucoidan,
- «Lys» es una lisina o un derivado de lisina, y preferiblemente una lisina,
- x es al menos igual o superior a 1, preferiblemente igual a 2, 3, 4, 5 o 6 y lo más preferiblemente igual a 2 o 4.

20 De acuerdo con una realización preferida, aminoácidos tales como lisinas están enlazados covalentemente a través de grupos amida, para formar polilisininas o dendrímeros. Dichas polilisininas o dendrímeros se pueden obtener por cualquier método conocido en la técnica.

De acuerdo con otra realización particular,  $-\text{[NH]}_x\text{-R1}$  y/o un derivado de lisina pueden ser de fórmula (VII):



en donde

- «Lys» es una lisina o un derivado de lisina, y preferiblemente una lisina,
- x es al menos igual o superior a 1, preferiblemente igual a 2, 3, 4, 5 o 6 y lo más preferiblemente igual a 2 o 4.

Por lo tanto, dicha fórmula (VII) puede ser parte de un dendrímero de lisinas.

30 Aparte de las lisinas y polilisininas, otros aminoácidos y poliaminoácidos pueden acoplarse al fucoidan. En particular, la invención también se refiere a vectores de fórmula general (I) o (I'), en donde R1 se deriva de una arginina, una poliarginina y/o cualquier otro grupo químico que contenga guanidina.

### **Poliaminas y polieteraminas**

De acuerdo con otra realización, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde R1 se deriva de una poliamina o una polieteramina. Las polieteraminas pueden ser una monoamina polieteramina o una poliamina polieteramina, tal como una diamina o una triamina polieteramina, y preferiblemente una poliamina polieteramina.

Ventajosamente, la poliamina y/o polieteramina se pueden acoplar al fucoidan o un enlazador L a través de cualquiera de sus aminas primarias libres.

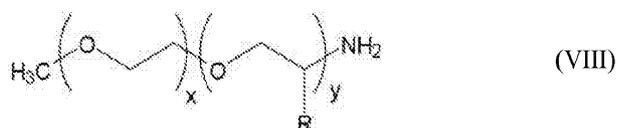
De acuerdo con una realización particular, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde R1 se selecciona del grupo que consiste en polieteraminas.

- 5 Tales polieteraminas son bien conocidas en la técnica y pueden venderse bajo el nombre de polieteraminas JEFFAMINE®.

Las polieteraminas contienen grupos amina primaria unidos al extremo de una cadena principal de poliéter. La cadena principal de poliéter se basa en unidades de óxido de propileno (PO), unidades de óxido de etileno (EO) o unidades mixtas de PO/EO.

- 10 La cadena principal de poliéter de polieteraminas de este tipo puede, por lo tanto, variar dependiendo de una relación de unidades PO/EO dada. Las polieteraminas pueden comprender grupos amina primaria en un extremo (a las que también se alude como monoaminas en esta memoria), en dos extremos (diaminas) o en tres extremos (triaminas).

A continuación se proporciona una fórmula general (VIII) de monoamina polieteraminas adecuada para la invención:



- 15 en donde R es H para (EO), o CH<sub>3</sub> para (PO), y preferiblemente CH<sub>3</sub>, en donde x e y pueden ser iguales o diferentes.

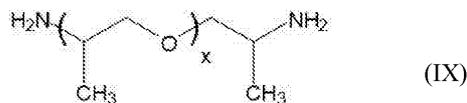
Dichas monoaminas se pueden preparar por reacción de un iniciador de mono-alcohol con EO y/o PO, seguido de la conversión de los grupos hidroxilo terminales resultantes en aminas.

- 20 De acuerdo con dicha realización, cuando R es igual a CH<sub>3</sub>, la relación y / x puede estar, en particular, en un intervalo de 0,1 a 10, en particular de 0,15 a 9.

Ventajosamente, una monoamina polieteramina de fórmula (VIII) puede tener un peso molecular medio que oscila entre 500 y 5000 g/mol<sup>-1</sup>, en particular entre 600 y 2000 g/mol<sup>-1</sup>.

- 25 Las monoamina polieteraminas que corresponden a la fórmula general arriba mencionada se venden como monoaminas JEFFAMINE® (serie M), por ejemplo M-600, M-1000, M-2005 y M-2070.

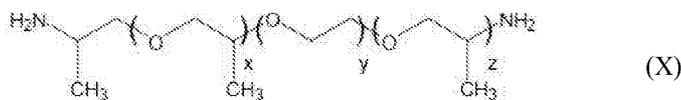
A continuación se proporciona una primera fórmula general (IX) de diamina polieteraminas adecuadas para la invención:



en donde x es un número entero que puede oscilar entre 1 y 100, en particular entre 2 y 70.

- 30 Ventajosamente, una diamina polieteramina de fórmula (IX) puede tener un peso molecular medio que oscila entre 100 y 5000 g/mol<sup>-1</sup>, en particular entre 200 y 4000 g/mol<sup>-1</sup>.

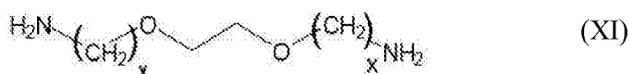
A continuación se proporciona una segunda fórmula general (X) de diamina polieteraminas adecuadas para la invención:



- 35 en donde x, y y z pueden ser iguales o diferentes, en donde y puede variar de 1 a 50, en particular de 2 a 40, en donde x y z pueden variar de 0 a 10, en particular de 0 a 6, en donde la suma de x y z puede variar opcionalmente de 1 a 6.

Ventajosamente, una diamina polieteramina de fórmula (X) puede tener un peso molecular medio que oscila entre 100 y 5000 g/mol<sup>-1</sup>, en particular entre 200 y 2000 g/mol<sup>-1</sup>.

A continuación se proporciona una tercera fórmula general (XI) de diamina polieteraminas adecuadas para la invención:

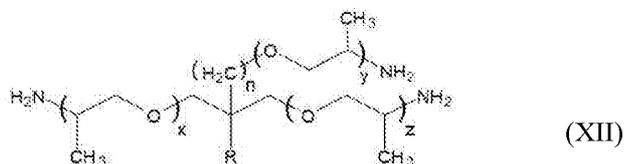


en donde x puede variar de 1 a 5, en particular de 1 a 3, y preferiblemente 2 o 3.

Ventajosamente, una diamina polieteramina de fórmula (XI) puede tener un peso molecular medio que oscila entre 100 y 500 g/mol<sup>-1</sup>, en particular entre 100 y 200 g/mol<sup>-1</sup>.

10 Las diamina polieteraminas pueden comercializarse como diaminas JEFFAMINE® (series D, ED, EDR), por ejemplo, D-230, D400, D-2000, D-4000, HK-511, ED-60D, ED-90D, ED-20D3, EDR-148, EDR-176.

A continuación se proporciona una fórmula general (XII) de triamina polieteraminas adecuadas para la invención:



en donde n puede ser igual a 0 o 1,

en donde R puede representar H o C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>,

15 en donde x, y y z pueden ser iguales o diferentes y pueden variar de 0 a 100, en particular de 0 a 85,

en donde la suma de x, y y z varía de 5 a 100, en particular de 5 a 85.

Las triamina polieteraminas se pueden comercializar como triaminas JEFFAMINE® (serie T), por ejemplo T-403, T-3000, T5000.

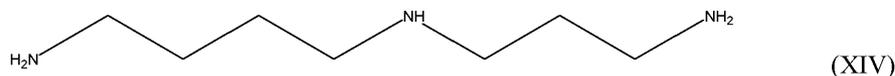
20 Preferiblemente, las polieteraminas se pueden elegir en el grupo que consiste en poliamina polieteraminas, y más preferiblemente diamina o triamina polieteraminas, tales como polieteraminas de fórmulas en las que x, y y z varían de 2 a 10.

Alternativamente, dicho vector es un compuesto de fórmula (I) o (I'), en donde R1 se deriva de una poliamina tal como espermina o espermidina, diaminopropano o dietilentriamina.

Espermina es una poliamina de fórmula (XIII):



Espermidina es una poliamina de fórmula (XIV):



Una poliamina o una polieteramina se enlaza con el fucoidan o un enlazador L utilizando cualquier método conocido en la técnica o descrito a continuación, o como se muestra en los ejemplos.

30 Por ejemplo, una poliamina o una polieteramina se puede enlazar a un fucoidan a través de una aminación reductora mediante una reacción de acoplamiento de extremo a extremo entre la función aldehído del azúcar reductor del fucoidan y la función amina de una polieteramina, tal como en Belbekhouche *et al.* (Belbekhouche S. *et al.*, 2013, Carbohydrate Polymers, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.032>).

35 Ventajosamente, compuestos de la invención pueden obtenerse adicionalmente de acuerdo con los métodos definidos a continuación, o como se ilustra en los **ejemplos 1, 2, 3 y 4**.

**t-PA vectorizado**

Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para preparar un t-PA vectorizado, que comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar un vector de la invención,  
b) proporcionar t-PA, y  
c) poner en contacto el vector proporcionado en la etapa a) con el t-PA proporcionado en la etapa b), con el fin de obtener complejos entre dicho vector y t-PA.

De acuerdo con una realización, la invención se refiere, además, a un t-PA vectorizado que comprende complejos de un vector de acuerdo con la invención, con t-PA.

- 10 De acuerdo con una realización, una composición que comprende un vector o un t-PA vectorizado de la invención se considera en una forma sustancialmente pura.

- 15 Una composición sustancialmente pura tal como se define anteriormente, y que comprende un vector o un t-PA vectorizado de acuerdo con la invención puede contener, como forma principal, un vector o un t-PA vectorizado, en el que el fucoidan está aminado en su extremo reductor, en comparación con la cantidad total de fucoidan en dicha composición o con la cantidad total de fucoidan aminado en dicha composición.

De acuerdo con dicha realización, una composición sustancialmente pura puede contener al menos 50% en una relación molar de un vector que está aminado en su extremo reductor, en donde dicha relación molar se basa en la cantidad total de fucoidan en dicha composición.

- 20 Alternativamente, una composición sustancialmente pura puede contener al menos 50% en una relación molar de un vector que está aminado en su extremo reductor, en donde dicha relación molar se basa en la cantidad total de fucoidan aminado en dicha composición.

- 25 Por lo tanto, una composición sustancialmente pura tal como se define anteriormente puede contener al menos 50% en una relación molar, y preferiblemente más, de un vector que está aminado en su extremo reductor, que incluye 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100% en relación molar.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de funciones amina en un polo del vector bipolar le permite interactuar con t-PA y plasminógeno y protegerlo.

- 30 Ventajosamente, es posible variar la cantidad media de vector que puede interactuar con t-PA como un complejo, o en el contexto de una composición farmacéutica.

De acuerdo con una realización particular, el t-PA vectorizado puede tener una relación molar de vector a t-PA que oscila entre 40:1 y 1:1; preferiblemente entre 20:1 y 3:1, y lo más preferiblemente entre 15:1 y 5:1.

De acuerdo con una realización preferida, la relación molar de vector a t-PA es de aproximadamente 10:1 cuando el vector es un mono.amina fucoidan, y aproximadamente 5:1 cuando el vector es un poli-amina fucoidan.

- 35 Por lo tanto, un t-PA vectorizado de acuerdo con la invención puede estar destinado para uso como un medicamento. En particular, dicho t-PA vectorizado puede estar destinado para uso como un ingrediente activo para prevenir o tratar un trombo en un sujeto.

- 40 De lo anterior, el experto en la técnica entiende que un vector o un t-PA vectorizado de la invención o, alternativamente, una composición farmacéutica que comprende un vector o un t-PA vectorizado de la invención, debería ser adecuado para una administración a un sujeto que lo necesite.

En particular, una composición farmacéutica de este tipo debería ser adecuada y/o compatible con una administración parenteral a un sujeto que lo necesite.

Preferiblemente, una composición farmacéutica de la invención debería ser estéril y/o carente de microorganismos.

**Restos fucoidan**

- 45 Los fucoidanos (también llamados fucos, fucosanos o fucanos sulfatados) son polisacáridos sulfatados con un amplio espectro de actividades biológicas, que incluyen actividades anticoagulantes, antitrombóticas, antivíricas, antitumorales, inmunomoduladoras, anti-inflamatorias y antioxidantes. Los fucoidanos se encuentran principalmente

en diversas especies de algas pardas (B. Li et al, *Molecules*, 2008, 13: 1671-1695; M. Kusaykin et al, *Biotechnol. J.*, 2008, 3: 904-915).

De acuerdo con una realización particular, un fucoidan o un resto fucoidan adecuado para la invención se obtiene a partir de algas y, en particular, de algas pardas.

- 5 También se han encontrado formas variantes de fucoidanos en especies de animales marinos, incluido el pepino de mar. Por lo tanto, en comparación con otros polisacáridos sulfatados, los fucoidanos están ampliamente disponibles a partir de diversos tipos de fuentes baratas, y se obtienen fácilmente utilizando métodos de extracción conocidos en la técnica (C. Collicet et al, *Phytochemistry*, 1994, 35(3):697-700).

- 10 Estos métodos de extracción generalmente proporcionan fucoidanos con pesos moleculares en el intervalo de 70-800 kDa. También se han desarrollado procedimientos para despolimerizar fucoidanos de alto peso molecular en fucoidanos de bajo peso molecular, p. ej., inferiores a aproximadamente 20 kDa (documento EP 0403 377B, Pat. de EE.UU. N° 5.321.133), o inferiores a aproximadamente 10 kDa (documento EP 0 846 129 B; Pat. de EE.UU. N° 6.028.191; A. Nardella et al, *Carbohydr. Res.*, 1996, 289: 201-208).

- 15 De acuerdo con una realización particular, un fucoidan o un resto fucoidan adecuado para la invención se obtiene de acuerdo con el método de extracción y despolimerización descrito en el **ejemplo 1**.

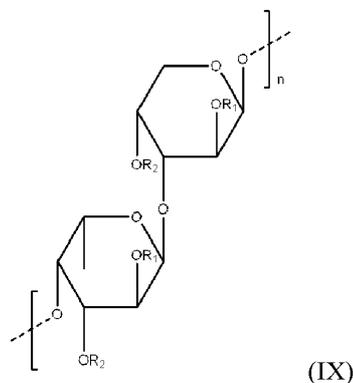
- 20 De acuerdo con otra realización, los fucoidanos se pueden obtener comercialmente de las siguientes compañías: Fucoidan de la compañía Sigma-Aldrich (EE.UU.): Fucoidan crudo (de *Fucus vesiculosus*) ref F5631, número CAS 9072-19-9. MM = 20,000 - 200,000 g/mol; Fucoidan de la compañía Algues-et-Mer (Francia): Asphyscient® (de *Ascophyllum nodosum*), a pedido, MM = 5.000 - 10.000 g/mol; Fucoidan de Kraeber GmbH (Alemania): a pedido, LMWF, 8.500 g/mol, HMWF, 600.000 g/mol, de diferentes algas pardas.

Los fucoidanos generalmente están hechos de una cadena principal lineal formada por un  $\alpha$ -1,3-L Fuc o alternando  $\alpha$ -1,3-L Fuc,  $\alpha$ -1,4-L Fuc o  $\alpha$ -1,2-L Fuc que puede estar presente en la ramificación de la cadena principal. Los grupos sulfato ocupan el C-2 y/o C-3 o C-4 de fucosa.

- 25 De acuerdo con una realización particular, los fucoidanos son polímeros de L-fucosa con enlaces  $\alpha$ -1,2 o  $\alpha$ -1,3 que están principalmente sulfatados en la posición 4 y en la posición 2 o 3 después del enlace glicosídico. Sin embargo, además de los residuos fucosa y sulfato, los fucoidanos también contienen otros monosacáridos (p. ej., manosa, galactosa, glucosa, xilosa, etc.) y grupos ácido urónico. Se sabe en la técnica que la estructura de los fucoidanos de diferentes algas pardas varía de una especie a otra.

- 30 Cuando los fucoidanos contienen ácido urónico (UA) y otras hexosas, la estructura de dichos fucoidanos se puede construir alrededor de una cadena principal lineal de poli-L fucosa polisulfatada que porta sustituyentes seleccionados en un grupo que consiste en: ácido urónico, una hexosa (1 unidad), un grupo sulfato y un grupo acetilo. Como un ejemplo, la estructura esquemática ampliamente admitida de fucoidan extraído del alga parda *Ascophyllum nodosum* se da en Berteau & Mulloy o Pomin & Mourao (O. Berteau y B. Mulloy, 2003, *Glycobiology*, 13(6) 29-40, DOI: 10.1093/glycob/cwg058; V. Pomin y PAS Mourao, 2008, *Glycobiology* 18(12) 1016-1027, revisión, DOI: 10.1093/glycob/cwn085).

De acuerdo con una realización preferida, un fucoidan puede estar compuesto por una unidad repetitiva de fórmula (IX):



en donde

- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> significan, uno independientemente del otro: H, un grupo sulfato, un grupo acetilo, una hexosa y/o ácido urónico,
- n es igual o superior a 1.

5 Además, la estructura de los fucoidanos también puede modificarse químicamente. Por ejemplo, se han desarrollado métodos para aumentar el porcentaje de grupos sulfato de fucoidanos con el fin de obtener fucoidanos sobresulfatados o fragmentos de fucoidan sobre-sulfatados (T. Nishino et al, Carbohydr. Res., 1992, 229: 355-362; S. Soeda et al., Thromb. Res., 1993, 72: 247-256).

De acuerdo con una realización particular, el fucoidan o el resto fucoidan está polisulfatado.

10 De acuerdo con una realización más particular, dicho fucoidan polisulfatado tiene una relación de sulfato a azúcar superior a 1, en particular superior a 1,2, preferiblemente superior o igual a 1,9.

De acuerdo con una realización particular, el fucoidan o el resto fucoidan comprende aminas primarias enlazadas covalentemente a la cadena de fucoidan, pero no al extremo reductor de dicho fucoidan.

Alternativamente, cuando el fucoidan es un aminofucoidan, dicho aminofucoidan comprende, además, aminas primarias enlazadas covalentemente a la cadena de fucoidan.

15 De acuerdo con dichas realizaciones, dicho fucoidan o aminofucoidan pueden comprender por término medio entre 1 y 10 aminas primarias por cadena de fucoidan.

De acuerdo con una realización más particular, dicho fucoidan o aminofucoidan está aminado en un grupo hidroxilo libre de la cadena de fucoidan, por ejemplo de una fucosa, por una amina primaria.

20 Dicha aminación, que es distinta de una aminación en el extremo reductor de dicho fucoidan, puede lograrse, por ejemplo, utilizando el protocolo definido en el **ejemplo 1**.

25 Restos fucoidan adecuados para uso en la presente invención son restos fucoidan que tienen un cierto grado de atracción para las selectinas, en particular la P-selectina, y que pueden desempeñar un papel de fijación de objetivo cuando son parte de un agente vectorizante. Preferiblemente, los restos fucoidan son entidades estables y no tóxicas que conservan sus propiedades de afinidad/especificidad/selectividad en condiciones in vitro e in vivo. En realizaciones preferidas, los restos fucoidan exhiben una alta afinidad y especificidad para las selectinas, es decir, interactúan específica y eficazmente, se unen a o se asocian con las selectinas. Restos fucoidan adecuados incluyen fucoidanos que muestran afinidad y especificidad para solo una de las selectinas (es decir, para L-selectina, E-selectina o P-selectina), así como fucoidanos que exhiben afinidad y especificidad para más de una selectina, incluyendo aquellos restos que pueden interactuar, unirse o asociarse eficientemente con las tres selectinas.

30 Preferiblemente, la interacción entre una selectina y un resto fucoidan como parte de un agente vectorizante es lo suficientemente fuerte durante al menos el tiempo necesario para vectorizar t-PA a un trombo. En determinadas realizaciones, un resto fucoidan adecuado interactúa con una selectina con una constante de disociación (K<sub>D</sub>) entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 500 nM, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 nM y aproximadamente 10 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 5 nM.

35 Los fucoidanos pueden ser de alto peso molecular o de bajo peso molecular.

Un «peso molecular», de acuerdo con la invención, se refiere al «peso molecular medio ponderado», o Mw.

Un «fucoidan de bajo peso molecular», de acuerdo con la invención, se refiere a cualquier fucoidan con un peso molecular medio igual o inferior a 20000 Da, en particular dentro de un intervalo entre 2000 y 20000 Da.

40 Un "fucoidan de alto peso molecular", de acuerdo con la invención, se refiere a cualquier fucoidan con un peso molecular medio superior a 20000 Da, en particular dentro de un intervalo entre 20000 y 600000 Da.

En determinadas realizaciones, el resto fucoidan tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2000 a aproximadamente 8000 Da. En otras realizaciones, el resto fucoidan tiene un peso molecular medio de aproximadamente 20000 a aproximadamente 70000 Da. En aún otras realizaciones, el resto fucoidan tiene un peso molecular medio de aproximadamente 100000 a aproximadamente 500000 Da.

45 De acuerdo con una realización, el resto fucoidán tiene un peso molecular medio que es inferior a 100000 Da, y preferiblemente inferior a 20000 Da, por ejemplo entre 2000 y 20000 Da.

De acuerdo con otra realización, el resto fucoidan tiene un peso molecular medio que oscila entre 2000 Da y 15000 Da.

De acuerdo con una realización particular, los fucodainos se eligen entre fucoidanos de bajo peso molecular, tales como los descritos en el documento WO2010116209.

### **Métodos para obtener amino-fucoidanos**

5 A continuación se enseñan métodos para obtener aminofucoidanos de acuerdo con la invención. El experto en la técnica puede adaptar fácilmente dichos métodos a su conveniencia para obtener aminofucoidanos particulares.

De una manera no limitativa, una estrategia para sintetizar derivados de amina de fucoidanos, a los que también se alude como "aminofucoidanos", puede ser un procedimiento de dos etapas:

#### 1. Aminación reductiva de fucoidan en el extremo reductor

10 a. Formación por base de Schiff (imina) entre un aldehído del polisacárido y una amina primaria de un espaciador, a saber, un «compuesto puente», tal como diaminopropano (DAP). Esta reacción es reversible en un medio acuoso.  
b. Reducción de la imina en una amina para bloquear la reversibilidad de dicha reacción.

#### 2. Acoplamiento de residuos o derivados de aminoácidos haciendo reaccionar la función carboxílica (-COOH) en su extremo C-terminal y la amina primaria del diaminopropano que ha sido fijada en el resto fucoidan en la etapa 1.

15 Esa segunda etapa se logra, por ejemplo, utilizando reactivos de acoplamiento de activación, tales como NHS y EDC. Dichos reactivos NHS y EDC están disponibles comercialmente y son vendidos por compañías tales como Sigma Aldrich (Ref. 130672 o Ref. 03449).

20 Este protocolo de dos etapas tiene la ventaja de ser específico para la reacción entre el grupo aldehído y el extremo reductor de la cadena polisacáridica y la amina primaria del espaciador. Tiene las ventajas de (i) ser simple y robusto y (ii) limitar la modificación estructural del resto polisacárido hasta el final, para evitar el riesgo de perjudicar la actividad biológica cuando se realizan modificaciones químicas dentro de la cadena (O. Roger *et al.*, 2002, « Polysaccharide labelling: impact on structural and biological properties », *Carbohydr. Pol.*, 50(3)273-278). La segunda etapa es una reacción de acoplamiento clásica entre una función amina primaria y una función carboxílica en un medio acuoso y, por lo tanto, es fácil, de seguir (G.T. Hermanson, « Bioconjugate Techniques » Academic Press, 2008).

25 Además, la robustez de dicho protocolo permite ventajosamente reemplazar el diaminopropano (DAP) por otros «espaciadores», o enlazadores L, con el fin de obtener cualquier aminofucoidan que comprenda al menos un grupo amino libre en su extremo, en particular una amina primaria.

Un «espaciador», de acuerdo con la invención, comprende, y preferiblemente consiste en cualquier compuesto que tenga al menos dos grupos amino libres, tales como aminas primarias libres.

30 Ventajosamente, dicho diaminopropano (DAP) puede sustituirse por cualquier compuesto que comprenda dos aminas primarias libres.

Por lo tanto, la invención contempla, además, aminofucoidanos de los cuales el espaciador no es diaminopropano (DAP) y/o cuyo extremo reductor no está funcionalizado por un diaminopropano.

35 Por lo tanto, la invención también se refiere a un vector que tiene una propiedad de unión a t-PA, que consiste en un resto fucoidan que está aminado por un enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y un grupo químico que comprende uno o más grupos amino, en donde dicho grupo químico no se obtiene dirigido a partir del enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y diaminopropano.

40 De acuerdo con una realización particular, el diaminopropano (DAP) de fórmula  $(\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2)$  puede sustituirse en una primera etapa con otros compuestos que contienen aminas primarias libres, tales como, por ejemplo, poliaminas y, en particular, dietilentriamina. (DETA) de fórmula  $(\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2)$ .

Se entiende que la invención también contempla aminofucoidanos, de los cuales el espaciador no es dietilentriamina (DETA) y/o cuyo extremo reductor no está funcionalizado por una dietilentriamina.

45 Por lo tanto, la invención también se refiere a un vector que tiene una propiedad de unión a t-PA que consiste en un resto fucoidan que está aminado por un enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y un grupo químico que comprende uno o más grupos amino, en donde dicho grupo químico no se obtiene dirigido a partir del enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y dietilentriamina.

De acuerdo con una realización particular, los residuos o derivados de aminoácidos que pueden acoplarse en la segunda etapa de la reacción pueden seleccionarse en un grupo que comprende, y preferiblemente consiste en ácido aminocaproico, ácido tranexámico, una lisina o una poli/oligolisina, o un derivado de lisina.

5 También se informan otras estrategias, que podrían definirse como "estrategias alternativas". Aunque pueden sustituir el método de dos etapas tal como se definió anteriormente, también están impedidas por algunas limitaciones.

Tres de esas "estrategias alternativas" se desarrollan a continuación.

#### A. Formación de una lactona

10 En una realización particular, un aminofucoidan se puede obtener a través de la formación de una lactona tal como en Hernandez *et al.* (Hernandez et al., 2007, "Synthesis, reactivity, and pH-responsive assembly of new double hydrophilic block copolymers of carboxymethyl dextran and poly (ethylene glycol)", Polymer 48, págs. 921-930).

De acuerdo con esta realización particular, el método comprende las etapas de:

15 1. Formación de una lactona en el extremo reductor del fucoidan por oxidación del azúcar reductor con una mezcla de di-yoduro y potasa.  
2. Reacción de una molécula que porta una amina primaria, tal como un residuo o un derivado de aminoácido, a través de dicha amina con la lactona para formar un enlace amida.

20 De acuerdo con dicha realización, el azúcar oxidado debe estar exento de cualquier sustituyente, de modo que la oxidación siga siendo eficiente, lo cual no es necesariamente cierto para todos los fucoidanos sulfatados. El derivado de amina que reacciona con la lactona también debe estar en gran exceso. Además, la reacción puede durar unos pocos días a 60°C, lo que podría alterar la estructura del propio fucodain, contrariamente al dextrano que se enseña en Hernández *et al.*

#### B. Formación de una semicarbazona o una tiosemicarbazona

25 En otra realización particular, un aminofucoidan se puede obtener a través de la formación de una semicarbazona o una tiosemicarbazona tal como en Zhang *et al.* (Zhang et al., 2011, "One-pot fluorescent labeling of saccharides with fluorescein-5-thiosemicarbazide for imaging polysaccharides transported in living cells", Carbohydr. Res., 346 págs. 2156-2164). Dicha semicarbazona se puede obtener, por ejemplo, por condensación de una semicarbazida con un aldehído o una cetona.

Cuando la semicarbazona se obtiene a través de la condensación de un aldehído (el extremo reductor de un polisacárido, por ejemplo), la reacción es la siguiente:



en donde R es un polisacárido, tal como un fucoidan, y  
en donde R' es una estructura de carbono, tal como un fluoróforo.

La semicarbazona se estabiliza por reducción del doble enlace C=N.

35 De acuerdo con dicha realización, la semicarbazida se puede sintetizar de tal manera que el radical R' contiene una función amina libre (-NH<sub>2</sub>), en particular una función amina (-NH<sub>2</sub>) que se puede acoplar adicionalmente, a través de EDC/NHS, con la función carboxílica de los otros compuestos, tales como aminoácidos y/o derivados de aminoácidos.

#### C. Formación de una oxima

40 En otra realización particular, se puede obtener un aminofucoidan a través de la formación de una oxima tal como en Novoa-Carballal & Müller (Novoa-Carballal y Müller, 2012, "Synthesis of polysaccharide-b-PEG block copolymers by oxime click", Chem Comm, 48 págs. 3781-3783).

Dicha realización particular se basa en la llamada "química click", que permite condensar en una sola etapa el extremo reductor (aldehído) de un polisacárido tal como fucoidan, con un derivado de R-O-NH<sub>2</sub>.

45 De acuerdo con dicha realización, el derivado de R-O-NH<sub>2</sub> debe prepararse a partir de un precursor R-OH de acuerdo con la síntesis orgánica compleja (reacción de Mitsunobu). La oxima se forma eficientemente a pH 3 y a 45°C. En esas condiciones, el fucoidan, que es sensible a un pH inferior a 5, tendría una tendencia a degradarse rápidamente.

Por lo tanto, todos los compuestos que son aminoácidos, tales como lisinas, polilisinas y derivados de lisina que poseen una función ácido carboxílico, y que, además, son solubles en agua, pueden considerarse para esta estrategia.

5 También se puede considerar la síntesis de aminofucoidanos que comprenden dendrímeros de lisina. De acuerdo con esa realización particular, dichos dendrímeros deben sintetizarse por separado y antes de la etapa de acoplamiento al fucoidan.

10 Preferiblemente, cuando se consideran poliaminoácidos, tales como oligolisinas y/o dendrímeros, se debe tener cuidado para evitar la formación de interpolielectrólitos, lo que puede resultar en el plegamiento de la cadena peptídica catiónica en el polisacárido aniónico (en ese caso, el aminofucoidan), y que puede reducir la solubilidad en agua de dicho aminofucoidan.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a aminofucoidanos que pueden obtenerse de acuerdo con dichos métodos, en particular compuestos de fórmula (I), (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI').

15 Los fucoidanos y aminofucoidanos, de acuerdo con la invención, pueden caracterizarse, además, por sus propiedades físico-químicas, en particular su grado de aminación, su grado o porcentaje en masa de fucosa, su grado o porcentaje en masa de ácido urónico o glucurónico, su grado o porcentaje en masa de sulfatación y su peso molecular.

20 Dichas propiedades deben entenderse como valores medios. Los porcentajes en masa se pueden expresar en %, así como en g/100 g. Por lo tanto, el experto en la técnica también considerará las preparaciones de fucoidanos y aminofucoidanos como mezclas o preparaciones heterogéneas, que no necesariamente comprenden un solo tipo de fucoidan o aminofucoidan, sino un conjunto de compuestos relacionados entre sí de acuerdo con las propiedades físico-químicas medias.

De acuerdo con una realización particular, dichos aminofucoidanos tienen un grado de aminación que oscila entre aproximadamente 0,1 NH<sub>2</sub>/mol y aproximadamente 3 NH<sub>2</sub>/mol, en particular que oscila entre aproximadamente 1 NH<sub>2</sub>/mol y aproximadamente 3 NH<sub>2</sub>/mol, y preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 NH<sub>2</sub>/mol.

25 De acuerdo con una realización particular, dichos fucoidanos tienen un porcentaje en masa de fucosa que oscila entre aproximadamente 30% y aproximadamente 60%, en particular que oscila entre aproximadamente 30% y aproximadamente 50%.

30 De acuerdo con una realización particular, dichos fucoidanos tienen un porcentaje en masa de ácido glucurónico que oscila entre aproximadamente 5% y aproximadamente 40%, en particular que oscila entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%.

De acuerdo con una realización particular, dichos fucoidanos tienen un porcentaje en masa de sulfato que oscila entre 10% y aproximadamente 45%, en particular que oscila entre aproximadamente 15% y aproximadamente 40%.

35 De acuerdo con una realización particular, dichos fucoidanos tienen un peso molecular medio que es inferior a 100 000 Da, y preferiblemente inferior a 20 000 Da. De acuerdo con una realización preferida, dichos fucoidanos tienen un peso molecular medio que oscila entre 2000 Da y 15 000 Da.

### **Composiciones farmacéuticas**

Como ya se mencionó anteriormente, la invención se refiere a un método para preparar un t-PA vectorizado, que comprende las etapas de:

40 a) proporcionar un vector de la invención,  
b) proporcionar t-PA, y  
c) poner en contacto el vector proporcionado en la etapa a) con el t-PA proporcionado en la etapa b), con el fin de obtener complejos entre dicho vector y t-PA.

Por lo tanto, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende complejos de un vector de acuerdo con la invención con t-PA.

45 Ventajosamente, una composición farmacéutica que comprende dichos complejos se puede obtener de acuerdo con dicho método.

De acuerdo con una realización particular, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una relación molar de vector a t-PA que oscila entre 40:1 y 1:1; preferiblemente entre 20:1 y 3:1, y lo más preferiblemente entre 15:1 y 5:1.

De acuerdo con una realización preferida, la relación molar de vector a t-PA en dicha composición farmacéutica es de aproximadamente 10:1 cuando el vector es un mono-amina fucoidan, y de aproximadamente 5:1 cuando el vector es un poli-amina fucoidan. Alternativamente, la invención se refiere a un kit que comprende:

- 5 - un primer recipiente que comprende un vector de la invención, y
- un segundo recipiente que comprende t-PA.

Un «recipiente» adecuado para la invención puede ser cualquier recipiente farmacéutico conocido en la técnica, preferiblemente un recipiente estéril, que sea directamente adecuado para inyección, o que pueda ser adecuado para preparar una muestra inyectable, solo o cuando se mezcle con un segundo recipiente de acuerdo con la invención. Ejemplos de dichos recipientes pueden seleccionarse en un grupo que comprende píldoras, comprimidos, 10 cápsulas, frascos, jeringas, agujas, catéteres, bombas de infusión, ampollas y, más generalmente, cualquier pequeño frasco sellado que se puede utilizar para contener y conservar una muestra. Dichos recipientes pueden estar hechos de vidrio o plástico, tal como polipropileno.

Ventajosamente, dichos recipientes se mezclan posteriormente con el fin de conseguir una composición farmacéutica específica de acuerdo con la invención.

15 De acuerdo con esta realización particular, el experto en la técnica puede ajustar fácilmente la cantidad de vector y t-PA en cada uno de los recipientes, con el fin de alcanzar una relación específica de vector a t-PA.

A menudo, las composiciones farmacéuticas se administrarán mediante inyección. Para la administración mediante inyección, las composiciones farmacéuticas de agentes trombolíticos pueden formularse como soluciones acuosas o no acuosas estériles o, alternativamente, como polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. Dichas composiciones farmacéuticas deben ser estables en las condiciones de fabricación y 20 almacenamiento, y deben conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

La invención se refiere, además, a un recipiente que comprende un vector de la invención, y t-PA. Ventajosamente, cuando dicho vector y dicho t-PA se formulan en una forma anhidra, tal como polvos estériles, la composición farmacéutica se puede reconstituir entonces en un solo recipiente con una composición adecuada y sin ninguna 25 etapa de mezcladura adicional.

Soportes farmacéuticamente aceptables para administración mediante inyección son disolventes o medios de dispersión, tales como soluciones acuosas (p. ej., solución de Hank, soluciones alcohólicas/acuosas o soluciones salinas) y soportes no acuosos (p. ej., propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables, 30 tales como oleato de etilo). Composiciones farmacéuticas inyectables también pueden contener vehículos parenterales (tales como cloruro de sodio y dextrosa de Ringer), y/o vehículos intravenosos (tales como reponedores de líquidos y nutrientes); así como otros aditivos y excipientes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que incluyen sales, tampones y conservantes, tales como agentes antibacterianos y antifúngicos (p. ej., parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares). La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr añadiendo agentes que pueden retrasar la absorción (p. ej., monoestearato de aluminio y gelatina). 35 Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente el pH y la concentración de las composiciones.

De acuerdo con una realización preferida, el pH de una composición que comprende un aminofucoidan debe estar comprendido entre 5 y 8.

40 Soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el o los compuestos activos y otros ingredientes en la cantidad requerida de un disolvente apropiado, y luego esterilizando la mezcla resultante, por ejemplo mediante filtración o irradiación. Los métodos de fabricación de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles son bien conocidos en la técnica e incluyen técnicas de secado al vacío y secado por congelación.

En general, la dosis de un t-PA vectorizado (o composición farmacéutica del mismo) variará dependiendo de consideraciones tales como la edad, el sexo y el peso del paciente, así como la afección patológica particular que se sospecha afectará al paciente, la extensión del enfermedad o la o las zonas del cuerpo a examinar. Factores tales como contraindicaciones, terapias y otras variables también deben tenerse en cuenta para ajustar la dosis del agente a administrar. Esto, sin embargo, puede lograrse fácilmente por un médico entrenado. En general, una dosis diaria adecuada de un t-PA vectorizado (o composición farmacéutica del mismo) corresponde a la cantidad más baja de t-PA (o composición farmacéutica) que es suficiente para permitir la prevención o el tratamiento del trombo en un 45 sujeto.

La dosis diaria para la administración de t-PA, tal como t-PA vectorizado y no vectorizado, se puede expresar en molaridad o como una masa. Cuando una dosis diaria se expresa como una masa de t-PA administrado, debe entenderse en términos de "dosis equivalente de t-PA".

De acuerdo con la invención, una "dosis equivalente de t-PA" significa la masa de t-PA vectorizado que se administraría con relación a un t-PA no vectorizado, si las dos moléculas tuvieran el mismo peso molecular. Por ejemplo, el experto en la técnica puede calcular fácilmente dicha conversión al considerar el peso molecular medio de un t-PA de referencia (es decir, t-PA no vectorizado) y el peso molecular medio de un t-PA vectorizado de acuerdo con la invención.

Para minimizar esta dosis, se prefiere que la administración sea intravenosa. La administración intravascular puede ser proximal (es decir, inyección intra-coágulo) o distal al sitio diana (intravenosa). Ventajosamente, el t-PA vectorizado (o composición farmacéutica del mismo) es adecuado para administración distal.

Una dosis diaria puede depender de muchos factores, tales como el peso y la edad del paciente, la localización del coágulo de sangre seleccionado y la frecuencia o el modo de administración, es decir, proximal o distal. Por ejemplo, la inyección intra-coágulo de t-PA recombinante se ha propuesto para el tratamiento de la trombosis venosa profunda aguda tal como se enseña en Chang et al. (Chang et al., 2011, Low Dose Once Daily, Intraclot Injections of Alteplase for Treatment of Acute Deep Venous Thrombosis, J. Vasc Interv Radiol., 22(8):1107-1116). De acuerdo con dicho protocolo, una inyección intra-coágulo puede ser eficiente con una dosis total media de 7,1 mg de t-PA por paciente, con una media de 2,1 tratamientos o días de terapia.

Para el infarto agudo de miocardio (MI), el t-PA vectorizado puede administrarse, por ejemplo, como una infusión acelerada (durante 1-1/2 horas) o como una infusión de 3 horas.

En otras realizaciones tal como para tratar la apoplejía isquémica aguda, la dosis total puede alcanzar, por ejemplo, 90 mg.

Por lo tanto, la dosis diaria dependerá principalmente del peso del paciente y de la duración de la inyección. Para comparación, el t-PA no vectorizado se puede administrar de forma periférica a un paciente de menos de 67 kg y para tratar el MI agudo de 1 a 1 h 30 en bolo a lo largo de 1-2 minutos (15 mg), y luego se puede administrar (0,75 mg/kg) durante 30 minutos a una dosis de hasta 50 mg; en una última etapa, se inyectan 0,5 mg/kg de t-PA a lo largo de los siguientes 60 minutos, y preferiblemente en una dosis que no exceda de 35 mg. Por consiguiente, la dosis final de t-PA que se puede inyectar puede alcanzar, por ejemplo, 100 mg. Ventajosamente, la vectorización de t-PA con aminofucoidanos es susceptible de superar los problemas relacionados con la administración de dosis altas al reducir la dosis diaria mínima y, por lo tanto, en realizaciones particulares, puede permitir al menos una disminución de 1 log, en realizaciones particulares al menos una disminución de 2 log, en términos de dosis diaria requerida.

En realizaciones particulares, el t-PA vectorizado puede administrarse como una inyección intra-coágulo para tratar o prevenir la trombosis venosa profunda aguda, a una dosis diaria mínima igual o inferior a 7 mg, en particular igual o inferior a 5 mg, en particular igual o inferior a 2 mg, en particular igual o inferior a 1 mg para la trombolisis de coágulos eficiente.

En otras realizaciones, el t-PA vectorizado se puede administrar a una dosis diaria normal o incrementada sin experimentar síntomas secundarios que habitualmente se asocian con la inyección de t-PA. Alternativamente, dichos síntomas pueden reducirse o prevenirse, en comparación con un t-PA no vectorizado, cuando la dosis diaria se mantiene constante.

En realizaciones particulares, el t-PA vectorizado puede administrarse así a una dosis diaria más alta. Ventajosamente, dicha dosis diaria puede ser igual o superior a 100 mg, igual o superior a 150 mg. En realizaciones particulares, la dosis diaria puede ser igual o superior a 200 mg o 300 mg.

El experto en la técnica es capaz de modular dichas dosis diarias de acuerdo con las necesidades del paciente, y dependiendo de la afección a tratar.

## EJEMPLOS

Los fucoidanos de partida que se utilizan en los siguientes ejemplos se obtuvieron de fuentes comerciales que se describen a continuación:

1) Fucoidan de la compañía Sigma-Aldrich (EE.UU.): Fucoidan crudo (de *Fucus vesiculosus*) ref F5631, número CAS 9072-19-9. MM = 20.000-200.000 g/mol.

2) Fucoidan de la compañía Algues-et-Mer (Francia): Asphyscient® (de *Ascophyllum nodosum*), a pedido, MM = 5.000-10.000 g/mol.

3) Fucoidan de Kraeber GmbH (Alemania): a pedido, LMWF, 8.500 g / mol, HMWF, 600.000 g/mol, de diferentes algas pardas.

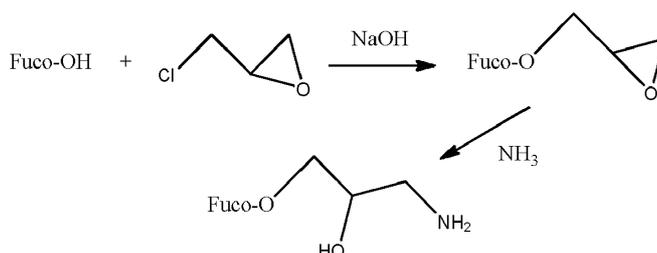
### Ejemplo 1:

*Aminación del grupo hidroxilo de un fucoidan.*

5 El fucoidan (500 mg, 1 mmol de 5 kDa) se disuelve en 15 mL de agua y se mezcla con 5 mL de NaOH 2,5 M y 0,1 mL de epíclorhidrina (1,3 mmol). La mezcla se agita a 40°C durante 2 h y se dializa frente a agua a 25°C durante 2 días. Después de liofilizar el dializado, el residuo se disuelve en 3 mL de amoníaco al 30% (v/v) en agua y se amina a 40°C durante 90 min. La mezcla de reacción se dializa frente a agua y se liofiliza para dar un fucoidan aminado.

De acuerdo con dicho protocolo, la cantidad de aminas primarias depende de la cantidad de epíclorhidrina que se introduce en la reacción. Para una cantidad mínima de epíclorhidrina, que puede corresponder a 0,1 mL de epíclorhidrina, el número medio de aminas primarias que se introducen oscila entre 1 y 10 aminas primarias por cadena de fucoidan.

10 La reacción se puede describir como sigue:



en donde Fuco significa fucoidan.

15 Sin embargo, el principal inconveniente de dicha reacción es que no es posible controlar con precisión dónde se producirá la sustitución dentro de la cadena, ya que dicha reacción puede ocurrir en cualquiera de las funciones de hidroxilo (-OH) nacidas por el fucoidan, en particular la fucosa.

Por lo tanto, dicho método no es adecuado para fijar como objetivo el extremo reductor de dicho fucoidan.

**Ejemplo 2:**

*Construcción de la molécula o el sistema bipolar utilizando una estrategia de dos etapas.*

20 La etapa química principal es el acoplamiento del extremo reductor de fucoidan con moléculas portadoras de aminas primarias, es decir, lisina, oligolisina o miméticos de lisina y la reducción de la imina en aminas secundarias tal como se describe ampliamente en los libros de química orgánica básica. Dependiendo del tipo de moléculas aminadas (es decir, DAP y DETA-fuco), aquí se ilustran dos estrategias diferentes.

**Estrategia 1:**

25 En una primera etapa, Fucoidan (F) se enlaza a diaminopropano ( $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$ ), lo que conduce a  $\text{F-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$  (es decir, F-NH<sub>2</sub>). Por lo tanto, dicho aminofucoidan se define como un DAP-fuco.

En un tubo de vidrio reforzado, disolver 500 mg de fucoidan seco en 5,4 mL de una solución de diaminopropano 1,5 M en agua bidestilada. El tubo se cierra y se calienta durante 3 horas a 90°C. Después de enfriar, se añaden 1,4 mL de dimetilborano 3M recién preparado en ácido acético glacial, y la mezcla se calienta durante 3 h a 90°C.

30 La solución se neutraliza, se dializa (5 x 1 L con NaCl 1M en tampón carbonato 45 mM, pH 9,6; 5 x 1 L con NaCl 0,5 M en agua/etanol 80/20 (v:v); 5 x 1 L en agua bidestilada; en una cámara de diálisis con un corte de 3000 Da y se liofiliza. F-NH<sub>2</sub> se obtiene en forma de un sólido blanco esponjoso con un rendimiento del 60% (p/p).

Posteriormente, la lisina, la oligolisina (2-4 lisinas), el ácido épsilon-aminocaproico o el ácido tranexámico, a los que se aludirá en esta memoria como "derivados de aminoácidos", se enlazan opcionalmente a F-NH<sub>2</sub> en una segunda etapa, tal como se muestra a continuación.

35 A una solución de 5 mL de derivado de aminoácido 10,4 mM en agua bi-distilada se añaden sucesivamente 20 mg de EDC y 12 mg de NHS, a temperatura ambiente. La mezcla se mantiene bajo agitación durante 15 minutos antes de la adición de 76,4 mg de F-NH<sub>2</sub>.

Después de 2 h bajo agitación a temperatura ambiente, la solución se dializa (5 x 1 L con NaCl 1M en tampón carbonato 45 mM pH 9,6; 5 x 1 L con NaCl 0,5 M en agua/etanol 80/20 (v:v); 5 x 1 L en agua bidestilada; corte 3000 D) y se liofiliza).

**Estrategia 2:**

- 5 Fucoidan (F) se enlaza directamente a la dietilentriamina (DETA = NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) tal como se muestra a continuación. Por lo tanto, el aminofucoidan que se sintetiza se define como un DETA-fuco.

En un tubo de vidrio reforzado, disolver 500 mg de fucoidan seco en 5,4 mL de solución DETA 1,5 M en agua bidestilada. El tubo se cierra y se calienta durante 3 h a 90°C. Después de enfriar, se añaden 1,4 mL de dimetilborano 3M recién preparado en ácido acético glacial, y la mezcla se calienta durante 3 h a 90°C.

- 10 La solución se neutraliza y se dializa (5 x 1 L con NaCl 1M en tampón de carbonato 45 mM pH 9,6; 5 x 1 L con NaCl 0,5 M en agua/etanol 80/20 (v:v); 5 x 1 L en agua bidestilada; corte 3000 D) y se liofiliza).

Después de ello, la lisina, la oligolisina (2-4 lisinas), el ácido épsilon-aminocaproico o el ácido tranexámico se enlazan a F-NH<sub>2</sub> tal como se muestra en la **estrategia 1**.

- 15 A una solución de 5 mL de derivado de aminoácido 10.4 mM en agua bidestilada se añaden sucesivamente 20 mg de EDC y 12 mg de NHS, a temperatura ambiente. La mezcla se mantiene bajo agitación durante 15 min antes de la adición de 76,4 mg de F-NH<sub>2</sub>.

Después de 2 h bajo agitación a temperatura ambiente, la solución se dializa (5 x 1 L con NaCl 1M en tampón carbonato 45 mM pH 9,6; 5 x 1 L con NaCl 0,5 M en agua/etanol 80/20 (v:v); 5 x 1 L en agua bidestilada; corte 3000 D) y se liofiliza).

- 20 **Conclusión:** se han obtenido y testado varias aminas y derivados de aminoácidos, tales como, por ejemplo, fucodiaminopropano (DAP-fuco), fuco-dietilentriamina (DETA-fuco), ácido fuco-tranexámico (tran-fuco), fuco-mono/polilisina (Lys-fuco, diLys-fuco, triLys-fuco ...).

**Ejemplo 3:**

*Propiedades físico-químicas de fucoidanos y aminofucoidanos.*

- 25 **A. Material y Métodos.**

Quantificación de la aminación

La cantidad de amina primaria se determinó con un ensayo colorimétrico de ftalaldehído utilizando bromopropilamina como patrón siguiendo el trabajo de Roth (M. Roth, 1971 "Fluorescence reaction for amino acids." *Analytical Chemistry*, 43, 880-882).

- 30 Quantificación de fucosa

La cuantificación de fucosa se ha determinado de acuerdo con Dische (Z. Dische, 1955, New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. *Methods Biochem. Anal.* 313-358).

Quantificación del ácido glucurónico

- 35 La cuantificación del ácido glucurónico se ha determinado de acuerdo con Bitter y Muir (T. Bitter y H.M. Muir, 1962, A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4 330-334)

Quantificación del sulfato

- 40 La cuantificación del sulfato se puede determinar de acuerdo con los protocolos descritos en Bachelet *et al.* (Bachelet *et al.*, 2009, Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim Biophys Acta.*, 1790(2) 141-146), adaptado de Gustafsson (L. Gustafsson, 1960, Determination of ultramicro amounts of sulphate as methylene blue--II: The reduction, *Talanta* 4, 236).

Los sulfatos se reducen en forma de sulfuros de hidrógeno utilizando ácidos yodhídrico e hipofosforoso en solución de ácido acético; luego se complejan con Zn<sup>2+</sup> y se deja que reaccionen con una diamina aromática. La formación de azul de metileno se cuantifica con absorción a 670 y 744 nm.

Análisis de la masa molecular.

5 El análisis de la masa molecular se puede determinar utilizando la técnica MALLS (Multi Dispersión de luz láser en ángulo). En resumen, se carga una columna de cromatografía de filtración en gel (GMPWxl de TSKgel), equilibrada en tampón Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, azida sódica al 0,02%), a 0,5 mL/min. (Bomba HPLC Dionex Ultimate 3000). La señal se detecta además utilizando un detector de índice de refracción (lota2, Precision Instrument) y un detector de dispersión de la luz (TREOS, Wyatt).

Análisis del espectro infrarrojo (IR)

10 Se registra un espectro IR utilizando la espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier en un aparato Nicolet avatar, utilizando el paquete de programas Omnic (Nicolet). La muestra se prepara en bromuro de potasio (KBr) en el intervalo de 2% en peso de producto liofilizado y se registra con 32 exploraciones. El espectro de KBr solo se registra en condiciones similares y se resta automáticamente.

Análisis de <sup>1</sup>H-RMN

15 Se registró un espectro de <sup>1</sup>H en un Bruker 500 Avance III de RMN (sonda: 5 mm PAQXI 1H/X) en disolvente D2O (99,9%) después de 3 liofilizaciones: TD 32k; 16 exploraciones; SW: 10 ppm/500 Hz; P90°: 9,5 μs; Temperatura 300 K; DI: 1 s.

**B. Resultados.**

Las propiedades físico-químicas de un conjunto de fucoidanos y aminofucoidanos de acuerdo con la invención se han medido y resumido en la siguiente tabla:

	Aminación (NH <sub>2</sub> /mol PS)	Fucosa (g/100g)	Ácido glucurónico (g/100g)	Sulfato (g/100g)	PM (*) (g/mol)
Fucoidan	-	30,2 ± 4,1	19,5 ± 5,2	17,8 ± 2,4	5000
Fucoidan-DAP	1,05 ± 0,01	49,3 ± 4,6	25,6 ± 2,1	25,9 ± 3,8	10000
Fucoidan-DAP-ácido aminocaproico	0,32 ± 0,01	35,7 ± 13,2	8,2 ± 1,0	32 ± 2,1	10000
Fucoidan-DAP-ácido tranexámico	0,61 ± 0,02	34,9 ± 11,8	7,9 ± 1,8	30,6 ± 3,4	10000
Fucoidan-DETA	1,08 ± 0,04	34,1 ± 13,3	13,8 ± 1,3	32,3 ± 1,1	10000
Fucoidan-DAP-lisina	1,11 ± 0,03	31,2 ± 7,2	14,7 ± 1,9	30,2 ± 4,4	10000
Fucoidan-DAP-dilisina	1,97 ± 0,04	53,4 ± 6,6	22,1 ± 1,9	18,6 ± 0,8	10000
Fucoidan-DAP-trilisina	2,45 ± 0,01	45,4 ± 4,1	33,9 ± 3,5	21,5 ± 0,8	10000
Fucoidan-DAP-tetralisina	2,38 ± 0,03	43,6 ± 4,6	20,7 ± 6,6	13,6 ± 0,7	10000

PS = polisacárido

20 (\*) = peso molecular medio ponderado (más o menos 10%)

**Cada uno de los análisis se repitió de tres a ocho veces.**

25 Los espectros IR de los compuestos fucoidan-DAP y fuco-DAP-dilisina/trilisina/tetralisina resaltan los espectros superponibles que corresponden a un polisacárido sulfatado, que comprende un pico de sulfato característico de 1200 cm<sup>-1</sup>. La ausencia de diferencias significativas entre el DAP aminado y el fucoidan aminado con lisina demuestra que las condiciones de acoplamiento entre oligolisinas (di-, tri- y tetra-lisinas) no alteran la estructura de dicho fucoidan. Una banda vibrante a 1540 cm<sup>-1</sup> es característica de un enlace amida (CO-NH) entre el polisacárido y las oligo-lisinas, y las propias lisinas.

Como complemento de la espectroscopia IR, los perfiles de RMN de aminofucoidanos y las correspondientes preparaciones de fucoidan confirman que las estructuras de fucoidan se conservan después de la aminación.

**30 Ejemplo 4:**

*Evaluación farmacológica in vitro de las construcciones moleculares.*

**A. Material y Métodos**

*Formación de Coágulos y Fibrinólisis Ex Vivo*

5 Plasma rico y pobre en plaquetas (PRP y PPP) se obtuvieron a partir de sangre citratada después de dos etapas de centrifugación: a 120 g durante 15 minutos, seguido de una segunda etapa de centrifugación a 1200 g durante 12 min. El PRP se ajustó a  $3 \times 10^8$  plaquetas por mL con plasma pobre en plaquetas (PPP) y se complementó con 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de isotiocianato de fluoresceína-fibrinógeno. La formación de coágulos se indujo mediante la adición de 10 mmol/L de  $\text{CaCl}_2$  en tubos de vidrio y la incubación durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Después de la retracción, los coágulos se lavaron en tampón de Hank (Sigma), se secaron rápidamente en un papel absorbente y se pesaron. Para evaluar la fibrinólisis, se incubaron coágulos de PRP o PPP en un tampón de Hanks que contenía los complejos vectorizados de t-PA (correspondientes a 10 UI de t-PA, o  $1,72 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 1 h a temperatura ambiente. Los coágulos se transfirieron a un nuevo eppendorf que contenía 500  $\mu\text{l}$  de tampón de Hank complementado con  $1 \mu\text{M}$  de plasminógeno humano. La cinética de la fibrinólisis se evaluó midiendo la liberación de fluorescencia del coágulo al sobrenadante con un espectrofluorómetro (485/520 nm). Después de 17 horas, los coágulos se volvieron a pesar para calcular la pérdida de peso correspondiente a una fibrinólisis total.

15 Los aminofucoidanos testados en este experimento se han preparado de acuerdo con la **estrategia 1** (Tranexámico, dilisina- y trilisina-fucos) y la **estrategia 2** (DETA-fuco) tal como se describe en el **ejemplo 2**.

Los aminofucoidanos se utilizaron en una relación molecular variable a t-PA (10 UI (correspondiente a  $1,72 \mu\text{g}/\text{ml}$ ): la relación de 1/10 se utilizó para mono-amina fucoidanos y de 1/5 para poli-amina fucoidanos. Los criterios de evaluación fueron la cinética de lisis inicial (aparición de fluorescencia en el sobrenadante) y la pérdida de peso final del trombo en la incubación a  $17\text{H}/37^\circ\text{C}$ .

*t-PA vectorizado con aminofucoidan*

25 El complejo de una sola cadena recombinante t-PA (American diagnostica) con aminofucoidanos se formó mezclando 1 mol de t-PA con 10 moles de aminofucoidanos en solución salina tamponada con fosfato complementada con albúmina de suero humano (HSA) al 0,1% y 0,01% de Tween 20 durante 2 horas a  $4^\circ\text{C}$  e inmediatamente utilizado para la lisis de coágulos o almacenado a  $-80^\circ\text{C}$  para un uso futuro. Se han hecho otras preparaciones mediante la adición de cantidades crecientes de aminofucoidanos, de hasta 10 moles.

El t-PA recombinante de cadena sencilla es el producto de secreción de la línea celular de ovario de hámster chino, que se había transfectado con el ADNc para t-PA humano obtenido de una línea celular de melanoma humano (Producto N° 173 de American diagnostic).

30 Características de la preparación de t-PA recombinante de cadena sencilla:  
 - el peso molecular es de aproximadamente 70 000 Dalton,  
 - la pureza es  $> 98\%$ ,  
 - la actividad específica es de aproximadamente 580 000 UI/mg.

35 Se reconstituyeron 50  $\mu\text{g}$  de este patrón de proteína liofilizada t-PA exenta de soporte con 100  $\mu\text{l}$  de agua desionizada filtrada de  $0,22 \mu\text{m}$  y se diluyeron a una solución de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en solución salina tamponada con fosfato.

Los experimentos de cinética de lisis se han llevado a cabo tal como se describe en Jones *et al.* (Jones CI, Payne DA, Hayes PD, Naylor AR, Bell PR, Thomson MM, Goodall AH. The antithrombotic effect of dextran-40 in man is due to enhanced fibrinolysis in vivo. J Vasc Surg. 2008; 48: 715-722).

40 La medición del peso del trombo se ha llevado a cabo tal como se describe en Boulaftali *et al.* (Boulaftali Y, Ho Tin Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L, Francois D, Richard B, Arocas V, Collet JP, Jandrot-Perrus M, Bouton MC. Platelet Protease Nexin-1, a Serpin that Strongly Influences Fibrinolysis and Thrombolysis. Circulation. 2011;123:1326-1334).

45 Los experimentos de tromboelastografía se han llevado a cabo en un tromboelastógrafo rotativo (Rotem®) tal como se describe en Boulaftali *et al.* (Boulaftali Y, Ho Tin Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L, Francois D, Richard B, Arocas V, Collet JP, Jandrot-Perrus M, Bouton MC. Platelet Protease Nexin-1, a Serpin that Strongly Influences Fibrinolysis and Thrombolysis. Circulation. 2011;123:1326-1334) y Mallet *et al.* (Mallet SV, Cox DJA. Thromboelastograph® Analysis. British J of anaest. 1992;69:307-313).

**B. Resultados**

En una primera etapa, dado que el fucoidan se une a P-selectina expresada en plaquetas activadas y agregadas, los autores de la invención evaluaron *in vitro* la capacidad de los diferentes aminofucoidanos de unirse a trombos ricos en plaquetas y pobres en plaquetas utilizando fibrinógeno fluorescente (75 µg de Fg-FITC/ml de plasma).

5 Primero, el t-PA solo fue más activo en la lisis inicial y final del trombo pobre en plaquetas que en el trombo rico en plaquetas, lo que demuestra las actividades antifibrinolíticas de las plaquetas. Por lo tanto, no hubo diferencias entre el t-PA solo y el t-PA vectorizado por aminofucoidan en la lisis de los trombos pobres en plaquetas, incluyendo la pérdida de peso de los trombos a las 17 H, que ya es máxima con el t-PA solo (97%). En contraposición, el t-PA vectorizado con aminofucoidan fue capaz de aumentar significativamente la lisis inicial de los trombos ricos en plaquetas en comparación con el t-PA solo (+ 50%,  $p < 0,01$ ). Entre los aminofucoidanos testados, Tranexamic-fuco, DAP-fuco y dilisina-fuco eran los más eficientes para aumentar la tasa inicial de la lisis del trombo rico en plaquetas.

En paralelo, los aminofucoidanos y el t-PA vectorizado también aumentaron la pérdida de peso del trombo rico en plaquetas en comparación con el t-PA solo, 65% frente a 30%, respectivamente ( $p < 0.01$ ) (**figura 1**). Dilisina-fucoidan fue uno de los más eficientes.

15 En una tercera serie de experimentos *in vitro*, la capacidad de los aminofucoidanos de acelerar la lisis de un trombo realizado en sangre total, incluidos los glóbulos rojos, se ha testado con tromboelastografía rotativa (Rotem®). En este experimento, el t-PA vectorizado con dilisina-fucoidin, en una relación (t-PA / fuco) de 1/5 o 1/10 aumentó la lisis del trombo a 75% en comparación con t-PA solo (55%). En este experimento, estaba presente el plasma PAI-1.

20 **Conclusión:** Estos ensayos no son capaces de evaluar la capacidad de los amino-fucoidanos de vectorizar el t-PA al trombo *in vivo*, ya que en los sistemas *in vitro*, los amino-fucoidanos fijan como objetivo solo por difusión y en ausencia de PAI-1 (excepto para experimentos de tromboelastografía). Sin embargo, estos experimentos farmacológicos *in vitro* demuestran que los amino-fucoidanos no limitan significativamente la accesibilidad de t-PA al trombo (*dos últimas columnas de la derecha*). Además, demuestran que los amino-fucoidanos como vectores para t-PA facilitan significativamente la lisis del trombo por parte de t-PA *in vitro*, y que este efecto depende de la presencia de plaquetas activadas/agregadas.

## 25 Ejemplo 5:

*Validación in vivo de la vectorización de t-PA por amino-fucoidanos: formación de imágenes intravitales en tiempo real de formación de trombos y trombolisis.*

### A. Material y Métodos

30 DiLisina-fucoidan testado en este experimento se ha preparado de acuerdo con la **estrategia 1** tal como se describe en el **ejemplo 2**.

35 El grupo ha publicado recientemente la capacidad de la microscopía intravital para seguir la lisis del trombo *in vivo*. Por lo tanto, la validación de la vectorización de t-PA por parte de amino-fucoidanos con microscopía intravital se ha llevado a cabo de acuerdo con los protocolos descritos en Boulaftali *et al.* (Boulaftali *et al.*, 2011, Platelet protease nexin-1, a serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis. *Circulation*; Boulaftali *et al.*, 2012, The mouse dorsal skinfold chamber as a model for the study of thrombolysis by intravital microscopy. *Thromb Haemost*).

El trombo es inducido por la aplicación local de óxido de hierro en recipientes expuestos en ratones. t-PA fluorescente o una mezcla de amino-fucoidanos y t-PA se inyectan por vía intravenosa tras la aplicación local de óxido de hierro. La fluorescencia de t-PA y la lisis del trombo se siguieron mediante transiluminación intravital del tejido mesentérico.

40 Más precisamente, después de la anestesia (100 mg/kg de ketamina, 10 mg/kg de xilazina) y laparotomía, se expusieron vasos mesentéricos de ratón para la inducción de trombosis y la observación intravital video-microscópica. La lesión vascular se indujo colocando una tira de papel de filtro (1 x 0,5 mm) saturada con FeCl<sub>3</sub> al 10% (Sigma, St. Louis, MO) durante 2,30 min. El papel de filtro se retiró después y la zona expuesta se enjuagó con solución salina, y la formación de trombos después de la lesión se examinó en tiempo real mediante la vigilancia de la acumulación de plaquetas y leucocitos marcados con rodamina 6G (3 mg de rodamina 6G/kg ratón, Sigma, St. Louis, MO) y de Alexa 647 conjugado de fibrinógeno humano (10 mg/kg de ratón, Invitrogen Life Technologies, Paisley, Reino Unido) utilizando un microscopio de fluorescencia (Axio Observer, Carl Zeiss Microimaging) con un objetivo 5x conectado a una cámara CCD (Hamamatsu). Todos los marcadores fluorescentes se administraron por vía intravenosa en el seno retro-orbitario antes de la inducción de la lesión vascular. La deposición de plaquetas y el crecimiento del trombo se vigilaron durante 15 minutos después de la lesión y luego se inyectó por vía intravenosa t-PA ± DiLisina-fucoidan para la trombolisis de los trombos formados parcialmente oclusivos. La evolución del trombo se examinó en tiempo real durante al menos 1 hora después del tratamiento.

**B. Resultados**

1 hora después de la lesión inducida por FeCl3 (~ 45 min después del tratamiento), se produjo una trombosis oclusiva de vasos lesionados en los 3 ratones tratados con t-PA fluorescente solo. En contraposición, la perfusión del vaso se mantuvo en todos los ratones tratados con t-PA combinada con DiLisina-fucoidan. Además, en estos ratones, se observó una reducción en el tamaño del trombo después del tratamiento (Figura 2).

**Conclusión:** Los experimentos *in vivo* demuestran el efecto beneficioso de los amino-fucoidanos como vectores en la lisis de trombos. En particular, estos experimentos demuestran que los amino-fucoidanos potencian la actividad trombolítica in vivo de t-PA inyectado periféricamente.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 10 <110> Institut national de la santé et de la recherche médicale
- <120> como un vector para la fibrinólisis en enfermedades trombóticas
- <130> PR99833
- <160> 1
- <170> BiSSAP 1.0
- 15 <210> 1
- < 211> 562
- < 212> PRT
- < 213> Homo sapiens
- 20 <220>
- < 221> FUENTE
- < 222> 1..562
- < 223> /mol\_type="protein" /organism="Homo sapiens"

ES 2 691 872 T3

<400> 1

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg  
 20 25 30  
 Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn  
 50 55 60  
 Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser  
 65 70 75 80  
 Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr  
 85 90 95  
 Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu  
 100 105 110  
 Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr  
 115 120 125  
 Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser  
 130 135 140  
 Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His  
 165 170 175  
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val  
 180 185 190  
 Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys  
 195 200 205  
 Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg  
 210 215 220  
 Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn  
 225 230 235 240  
 Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala  
 245 250 255  
 Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly  
 260 265 270  
 Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp  
 275 280 285  
 Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr  
 290 295 300  
 Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala

ES 2 691 872 T3

305					310					315					320
Ser	His	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Ile	Phe	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Ser	Pro
				325					330					335	
Gly	Glu	Arg	Phe	Leu	Cys	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Cys	Trp	Ile
			340					345					350		
Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Gln	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	His	His	Leu
		355					360					365			
Thr	Val	Ile	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu
	370					375						380			
Gln	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His	Lys	Glu	Phe	Asp	Asp
385					390					395					400
Asp	Thr	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser
				405					410					415	
Ser	Arg	Cys	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg	Thr	Val	Cys	Leu	Pro
			420					425					430		
Pro	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	Ser	Gly
		435					440					445			
Tyr	Gly	Lys	His	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Glu	Arg	Leu	Lys
	450					455						460			
Glu	Ala	His	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg	Cys	Thr	Ser	Gln	His
465					470					475					480
Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Asp	Thr
				485					490					495	
Arg	Ser	Gly	Gly	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	His	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp
			500				505						510		
Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Leu	Asn	Asp	Gly	Arg	Met	Thr	Leu	Val
		515					520					525			
Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	Gln	Lys	Asp	Val	Pro	Gly
	530					535					540				
Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Ile	Arg	Asp	Asn	Met
545					550					555					560
Arg	Pro														

REIVINDICACIONES

1. Un vector que tiene propiedad de unión a t-PA que consiste en un resto fucoidan, que está aminado por un enlace covalente entre el extremo reductor de dicho resto fucoidan y un grupo químico que comprende uno o más grupos amino.

5 2. El vector de acuerdo con la reivindicación precedente, en donde dicho vector es un compuesto de fórmula (I):



en donde

- "FUCO" significa un resto fucoidan, que opcionalmente contiene uno o más grupos amina primaria enlazados covalentemente a la cadena de fucoidan,

10 - x, y y z son números enteros independientes que significan 0 o 1,

- C1 es el átomo de carbono en la posición 1 de la unidad de sacárido ubicada en el extremo reductor del resto fucoidan,

- L es un enlazador, y

- R1 es un grupo químico que comprende uno o más grupos amino, o que consiste en un grupo amino,

15 - L y R1 son independientes y pueden ser iguales o diferentes.

3. El vector de acuerdo con la reivindicación precedente, en donde dicho vector es un compuesto de fórmula (I), en donde:

- R1 es un grupo químico que comprende o consiste en una cadena hidrocarbonada terminada en amina primaria, lineal o ramificada; un aminoácido; un poliaminoácido; y/o un grupo químico seleccionado en la lista que comprende, o que consiste en: lisina, polilisina, arginina, poliarginina, ornitina, poliornitina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, poliaminas, polieteraminas, o cualquier otro grupo químico que comprenda un grupo guanidina o una amina primaria,

en donde:

- dicho grupo químico está interrumpido opcionalmente por uno o más anillos de hidrocarburos no aromáticos que tienen 5 o 6 átomos de carbono,

25 - dicho grupo químico está interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos,

- dicho grupo químico contiene opcionalmente uno o más grupos amida y/o uno o más grupos éster,

- dicho grupo químico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos amina,

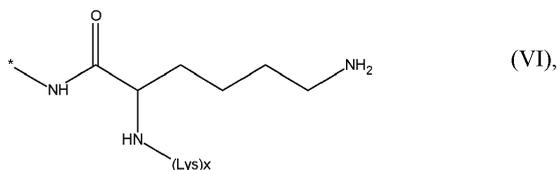
- dicho grupo químico está opcionalmente interrumpido y/o sustituido con uno o más grupos, idénticos o diferentes, y seleccionados de: (a) una cadena de hidrocarburos lineal o ramificada, (b) un aminoácido o un poliaminoácido, (c) una poliamina o una polieteramina, (d) un ácido  $\gamma$ -aminobutírico, (e) un grupo guanidina y (f) una amina primaria.

30

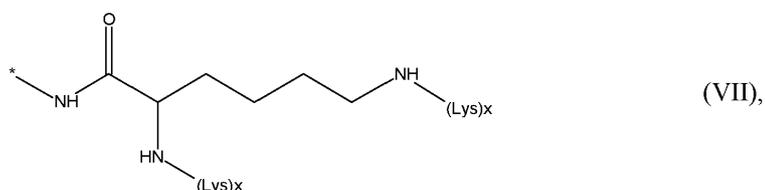
4. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho fucoidan comprende, además, grupos que contienen amina primaria, enlazados covalentemente a la cadena de fucoidan.

5. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde R1 o L está sustituido con 1 a 4 grupos amina.

35 6. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde  $\text{-[NH]}_x\text{-R1}$  puede ser de fórmula (VI) o (VII):



o

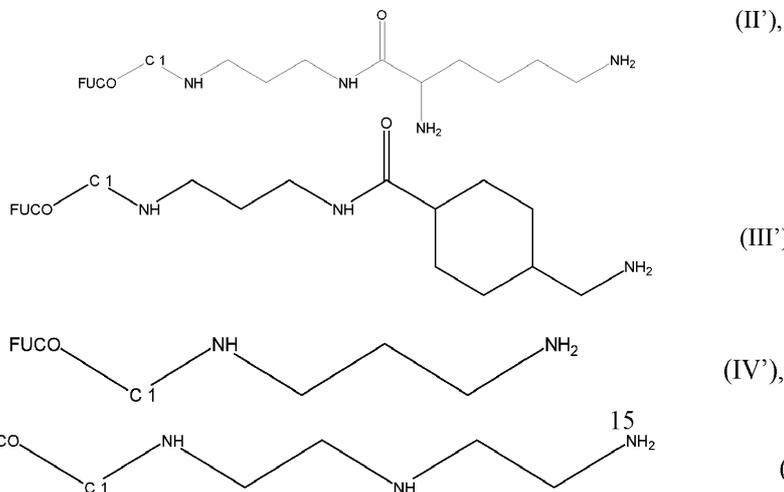


40 en donde

- «Lys» es una lisina o un derivado de lisina,

- x es al menos igual o superior a 1, preferiblemente igual a 2, 3, 4, 5 o 6 y lo más preferiblemente igual a 2 o 4.

7. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se selecciona del grupo que consiste en:



5

10

8. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el resto fucoidan tiene un peso molecular medio que es menor que 100 000 Da.

9. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el resto fucoidan está polisulfatado.

10. Un t-PA vectorizado que comprende complejos de un vector según se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes con t-PA.

15

11. El t-PA vectorizado de acuerdo con la reivindicación 10, que tiene una relación molar de vector a t-PA que oscila entre 40:1 y 1:1; preferiblemente entre 20:1 y 3:1, y lo más preferiblemente entre 15:1 y 5:1.

12. El t-PA vectorizado según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, para uso como un medicamento.

20

13. El t-PA vectorizado según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, para uso como un ingrediente activo para prevenir o tratar un trombo en un sujeto.

14. Un método para preparar un t-PA vectorizado, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un vector según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,

b) proporcionar t-PA, y

c) poner en contacto el vector proporcionado en la etapa a) con el t-PA proporcionado en la etapa b), con el fin de obtener complejos entre dicho vector y t-PA.

25

15. Un kit. que comprende:

- un primer recipiente que comprende un vector según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y

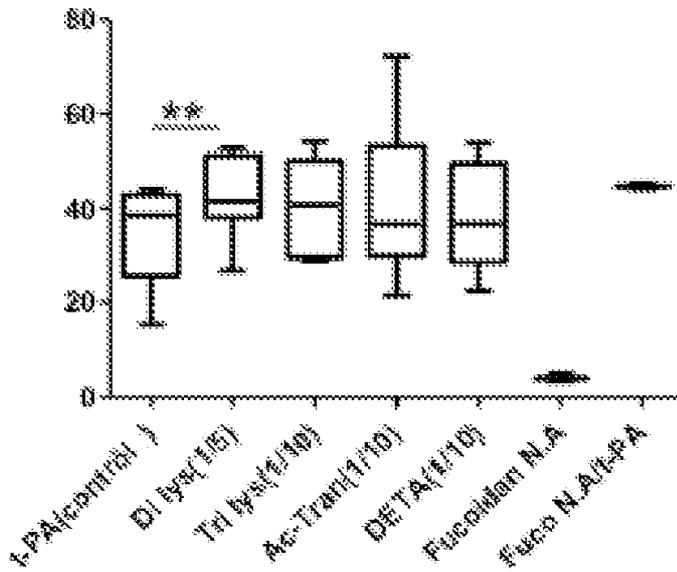
- un segundo recipiente que comprende t-PA.

30

16. Un recipiente que comprende un vector según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y t-PA, en donde dicho vector y dicho t-PA están en una forma anhidra.

17. Una composición farmacéutica que comprende complejos de un vector según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 con t-PA.

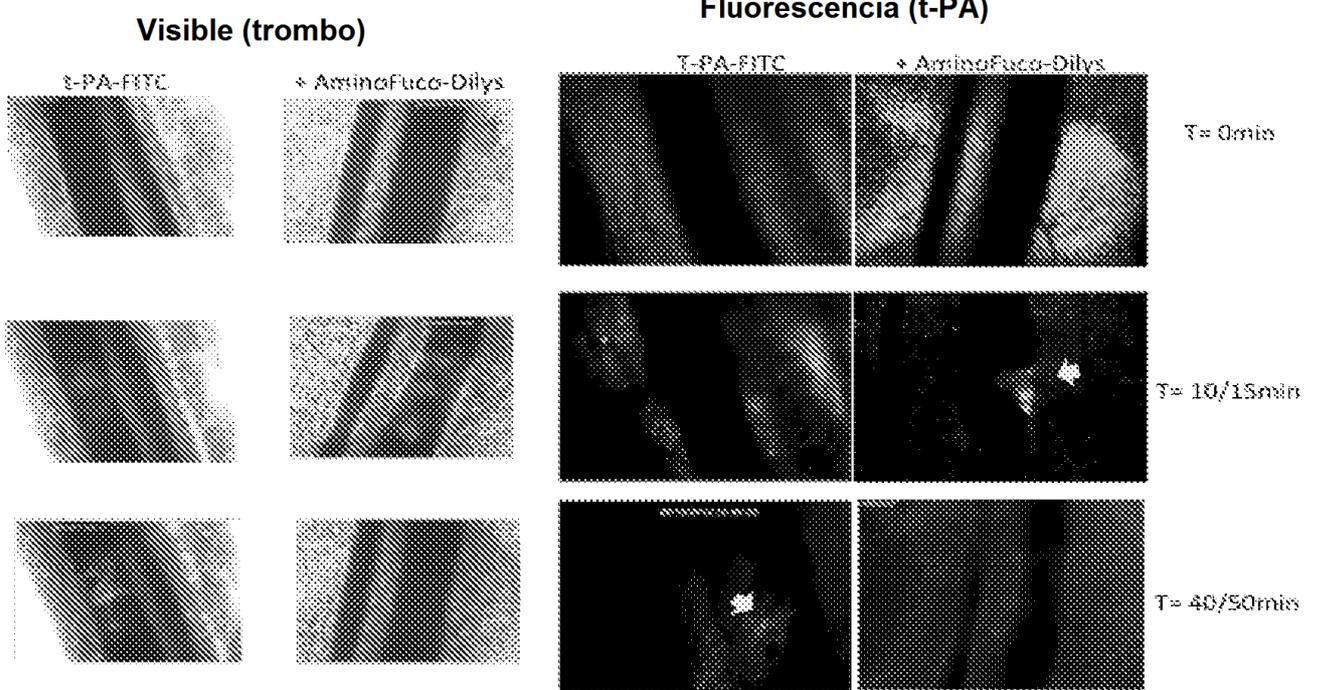
18. Una composición farmacéutica para la administración parenteral, que comprende un vector según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.



Porcentaje de lisis de trombos ricos en plaquetas

**Figura 1**

Lisis de un trombo mesentérico



**Figura 2**