



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 320**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**C08B 37/08** (2006.01)

**C08B 37/10** (2006.01)

**A61K 31/726** (2006.01)

**A61K 31/727** (2006.01)

**A61K 31/737** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03732805 .1**

96 Fecha de presentación : **17.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1513880**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54

Título: **Derivados epimerizados de polisacárido K5 con un grado de sulfatación muy alto.**

30

Prioridad: **18.06.2002 IT MI02A1345**  
**18.06.2002 IT MI02A1346**  
**27.08.2002 IT MI02A1854**

73

Titular/es: **GLYCORES 2000 S.R.L.**  
**Via Mac Mahon, 43**  
**20155 Milano, IT**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.04.2011**

72

Inventor/es: **Zoppetti, Giorgio y**  
**Oreste, Pasqua Anna**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.04.2011**

74

Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 357 320 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

## OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos derivados de polisacárido K5 con un grado de sulfatación muy alto, a un procedimiento para su preparación, a nuevos productos intermedios altamente O-sulfatados útiles en su síntesis y a composiciones farmacéuticas que contienen dichos derivados de polisacárido K5 como principios activos básicamente libres de actividad en la coagulación.

En particular, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de epiK5-N,O-sobresulfatos partiendo de un polisacárido K5, previamente N-desacetilado, N-sulfatado y epimerizado en C5 al menos el 20%, mediante la O-sobresulfatación en condiciones adecuadas y posterior N-sulfatación, a dichos epiK5-N,O-sobresulfatos de actividad antiangiogénica y antiviral y a nuevos productos intermedios de epiK5-N-sulfatos de bajo peso molecular.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los glicosaminoglicanos tales como heparina, sulfato de heparano, sulfato de dermatano, sulfato de condroitina y ácido hialurónico son biopolímeros que se extraen industrialmente de diversos órganos animales.

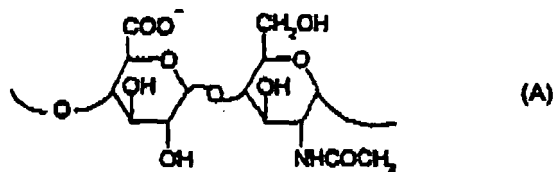
En particular, la heparina, principalmente obtenida mediante la extracción de la membrana mucosa intestinal de cerdos o pulmón de bovino, es un copolímero polidisperso con una distribución de peso molecular de desde aproximadamente 3.000 hasta aproximadamente 30.000 D que consiste en una mezcla de cadenas que consisten básicamente en un ácido urónico (ácido glucurónico o ácido idurónico) y en un aminoazúcar (glucosamina) unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 o  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4. En la heparina, la unidad urónica puede estar O-sulfatada en la posición 2 y la unidad de glucosamina está N-acetilada o N-sulfatada, 6-O-sulfatada y 3-O-sulfatada en aproximadamente el 0,5% de las unidades de glucosamina presentes.

Las propiedades y la biosíntesis natural de la heparina en mamíferos se han descrito por Lindahl *et al.*, 1986 en Lone. D. y Lindahl, U. (Editores) "Heparin. Chemical and Biological Properties; Clinical Applications", Edward Arnold. Londres, páginas 159-190, por Lindahl, U. Feingold D. S. y Rodén L. 1986 TIBS. 11, 221-225 y por Conrad H. E. "Heparin Binding Proteins", Chapter 2: Structure of Heparinoids. Academic Press, 1998. La biosíntesis de heparina se produce partiendo de su precursor N-acetil-heparosano que consiste en una mezcla de cadenas que consisten en la unidad de repetición de disacárido glucuronil- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina. Dicho precursor experimenta modificaciones enzimáticas que hidrolizan parcialmente el grupo N-acetilo, sustituyéndolo con un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, epimeriza el carboxilo en la posición 5 de una parte de las unidades glucurónicas convirtiéndolas en unidades idurónicas e introduciendo grupos O-sulfato para obtener un producto que, una vez extraído industrialmente, tiene aproximadamente el doble del número de grupos sulfato con respecto a los carboxilo por unidad de disacárido. Estas modificaciones enzimáticas conducen, además, a la formación de la región de pentasacárido de un enlace a antitrombina III (ATIII), denominado pentasacárido activo, que es la estructura necesaria para el enlace de alta afinidad de la heparina a la ATIII y fundamental para la actividad anticoagulante y antitrombótica de la propia heparina. Este pentasacárido, presente dentro de sólo algunas de las cadenas que forman la heparina, contiene una unidad glucosamina sulfatada en la posición 3 y un ácido glucurónico espaciado entre disacáridos que contienen ácidos idurónicos.

En la naturaleza, la formación del pentasacárido activo se hace posible mediante la reacción de epimerización del carboxilo de una parte de las unidades glucurónicas dentro de las unidades idurónicas llevada a cabo por la glucuronil-C5-epimerasa (epimerización en C5) y mediante la adecuada sulfatación que también conduce a la introducción de un grupo sulfato en el hidroxilo en la posición 3 de la glucosamina. Más particularmente, en la naturaleza la formación del pentasacárido activo se hace posible por el hecho de que la epimerización en C5 se produce en conglomerados, es decir en partes de cadenas, y de manera extensiva, lo que da como resultado un producto que contiene más unidades idurónicas que glucurónicas. La heparina comercial, en realidad, contiene aproximadamente un 70% de unidades idurónicas y un 30% de unidades glucurónicas. Junto a las principales actividades anticoagulantes y antitrombóticas, la heparina también ejerce actividades antilipémicas, antiproliferativas, antivirales, antitumorales y antimetastásicas, pero su uso como un fármaco se ve obstaculizado por los efectos secundarios debido a la acción anticoagulante que puede provocar hemorragia.

## TÉCNICA ANTERIOR

Se conoce que el polisacárido K5 capsular aislado de *Escherichia coli*, descrito por Vann W. F. *et al.*, en European Journal of Biochemistry, 1981, 116, 359-364 ("Vann 1981"), consiste en una mezcla de cadenas que consisten en la unidad de repetición de disacárido glucuronil- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-N-acetil glucosamina y por tanto muestra la misma secuencia de repetición (A)



del precursor N-acetil-heparosano de la heparina. El polisacárido K5 capsular, denominado en lo sucesivo en el presente documento "polisacárido K5" o más simplemente "K5", se modificó químicamente por Lormeau *et al.* tal como se describe en el documento EP 5.550.116 y por Casu *et al.*, tal como se describe en Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284. Se describen K5-O-sulfatos que tienen actividades antitumorales, antimetastásicas, antivirales, en particular anti-VIH en los documentos EP 333243 y WO 98/34958. También se modificó el K5 química y enzimáticamente con el fin de obtener productos que tuvieran el mismo tipo de actividad biológica *in vitro* en la coagulación como el de heparina tal como se extrae de órganos animales (heparina extractiva).

La obtención de los productos que tienen una actividad en la coagulación del mismo tipo como el de a heparina extractiva se produce mediante procedimientos que imitan lo que ocurre en la naturaleza y prevén la etapa clave completa de epimerización en C5 con D-glucuronil-C5-epimerasa.

Los procedimientos descritos en los documentos IT 1230785, WO 92/17507, WO 96/14425 y WO 97/43317 utilizan K5 como material de partida. El K5 originado de la fermentación se somete a N-desacetilación seguido por N-sulfatación y sobre el K5-N-sulfato así obtenido se realiza la epimerización en C5 con C5-epimerasa en disolución, obtenida o bien mediante cromatografía de una disolución de enzimas microsómicas de mastocitoma de ratón (documento IT 1230 785) o bien de hígado bovino (documentos WO 92/17507, WO 96/14425 y WO 97/43317).

La D-glucuronil-C5-epimerasa de hígado bovino se purificó por Campbell, P. *et al.* en J. Biol. Chem., 1994, 269/43, 26953-26958 ("Campbell 1994") quien también suministró su composición en aminoácidos y describió su uso en disolución para la transformación de un K5-N-sulfato en el correspondiente producto epimerizado el 30%, demostrando la formación de ácido idurónico mediante el método de HPLC seguido por la despolimerización nitrosa total para dar disacárido.

El documento WO 98/48006 describe la secuencia de ADN que codifica para la D-glucuronil-C5-epimerasa y una D-glucuronil-C5-epimerasa recombinante, obtenida a partir de un vector de expresión recombinante que contiene dicho ADN, purificado después por Campbell *et al.* tal como se muestra por Jin-Ping L. *et al.* en J. Biol Chem. 2001, 276, 20069-20077 ("Jin-Ping 2001").

La secuencia de la C5-epimerasa completa se describió por Crawford B. E. *et al.* en J. Biol. Chem., 2001, 276 (24), 21538-21543 (Crawford 2001).

El documento WO 01/72848 describe un método para la preparación de derivados N-desacetilados N-sulfatados de polisacárido K5, al menos epimerizado el 40% de ácido idurónico en cuanto al total de los ácidos urónicos, que tienen un peso molecular de desde 2.000 hasta 30.000, que contienen desde el 25 hasta el 50% de cadenas de alta afinidad para la ATIII y que tienen una actividad anticoagulante y antitrombótica expresada como una razón HCII/antiXa de desde 1,5 hasta 4. Dicho documento describe la sobresulfatación de un K5-N-sulfato, epimerizado el 40-60% y muestra que el producto obtenido, cuyo <sup>13</sup>C-RMN se ilustra, tiene un contenido en grupo sulfato por unidad de disacárido de 2-3,5. Repitiendo la sobresulfatación mencionada anteriormente en las condiciones descritas y examinando el <sup>13</sup>C-RMN se determinó que el producto obtenido es en realidad una amina libre cuyo contenido en 6-O-sulfato es del 80-95%, el de 3-O-sulfato en el aminoazúcar es del 30%, pero cuyo grado de sulfatación es de 3,2. También se observó que en las condiciones de sobresulfatación descritas en el documento WO 01/72848 no se obtenía un grado de sulfatación superior a 3,2. El documento US 2002/0062019 describe un procedimiento para la preparación de epiK5-N,O-sulfatos, activos en el control de la coagulación, que tienen un grado de sulfatación de desde 2,3 hasta 2,9 y un peso molecular de desde 2.000 hasta 30.000, o desde 4.000 hasta 8.000, o desde 18.000 hasta 30.000. El procedimiento mencionado anteriormente implica las etapas: (p-a) una N-desacetilación de polisacárido K5 y una N-sulfatación de la K5-amina resultante, (p-b) una epimerización de K5-N-sulfato, (p-c) una O-sobresulfatación de epiK5-N-sulfato, (p-d) una O-desulfatación parcial, (p-e) una 6-O-sulfatación selectiva, (p-f) una N-sulfatación del producto así obtenido, pudiendo someterse cualquier producto obtenido al término de una de las etapas (p-b)-(p-f) a despolimerización. Dicho documento describe un epiK5-N,O-sulfato que tiene un peso molecular de 7.400, obtenido mediante las etapas mencionadas anteriormente (p-a)-(p-f) seguido por una despolimerización nitrosa al final de la etapa (p-f), con un grado de sulfatación de desde 2,3 hasta 2,9.

El mismo documento también describe un resto de K5 con un peso molecular de aproximadamente 5.000 que también puede someterse a las etapas (p-a) - (p-f).

Con el fin de normalizar la terminología y hacer el texto más comprensible, se usarán expresiones o términos convencionales en la presente descripción, en singular o plural. En particular:

- 5 - por "K5" o "polisacárido K5" se entiende el polisacárido capsular de *Escherichia coli* obtenido mediante la fermentación, es decir una mezcla de cadenas que consisten en unidades de disacárido (A) que contienen opcionalmente un doble enlace en el extremo no reductor tal como se mostró anteriormente, en cualquier caso preparado y purificado según los métodos descritos en la bibliografía, en particular según Vann 1981, según Manzoni M. *et al.*, Journal of Bioactive Compatible Polymers, 1996, 11, 301-311 ("Manzoni 1996") o según el método descrito en el documento WO 01/72848 y en el documento WO 02/068447; es obvio para un experto en la técnica que lo que se muestra más adelante en el presente documento puede aplicarse a cualquier N-acetil-heparosano;
- 10 - por "C5-epimerasa" se entiende la D-glucuronil-C5-epimerasa, extractiva o recombinante, en cualquier caso preparada, aislada y purificada, en particular tal como se describe en Campbell 1994, en el documento WO 98/48006, en Jin-Ping L. *et al.* en J. Biol Chem. 2001, 276, 20069-20077 (Jin-Ping 2001) o en Crawford 2001;
- por K5-amina se entiende el K5 N-desacetilado al menos al 95% pero en el que los grupos N-acetilo son indetectables con un aparato de RMN normal;
- 15 - por "K5-N-sulfato" se entiende el K5 N-desacetilado y N-sulfatado al menos al 95%, normalmente al 100%, dado que los grupos N-acetilo son indetectables con un aparato de RMN normal, tal como se describe más adelante en el presente documento;
- por "epiK5" se entiende el K5 y sus derivados en los que el 20-60% de las unidades glucurónicas están epimerizadas en C5 para dar unidades idurónicas
- 20 - por "epiK5-N-sulfato" se entiende el K5-N-sulfato en el que el 20-60% de las unidades glucurónicas están epimerizadas en C5 para dar unidades idurónicas;
- por "epiK5-amina-O-sobresulfato" se entiende un epiK5-amina-O-sulfato con un grado de sulfatación de al menos 3,4;
- 25 - por "epiK5-N,O-sobresulfato" se entiende un epiK5-amina-O-sulfato completamente N-sulfatado con un grado de sulfatación de al menos 4;

Además:

- 30 - los términos y expresiones convencionales definidos anteriormente en el presente documento se refieren a un K5 aislado tras la fermentación, generalmente con una distribución de peso molecular de desde aproximadamente 1.500 hasta aproximadamente 50.000 con un peso molecular medio de 10.000-25.000, ventajosamente de 15.000-25.000;
- los términos y expresiones convencionales definidos anteriormente en el presente documento, cuando vayan precedidos por el acrónimo "LMW" (bajo peso molecular), por ejemplo LMW-K5-N-sulfato, LMW-epiK5-N-sulfato, indican productos de bajo peso molecular, obtenidos mediante el fraccionamiento o mediante la despolimerización de K5-N-sulfato y que consisten en o derivados de K5-N-sulfatos que tienen un peso molecular medio de desde aproximadamente 1.500 hasta aproximadamente 12.000, calculado sobre un producto N-sulfatado al 100%;
- 35 - los términos y expresiones convencionales definidos anteriormente en el presente documento, cuando vayan precedidos por "derivado de" indican en su conjunto tanto los derivados de K5 nativo como aquellos de bajo peso molecular;
- 40 - por la expresión "especie preponderante" se entiende el compuesto que, en la mezcla que constituye el LMW-epiK5-N-sulfato, el LMW-epiK5-amina-O-sobresulfato o el LMW-epiK5-N,O-sobresulfato, es del tipo más representativo, determinado mediante el pico de la curva del peso molecular medido mediante HPLC;
- a menos que se indique específicamente lo contrario, por "grado de sulfatación" se entiende la razón  $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$ , que puede expresarse también como el número de grupos sulfato por unidad de disacárido, medidos con el método conductométrico descrito por Casu B. *et al.* en Carbohydrate Research, 1975, 39, 168-176 (Casu 1975), el mismo utilizado en el documento WO 01/72848;
- 45 - por "condiciones de O-sobresulfatación" se entiende una O-sulfatación extrema realizada, por ejemplo, según el método C descrito por B. Casu *et al.* en Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284 (Casu 1994);
- 50 - por el término "alquilo" se entiende un alquilo lineal o ramificado, mientras que "tetrabutilamonio" indica el grupo tetra-n-butilamonio.

## SUMARIO DE LA INVENCION

- Ahora se ha encontrado sorprendentemente que, a diferencia de lo que ocurre con los procedimientos descritos en los documentos IT 1230785, WO 92/17507, WO 96/14425, WO 97/43317, WO 01/72848 y US 2002/0062019, partiendo de un epiK5-N-sulfato es posible obtener un epiK5-amina-O-sobresulfato con un mayor grado de sulfatación que todos los demás epiK5-amina-O-sulfatos descritos en la bibliografía, por ejemplo en el documento WO 01/72848, preparando la sal con una base orgánica terciaria o cuaternaria de dicho epiK5-N-sulfato teniendo cuidado de dejar reposar la mezcla de reacción durante un periodo de tiempo de 30-60 minutos manteniendo el pH a aproximadamente 7 con la misma base orgánica y después tratando la sal obtenida con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobresulfatación.
- 5 Sometiendo los epiK5-amina-O-sobresulfatos así obtenidos a N-sulfatación, se obtienen nuevos epiK5-N,O-sobresulfatos que, a diferencia de los productos descritos en los documentos IT 1230785, WO 92/17507, WO 96/14425, WO 97/43317, WO 01/72848 y US 2002/0062019, están libres de actividad en la coagulación y son útiles para la preparación de medicamentos, particularmente composiciones farmacéuticas de actividad antiangiogénica y antiviral o de composiciones cosméticas.
- 10 Mediante la despolimerización con ácido nitroso de dichos epiK5-N,O-sobresulfatos se obtienen nuevos LMW-epiK5-N,O-sobresulfatos, libres de actividad en la coagulación y con actividad antiangiogénica y antiviral.
- En la preparación de derivados de N,O-sulfato N-desacetilados de polisacárido K5, epimerizados al menos el 40% de ácido idurónico en cuanto al total de los ácidos urónicos y que tienen bajo peso molecular según el método descrito en el documento WO 01/72848, se determinó que la despolimerización del producto de alto peso molecular obtenido al final de la etapa de N-sulfatación final del procedimiento puede proporcionar resultados variables dado que produce generalmente algunos productos despolimerizados que muestran actividad mucho más baja, que la de los productos de alto peso molecular a partir de los que se producen, en todos los parámetros de coagulación. Se supone que esto tiene lugar porque la degradación con ácido nitroso está influida por la presencia de los grupos sulfato. En particular los sulfatos en la posición 3 de la glucosamina dan como resultado productos heterogéneos, tal como se describe por Nagasawa *et al.* en *Thrombosis Research*, 1992, 65, 463-467 (Nagasawa 1992).
- 20 Actualmente se han encontrado que sometiendo un epiK5-N-sulfato a una despolimerización nitrosa en la que el contenido en ácido idurónico en cuanto al total de ácidos urónicos es del 20-60%, ventajosamente del 40-60%, preferiblemente alrededor del 50%, se obtienen LMW-epiK5-N-sulfatos que constituyen nuevos productos intermedios eficaces para la preparación de LMW-epiK5-N,O-sobresulfatos que tienen un grado de actividad alto en diferentes parámetros biológicos, con o sin actividad en parámetros de coagulación. En particular, se encontró que es posible despolimerizar un epiK5-N-sulfato de manera que se obtienen nuevos LMW-epiK5-N-sulfatos de peso molecular medio de desde aproximadamente 2.000 hasta aproximadamente 4.000, más particularmente LMW-epiK5-N-sulfatos específicos que consisten en mezclas en las que el compuesto predominante es un decaacárido o un dodecaacárido o un tetradecaacárido. Además, estos LMW-epiK5-N-sulfatos, que no pueden obtenerse de otro modo, tienen interesantes propiedades biológicas y son productos intermedios útiles para la preparación de LMW-epiK5-N,O-sobresulfato de actividad antiviral y/o antiangiogénica y sorprendentemente libres de actividad en la coagulación.
- 25 Sometiendo un LMW-epiK5-N-sulfato al método de salificación mencionado anteriormente con una base orgánica terciaria o cuaternaria, teniendo cuidado de dejar reposar la mezcla de reacción durante un periodo de tiempo de 30-60 minutos manteniendo el pH a aproximadamente 7 con la misma base orgánica y después tratando la sal obtenida con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobresulfatación, se obtienen nuevos LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos. Sometiendo el LMW-epiK5-amina-O-sobresulfato a N-sulfatación, se obtienen nuevos derivados N-sulfatados y O-sobresulfatos (LMW-epiK5-N,O-sobresulfatos), sorprendentemente libres de actividad en la coagulación y de actividad antiviral y/o antiangiogénica, útiles para la preparación de composiciones farmacéuticas o cosméticas. Estos LMW-epiK5-N-sulfatos se obtienen partiendo de un K5-N-sulfato con una reacción de epimerización con una C5-epimerasa aislada y purificada, inmovilizada sobre un soporte sólido, a una temperatura de aproximadamente 30°C y a un pH de aproximadamente 7 durante 12-24 horas en presencia de un catión bivalente seleccionado entre calcio, magnesio, bario y manganeso y una reacción de despolimerización nitrosa posterior del producto epimerizado así obtenido, o viceversa.
- 30 Sorprendentemente, a partir de las observaciones realizadas en el transcurso de la reacción de epimerización en las condiciones mencionadas anteriormente, es posible asumir que, al contrario de lo que ocurre en la naturaleza en la biosíntesis de heparina, la epimerización en C5 de tipo ordinario y no "en conglomerados" del sustrato se produce cada 2 unidades de ácido glucurónico lo que conduce a derivados de epiK5-N-sulfato caracterizados por una unidad de repetición de tetrasacárido que consiste en dos unidades de glucosamina separadas mediante una unidad glucurónica y seguida por una unidad idurónica o viceversa.
- 35
- 50
- 55

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

Por tanto, según uno de sus aspectos, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de derivados de epiK5-N,O-sobresulfato que tienen un grado de sulfatación de desde 4 hasta 4,6 caracterizado porque

5 (a) un derivado de K5-N-sulfato que tiene un peso molecular de desde 1000 hasta 25.000 en forma ácida, se trata con una base orgánica terciaria o cuaternaria, dejando que la mezcla de reacción repose durante un periodo de tiempo de 30-60 minutos, manteniendo el pH de la disolución a un valor de 7 mediante la adición de la misma base orgánica terciaria o cuaternaria, y su sal se aísla con dicha base orgánica;

(b) dicha sal de base orgánica de dicho derivado de epiK5-N-sulfato se trata con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobresulfatación;

10 (c) el derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato que tiene un grado de sulfatación de desde 3,55 hasta 3,8 así obtenido se somete a N-sulfatación mediante un método conocido y se aísla el derivado de epiK5-N,O-sobresulfato.

Generalmente, el derivado de epiK5-N,O-sobresulfato se aísla en forma de sal de sodio y dicha sal de sodio se transforma opcionalmente en otra sal química o farmacéuticamente aceptable.

15 En este contexto, el término "químicamente aceptable" se refiere a un catión que puede usarse en síntesis química, tal como el ión sodio, amonio, tetraalquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, o para la purificación del producto, mientras que "farmacéuticamente aceptable" se explica por sí mismo. Los cationes ventajosos son aquellos derivados de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio, tetraalquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, aluminio y zinc. Los cationes preferidos son los iones sodio, calcio y tetrabutilamonio.

20 Según una manera ventajosa del procedimiento, la etapa (a) se lleva a cabo haciendo pasar una disolución de la sal de sodio del derivado de epiK5-N-sulfato, es decir de polisacárido K5, previamente N-desacetilado, N-sulfatado, normalmente al 100%, y epimerizado en C5 el 20-60% y opcionalmente despolimerizado con ácido nitroso, que tiene un peso molecular medio de desde 1.000 hasta 25.000, ventajosamente desde 1.500 hasta 25.000, a través de una resina ácida de intercambio iónico, por ejemplo del tipo IR-120 H<sup>+</sup>, que recoge el eluato incluyendo también el agua de lavado de la resina y neutralizando el eluato con una base orgánica terciaria o cuaternaria, preferiblemente con una disolución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio. Se deja reposar la disolución durante 1 hora, manteniendo su pH a 7 mediante la adición de la misma base y la sal así obtenida se aísla mediante liofilización.

25 En la etapa (b), la O-sobresulfatación se produce usando un exceso de agente de O-sulfatación y trabajando a una temperatura de desde 20 hasta 70°C durante un periodo de tiempo de hasta 24 horas en un disolvente polar aprótico.

30 Ventajosamente, la sal con una base orgánica terciaria o cuaternaria del derivado de epiK5-N-sulfato, es decir de polisacárido K5, previamente N-desacetilado, N-sulfatado preferiblemente al 100%, y epimerizado en C5 el 20-60% y opcionalmente despolimerizado con ácido nitroso, que tiene un peso molecular medio de desde 1.000 hasta 25.000, ventajosamente desde 1.500 hasta 25.000 tal como se aísla en la etapa (a), se disuelve en dimetilformamida y se trata con 2-10 moles de un reactivo de O-sulfatación por cada hidroxilo libre a una temperatura de 40-60°C durante 10-20 horas. Como reactivo de O-sulfatación se usa ventajosamente el aducto de piridina.SO<sub>3</sub> en una cantidad de 2,5 - 5 moles, preferiblemente de 25 - 4 moles por hidroxilo libre por disacárido y la reacción se lleva a cabo ventajosamente a 50-60°C, preferiblemente a 55°C, durante la noche. El producto obtenido al término de la reacción se aísla mediante la adición de 0,1-1 volumen de agua y neutralización, preferiblemente con hidróxido de sodio, precipitación con una disolución saturada de cloruro de sodio en acetona, filtración y posible ultrafiltración.

35 El producto así obtenido es generalmente la sal de sodio de un derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato que tiene un contenido en ácido idurónico del 20-60% del total de los ácidos urónicos, que tiene un peso molecular medio de desde 3.500 hasta 40.000, ventajosamente desde 4.500 hasta 40.000 y un grado de sulfatación de desde 3,55 hasta 3,8. La sal de sodio así obtenida puede convertirse en otra sal. A modo de ejemplo un intercambio con el ión calcio puede realizarse trabajando con membranas de ultrafiltración.

40 En la etapa (c), el derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato con un grado de sulfatación muy alto se somete a N-sulfatación usando los métodos de N-sulfatación conocidos en la bibliografía.

45 En la práctica, la N-sulfatación se realiza tratando una disolución acuosa que contiene el derivado de epiK5-amino-O-sobresulfato que se origina a partir de la etapa (b) con carbonato de sodio y un agente de N-sulfatación, por ejemplo un aducto de trialquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amina.SO<sub>4</sub> o piridina.SO<sub>3</sub>, manteniendo la mezcla a 30-50°C durante 8-24 horas y aislando el derivado de epiK5-N,O-sobresulfato deseado, por ejemplo mediante diafiltración. Opcionalmente la etapa de N-sulfatación se repite hasta obtener más del 95% de sustitución, preferiblemente completa.

Los nuevos derivados de epiK5-N,O-sobresulfato así obtenidos están generalmente en su forma de sal de sodio. Dicha sal de sodio puede convertirse en otra sal química o farmacéuticamente aceptable. Las sales particularmente

ventajosas son aquéllas de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, de amonio, tetraalquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, aluminio y zinc. Se prefieren las sales de sodio, calcio y tetrabutilamonio.

- 5 Los epiK5-N-sulfatos de partida sometidos a la etapa (a) del procedimiento de la presente invención se derivan de un polisacárido K5, previamente N-desacetilado, N-sulfatado prácticamente al 100%, y epimerizado en C5 el 20-60%, ventajosamente el 40-60%, y opcionalmente despolimerizado con ácido nitroso, que tiene un peso molecular medio de desde 1.000 hasta 25.000, ventajosamente de desde 1.500 hasta 25.000. Preferiblemente, dicho material de partida es un epiK5-N-sulfato que tiene un peso molecular medio de entre 10.000 y 25.000 o un LMW-epiK5-N-sulfato que tiene un peso molecular medio de desde 1.000 hasta 12.000, ventajosamente desde 1.000 hasta 10.000, preferiblemente entre 1.500 y 8.000.
- 10 Los epiK5-N-sulfatos, preparados mediante la epimerización en C5 de K5-N-sulfatos, se conocen bien en la bibliografía y se describen ampliamente por ejemplo en los documentos WO 92/17507, WO 01/72848, WO 98/14425, WO 97/43317 o US 2002/0062019. Su preparación mediante la epimerización en C5 de la unidad glucurónica de K5-N-sulfato con una D-glucuronil-C5-epimerasa se describió en los documentos citados anteriormente en el presente documento.
- 15 Un LMW-epiK5-N-sulfato que tiene un contenido en unidades idurónicas de aproximadamente el 20%, obtenido mediante la N-desacetilación, N-sulfatación y epimerización en C5 de un resto de K5 que tiene un peso molecular medio de 5.000 se describe en el documento WO 92/17507. Sin embargo tal LMW-K5-N-sulfato contiene una cantidad considerable de grupos acetilo.
- 20 Un epiK5-N-sulfato con un contenido en ácido idurónico del 40-60%, particularmente ventajoso como material de partida, es el obtenido mediante la epimerización de un K5-N-sulfato prácticamente libre de grupos acetilo, a su vez preparado a partir de K5 particularmente puro, en particular que no contiene sustancias lipófilas, descrito en el documento WO 02/068477. Según una manera preferencial del procedimiento, mediante epimerización se usa un K5-N-sulfato obtenido a partir de un K5 libre de sustancias lipófilas como el descrito en el documento WO 02/068477 y la epimerización en C5 se realiza con una D-glucuronil-C5-epimerasa que se aísla, purifica e inmoviliza sobre un soporte sólido, a un pH de aproximadamente 7, a una temperatura de aproximadamente 30°C y durante un periodo de tiempo de 12-24 horas en presencia de al menos un ión bivalente seleccionado entre calcio, magnesio, bario y manganeso.
- 25 Los LMW-epiK5-N-sulfatos que tienen un mayor contenido en unidades idurónicas, en particular del 40-60%, preferiblemente del 50-55%, son productos nuevos particularmente ventajosos como materiales de partida en la preparación de derivados de LMW-epiK5-N,O-sobresulfato.
- 30 Los LMW-epiK5-N-sulfatos tal como se mostró anteriormente se preparan mediante un procedimiento caracterizado porque un K5-N-sulfato se somete, en un orden cualquiera,
- 35 (i) a la epimerización en C5 con una D-glucuronil-C5-epimerasa que se aísla, purifica y está en disolución o se inmoviliza sobre un soporte sólido, a un pH de aproximadamente 7, a una temperatura de aproximadamente 30°C y durante un periodo de tiempo de 12-24 horas en presencia de al menos un ión bivalente seleccionado entre calcio, magnesio, bario y manganeso; y
- (ii) a una despolimerización nitrosa seguida opcionalmente de una reducción, normalmente con borohidruro de sodio.
- 40 La expresión "en cualquier orden" muestra que el procedimiento puede llevarse a cabo indiferentemente tanto en la dirección (i)-(ii), es decir en la secuencia mostrada anteriormente, así como en dirección inversa, es decir también en la dirección (ii)-(i), sometiendo el K5-N-sulfato en primer lugar a la reacción de despolimerización nitrosa, seguida opcionalmente de una reducción con borohidruro de sodio y después a la epimerización en C5 en las condiciones mencionadas anteriormente. El orden preferido es en la dirección (i)→(ii). La secuencia (ii)-(i) se utiliza preferiblemente partiendo de LMW-K5-N-sulfatos que tienen un peso molecular medio superior a 4.000, preferiblemente partiendo de aproximadamente 6.000. Por ejemplo, puede determinarse la cantidad de nitrito de sodio que, partiendo de 1 g de epiK5-N-sulfato, permite la obtención de un LMW-epiK5-N-sulfato con un peso molecular superior a 4.000, en particular de al menos 6.000, de manera que se obtienen productos intermedios útiles para la preparación de LMW-epiK5-N,O-sobresulfatos. En realidad, en este caso, se obtiene en la etapa (ii) el porcentaje de epimerización óptima.
- 45
- 50 Según un aspecto preferencial de la invención, la C5-epimerasa se inmoviliza sobre un soporte sólido inerte.
- La C5-epimerasa, preferiblemente recombinante, aislada y purificada por ejemplo según Campbell 1994, documento WO 98/48006, Jin-Ping 2001 o Crawford 2001, se inmoviliza sobre un soporte inerte en presencia del sustrato, es decir en presencia de derivado de K5-N-sulfato de partida o en presencia de LMW-K5-N-sulfato, que tiene ventajosamente un peso molecular medio superior a 4.000, preferiblemente de al menos 6.000. La inmovilización se realiza según métodos convencionales, por ejemplo tal como se describen en el documento WO 01/72848.
- 55

La reacción de epimerización en C5 se lleva a cabo recirculando 20-1.000 ml de una disolución de HEPES 25 mM a un pH de aproximadamente 7 que contiene 0,001-10 g de sustrato (KS-N-sulfato o LMW-K5-N-sulfato, preferiblemente con un peso molecular superior a 4.000, en particular de al menos 6.000) y un catión seleccionado entre calcio, magnesio, bario y manganeso a una concentración de entre 10 y 60 mM a través de una columna que contiene desde  $1,2 \times 10^7$  hasta  $3 \times 10^{11}$  cpm de la enzima inmovilizada, manteniendo el pH a aproximadamente 7 a aproximadamente 30°C, a un flujo de 30-220 ml/hora durante un periodo de tiempo de 12-24 horas, ventajosamente de 15-24 horas.

Preferiblemente dicha disolución se recircula a un flujo de aproximadamente de 200 ml/hora durante la noche (15-20 horas). El producto obtenido se purifica y separa según métodos conocidos, por ejemplo mediante ultrafiltración y precipitación con etanol. El producto así obtenido que consiste en o bien epiK5-N-sulfato (y en tal caso se disuelve en agua y se somete a despolimerización) o bien LMW-epiK5-N-sulfato (en tal caso constituye el producto final). El porcentaje de epimerización, en la práctica la cantidad de unidades idurónicas con respecto a las glucurónicas, se calcula usando la  $^1\text{H-RMN}$  según el método descrito en el documento WO 96/4425.

La reacción de despolimerización nitrosa se lleva a cabo según métodos conocidos mediante la despolimerización de heparina, por ejemplo según el método descrito en el documento EP 37319, en el documento WO 82/03627 o según el método mediante la despolimerización de un K5-N-sulfato descrito en el documento EP 544592, pero partiendo de un K5-N-sulfato o un epiK5-N-sulfato que contiene desde el 0 hasta no más del 10%, preferiblemente no más del 5%, de grupos acetilo. Preferiblemente, la despolimerización, realizada con nitrito de sodio y ácido clorhídrico en un epiK5-N-sulfato prácticamente libre de grupos acetilo, va seguida de una reducción *in situ* con borohidruro de sodio.

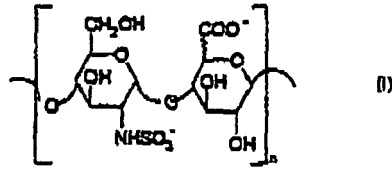
En la práctica, una disolución acuosa fría de epiK5-N-sulfato se lleva a pH ácido (aproximadamente 2) con ácido clorhídrico y, aún en frío, se trata con nitrito de sodio manteniendo la temperatura (aproximadamente 4°C) y el pH (aproximadamente 2) constantes y, al término de la despolimerización (aproximadamente 15-30 minutos) la disolución se neutraliza con hidróxido de sodio y se trata, aún a aproximadamente 4°C, con una disolución acuosa de borohidruro de sodio. Al término de la reducción (aproximadamente 4 horas) el exceso de borohidruro de sodio se destruye con ácido clorhídrico, la disolución se neutraliza con hidróxido de sodio y el producto despolimerizado (y reducido) se aísla según métodos conocidos, por ejemplo mediante precipitación directa con etanol o acetona. El producto obtenido al término de la despolimerización puede ser o bien un LMW-epiK5-N-sulfato (en tal caso constituye el producto final) o bien un LMW-K5-N-sulfato (y en tal caso se somete directamente a epimerización en C5 tal como se mostró anteriormente en el presente documento, tras el aislamiento o también en disolución sin aislarse previamente), en particular cuando tiene un peso molecular medio superior a 4.000, preferiblemente de al menos 6.000, o se utiliza para preparar un LMW-K5-N,O-sobresulfatado con actividad antiangiogénica y antiviral. Controlando apropiadamente la reacción de despolimerización, en particular usando diferentes cantidades de nitrito de sodio/ácido clorhídrico, se obtienen LMW-L5-N-sulfatos o LMW-epiK5-N-sulfatos que tiene un peso molecular medio en todo el intervalo de desde 1.500 hasta 12.000, ventajosamente desde 1.500 hasta 10.000, preferiblemente desde 1.500 hasta 7.500, calculado sobre el espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  a través de la integración de la señal atribuida al C2 del 2,5-anhidromanitol con la del carbono anomérico de la glucosamina dentro de la cadena de polisacárido. Según una manera general de procedimiento, partiendo por ejemplo de 1 g de epiK5-N-sulfato, el producto de partida se disuelve en 100-200 ml de agua desionizada y se mantiene a una temperatura de 4°C. Después una cantidad de nitrito de sodio se añade de manera que se obtiene el peso molecular medio deseado, por ejemplo de desde 2.000 hasta 4.000. Por tanto, el hecho de partir de un epiK5-N-sulfato que tiene un peso molecular de 20.000 medido con el método de HPLC equipado con una columna BioRad BioSil 250 y usando un patrón de heparina de peso molecular conocido, requerirá la adición de 330 a 480 mg de nitrito de sodio disuelto en una disolución acuosa al 0,2%. La disolución que contiene el epiK5-N-sulfato y el nitrito de sodio, mantenido a 4°C, se lleva a pH 2 a través de la adición de HCl 0,1 N enfriado hasta 4°C. Se deja reaccionar con agitación lenta durante 20-40 minutos, después se neutraliza con NaOH 0,1 N. El producto obtenido se lleva hasta temperatura ambiente y se trata con un agente reductor tal como por ejemplo borohidruro de sodio (250-500 mg disueltos en 50-100 ml de agua) y se deja reaccionar durante 4-8 horas. El exceso de borohidruro de sodio se elimina llevando el pH hasta 5-5,5 con HCl 0,1 N y se deja reposar durante 2-4 horas más. Al final se neutraliza con NaOH 0,1 N y se recupera el producto mediante precipitación con acetona o etanol tras haber concentrado el producto mediante evaporación a presión reducida.

De manera similar, puede determinarse la cantidad de nitrito de sodio que, partiendo de 1 g de K5-N-sulfato o epiK5-N-sulfato, permite la obtención de un LMW-K5-N-sulfato o un LMW-epiK5-N-sulfato con un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 12.000, ventajosamente desde 4.000 hasta 7.500, en particular de 6.000-7.500.

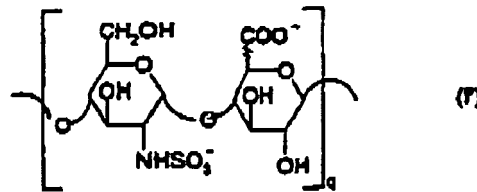
El LMW-epiK5-N-sulfato así obtenido, con un contenido en ácido idurónico de desde el 20 hasta el 60%, ventajosamente desde el 40 hasta el 60%, preferiblemente del 50-55% y prácticamente libre de los grupos  $\text{NH}_2$  y N-acetilo, que tiene un peso molecular medio de desde 1.500 hasta 12.000, ventajosamente desde 1.500 hasta 10.000, preferiblemente desde 1.500 hasta 7.500 y sus sales química o farmacéuticamente aceptables constituyen productos nuevos útiles como materiales de partida particularmente interesantes en la preparación de LMW-epiK5-N,O-sobresulfatos, pero también son útiles como principios activos de composiciones farmacéuticas o cosméticas y constituyen un aspecto adicional de la presente invención.



Ventajosamente, los materiales de partida en la preparación de los derivados de epiK5-N,O-sobresulfato de la presente invención son derivados de epiK5-N-sulfato que consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I

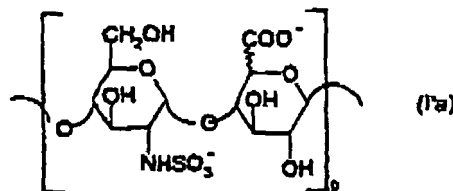


- 5 en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, ventajosamente desde 3 hasta 100 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable. Más ventajosamente, dichos derivados de epiK5-N-sulfatos de partida consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I en la que las unidades urónicas consisten en un 40-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, ventajosamente desde 3 hasta 100 y el catión correspondiente es químicamente aceptable. Los materiales de partida preferidos son LMW-epiK5-N-sulfatos tal como se mostraron anteriormente, que consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula en la que las unidades urónicas comprenden un 20-60%, ventajosamente un 40-60%, preferiblemente un 50-55%, de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 20, ventajosamente desde 3 hasta 15 y el catión correspondiente es químicamente aceptable.
- 10
- 15 En la práctica, dichos LMW-epiK5-N-sulfatos preferidos consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I'

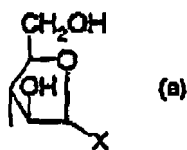


- 20 en la que las unidades urónicas comprenden un 20-60%, ventajosamente un 40-60%, preferiblemente un 50-55% de ácido idurónico, q es un número entero desde 2 hasta 20, ventajosamente desde 3 hasta 15, y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.
- En este contexto, el término "químicamente" se refiere a un catión que puede usarse en síntesis química, tales como iones sodio, amonio, tetraalquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, o para la purificación del producto. Los cationes ventajosos son aquéllos derivados de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio, tetraalquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, aluminio y zinc. Los cationes preferidos son los iones sodio, calcio y tetrabutilamonio.

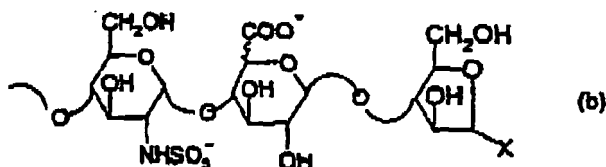
- 25 Particularmente interesantes son los LMW-epiK5-N-sulfatos que consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I' anteriormente en el presente documento, obtenidos mediante despolimerización nitrosa de los correspondientes epiK5-N-sulfatos mostrados anteriormente y la posterior reducción posible por ejemplo con borohidruro de sodio. Entre éstos, se prefieren los LMW-epiK5-N-sulfatos que consisten en una mezcla de cadenas en la que la especie preponderante tiene la fórmula I'a



- 30 en la que las unidades urónicas consisten en un 60-40% de ácido glucurónico y en de un 40% a un 60% de ácido idurónico, p es un número entero desde 4 hasta 8. El peso molecular medio de estos productos es de desde aproximadamente 2000 hasta aproximadamente 4000 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.
- 35 El origen de estos epiK5-N-sulfatos de una etapa de despolimerización nitrosa implica, en el extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dicha mezcla de cadenas, la presencia de una unidad de 2,5-anhidromanosa o, en el caso de reducción con por ejemplo borohidruro de sodio, de 2,5-anhidromanitol de estructura (a)

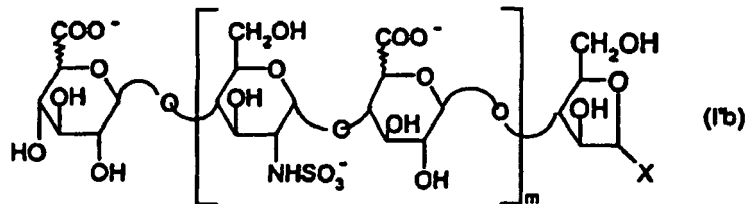


en la que X representa un grupo formilo o un grupo hidroximetilo. Por tanto, el extremo reductor de la mayoría (el 60-70% de las cadenas) se representa realmente mediante la estructura (b)



5 en la que X es como se definió anteriormente.

La presencia de la estructura (a) no tiene ninguna influencia sobre las características químicas de los epiK5-N-sulfatos y sus derivados dado que cualquier sulfatación llevaría a una posible introducción de uno o dos grupos sulfato lo que sin embargo no cambiaría significativamente el grado de sulfatación de los derivados O-sulfatados. Sin embargo es preferible que la despolimerización nitrosa vaya seguida por la reducción por ejemplo con borohidruro de sodio dado que, según el procedimiento de la presente invención, dichos LMW-epiK5-N-sulfatos se someten a reacciones de sulfatación y de acilación cuya influencia, del radical de 2,5-anhidromanosa de estructura (a), no se conoce en el grupo formilo en el que X representa formilo. Por otra parte, la presencia de la estructura (a) no influye en la actividad biológica de los productos, tal como se demostró por Østergaard P. B. *et al.* en *Thrombosis Research*, 1987, 45, 739-749 (Østergaard 1987) para las heparinas de bajo peso molecular. Los LMW-epiK5-N-sulfatos particularmente ventajosos según la presente invención consisten en mezcla de cadenas en la que la especie preponderante es un compuesto de fórmula l'b



en la que X es formilo o, preferiblemente, hidroximetilo, m es 4, 5 ó 6, el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable y las unidades glucurónicas e idurónicas están presentes de manera alternante, partiendo de una unidad glucurónica o idurónica. En tal caso la razón glucurónicas/idurónicas es de desde 45/55 hasta 55/45, es decir aproximadamente 50/50.

El uso de la C5-epimerasa, preferiblemente recombinante, preferiblemente inmovilizada sobre un soporte sólido en las condiciones mostradas anteriormente por tanto no permite la epimerización "en conglomerados" de los derivados de K5-N-sulfato para dar derivados de epiK5-N-sulfato como se produce en la naturaleza, pero sí el tipo ordinario.

25 Por tanto, según otro de sus aspectos, la presente invención proporciona el uso de la C5-epimerasa aislada y purificada, para la conversión de un derivado de K5-N-sulfato en un derivado de epiK5-N-sulfato correspondiente caracterizado por una unidad de repetición de tetrasacárido que consiste en dos unidades de glucosamina separadas mediante una unidad glucurónica y seguida por una unidad idurónica o separadas mediante una unidad idurónica y seguida por una unidad glucurónica.

30 Dicha epimerización se produce de manera óptima si se lleva a cabo en un derivado de K5-N-sulfato que tiene un peso molecular medio superior a 4.000, preferiblemente desde 6.000 hasta 7.500.

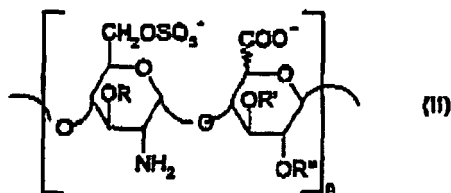
Según la presente invención, los derivados de epiK5-N-sulfato de partida, preferiblemente N-sulfatados al 100% (en particular los derivados de epiK5-N-sulfato que consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula l' a o l' b o en la que la especie preponderante tiene la fórmula l' a o l' b en la que X es hidroximetilo), se someten a las etapas mencionadas anteriormente (a) y (b), al término de lo cual se aíslan los correspondientes nuevos derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato, en los que la amina no está sustituida, normalmente en forma de sal de sodio, que puede transformarse en otra sal química o farmacéuticamente aceptable. Las sales particularmente ventajosas son aquéllas de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio, tetraalquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, aluminio y zinc y, entre éstas, se prefieren las sales de sodio, calcio y tetrabutilamonio.

Por tanto, según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a nuevos derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato y sus sales química o farmacéuticamente aceptables, que pueden obtenerse mediante un procedimiento caracterizado porque

5 (a) un derivado de epiK5-N-sulfato, en forma ácida, se trata con una base orgánica terciaria o cuaternaria, dejando que la mezcla de reacción repose durante un periodo de tiempo de 30-60 minutos, manteniendo el pH de la disolución a un valor de 7 mediante la adición de dicha base orgánica terciaria o cuaternaria y su sal se aísla con dicha base orgánica;

(b) dicha sal de base orgánica de dicho derivado de epiK5-N-sulfato se trata con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobresulfatación y se aísla el derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato.

10 Usando, como materiales de partida ventajosos de la etapa (a), los derivados de epiK5-N-sulfato que consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I mencionada anteriormente, en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 3 hasta 100 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable, al final de la etapa (b) se obtiene un derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato que consiste en una mezcla de  
15 cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II



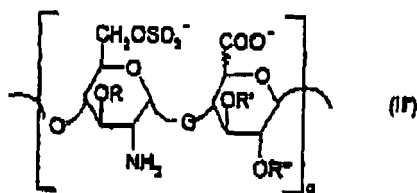
20 en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, preferiblemente desde 3 hasta 100, R, R' y R'' son hidrógeno o SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, para un grado de sulfatación de al menos 3,4, ventajosamente de al menos 3,5, más ventajosamente desde 3,55 hasta 4, preferiblemente desde 3,55 hasta 3,8 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

Estos derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato con un grado de sulfatación muy alto son productos nuevos útiles como productos intermedios en la preparación de sus derivados de N-sulfato o N-acilados (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) básicamente libres de actividad en los parámetros de coagulación, pero que tienen otras propiedades farmacológicas interesantes.

25 Derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato ventajosos con un grado de sulfatación muy alto consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II en la que las unidades urónicas consisten en un 40-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, preferiblemente desde 3 hasta 100, con un peso molecular medio de desde 2.000 hasta 40.000, ventajosamente desde 4.500 hasta 40.000, R es en al menos el 40%, preferiblemente en un 50-80% SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R' y R'' son ambos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> o uno es hidrógeno y el otro es en un 5-10% SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido glucurónico monosulfatado y en un 10-15% SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido idurónico monosulfatado, el grado de sulfatación es superior a 3,4, ventajosamente de al menos 3,5, más ventajosamente desde 3,55 hasta 4, preferiblemente desde 3,55 hasta 3,8, y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

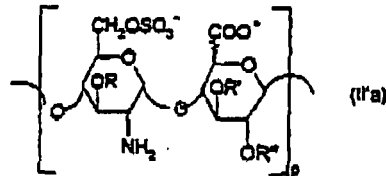
35 Derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato preferidos con un grado de sulfatación muy alto son LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos que consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II en la que las unidades urónicas comprenden un 40-60%, preferiblemente un 50-55%, de ácido idurónico, R es en al menos el 40%, ventajosamente el 50-80%, de manera preferible aproximadamente el 65% SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R' y R'' son ambos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> o uno es hidrógeno y el otro es en un 5-10% SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido glucurónico y en un 10-15% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 20, ventajosamente desde 3 hasta 15, con un peso molecular medio de desde 4.000 hasta 8.000 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

40 En la práctica, dichos LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos preferidos consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II'



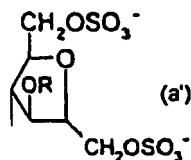
en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico: q es un número entero desde 2 hasta 20, ventajosamente desde 3 hasta 15, R, R' y R'' son hidrógeno o SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, para un grado de sulfatación de desde 3,55 hasta 3,8, y el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable.

- 5 Entre estos LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos se prefieren aquéllos que consisten en una mezcla de cadenas en la que la especie preponderante tiene la fórmula II'a



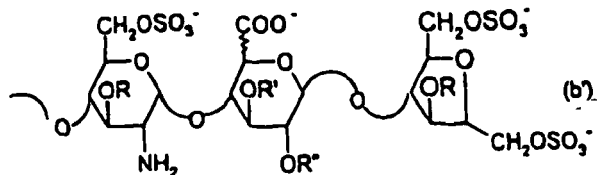
en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, p es un número entero desde 4 hasta 8, R, R' y R'' son tal como se definieron anteriormente, el grado de sulfatación es de desde 3,55 hasta 3,8 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

- 10 El origen de los nuevos LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos a partir de LMW-epiK5-sulfatos obtenidos mediante despolimerización nitrosa y posterior reducción con, por ejemplo, borohidruro de sodio, implica, en el extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dicha mezcla de cadenas, la presencia de una unidad sulfatada de 2,5-anhidromanitol de estructura (a')



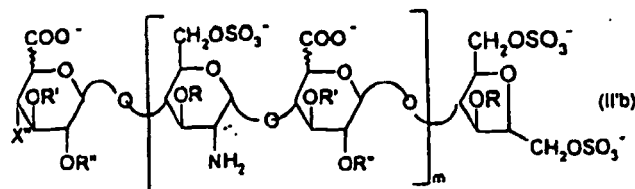
- 15 en la que R representa hidrógeno o SO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Por tanto, el extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dicha mezcla de cadenas se representa mediante la estructura (b')



en la que la unidad urónica puede ser glucurónica o idurónica.

- 20 Entre los nuevos LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos mencionados anteriormente, se prefieren aquéllos que consisten en mezclas en las que la especie preponderante es un compuesto de fórmula II'b



- 25 en la que las unidades urónicas consisten en un 40-60% de ácido idurónico, m es 4, 5 ó 6, R, R' y R'' son hidrógeno o SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, X'' es OH o OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, para un grado de sulfatación de desde 3,55 hasta 3,8, las unidades idurónicas están presentes de manera alternante, partiendo de una unidad glucurónica o idurónica, y el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable.

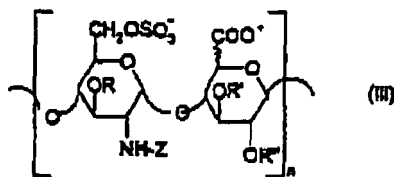
Todos estos derivados epiK5-amina-O-sobresulfatados con un grado de sulfatación muy alto son productos nuevos que son productos intermedios útiles para la preparación de los nuevos derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato N-sustituídos y por tanto constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

En particular, según otro de sus aspectos, la invención se refiere el uso de los derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato mencionados anteriormente con un grado de sulfatación muy alto para la preparación de nuevos derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato N-sustituídos, en particular N-sulfatados o N-acilados.

5 Al término de la etapa (c) del procedimiento de la presente invención, que consiste en una N-sulfatación de los derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato obtenidos al final de la etapa (b) (en particular los derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato que consisten en mezclas de cadenas en las que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II o II' o en las que la especie preponderante tiene la fórmula II'a o II'b) se obtienen derivados de epiK5-N,O-sobresulfato cuyo contenido en ácido idurónico es del 20-60% del total de los ácidos urónicos y cuyo grado de sulfatación es de desde 4 hasta 4,6.

10 Por tanto, según otro de sus aspectos, la presente invención proporciona nuevos derivados N-desacetilados de polisacárido K5, O-sulfatados y N-sulfatados, epimerizados en C5 a ácido idurónico en al menos el 20% del total de las unidades urónicas, que tienen un peso molecular medio de desde 2.000 hasta 45.000, un grado de sulfatación de 4 a 4,6. En los derivados de epiK5-N,O-sobresulfato de la presente invención el grado de sulfatación es muy alto, desde 4 hasta 4,6, siendo el nitrógeno de la glucosamina prácticamente sulfato al 100%. Por otro lado, los derivados de epiK5-N,O-sobresulfato están 6-O-sulfatados al 100% y 3-O-sulfatados al 50-80% en sus unidades glucosaminas, 3-O-monosulfatados al 5-10% en unidades glucurónicas, O-monosulfatados al 10-15% en unidades idurónicas y 2,3-di-O-sulfatados en las unidades urónicas restantes, considerando que el grado de sulfatación es de desde 4 hasta 4,6.

20 Derivados de epiK5-N,O-sobresulfato ventajosos según la presente invención se obtienen a través de derivados de epiK5-amina-O-sobresulfato a su vez preparados a partir de derivados de epiK5-N-sulfato que consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I mencionada anteriormente, en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, ventajosamente desde 3 hasta 100 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable. En tal caso, los nuevos derivados de epiK5-N,O-sobresulfato que consisten en mezclas de cadenas en las que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula III



en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, preferiblemente desde 3 hasta 100, R, R' y R'' son hidrógeno o SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Z es SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el grado de sulfatación es de desde 4 hasta 4,6 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

30 Dichos cationes son ventajosamente aquéllos de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio, tetraalquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, aluminio y zinc y, entre éstos, preferiblemente las sales de sodio, calcio y tetrabutilamonio.

Entre los nuevos derivados de epiK5-N,O-sobresulfato mencionados anteriormente, aquéllos que consisten en mezclas de cadenas en las que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula III mencionada anteriormente en la que R es SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en un 50%-80%, preferiblemente en aproximadamente un 65% de dichas cadenas y el grado de sulfatación es de desde 4 hasta 4,6.

35 Los derivados de epiK5-N,O-sobresulfato ventajosos con un grado de sulfatación muy alto consisten en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula III, en la que Z es SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, las unidades urónicas consisten en un 40-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, preferiblemente desde 3 hasta 100, con un peso molecular medio de desde 2.000 hasta 45.000, ventajosamente desde 4.500 hasta 45.000, R es en al menos un 40%, preferiblemente en un 50-80% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R' y R'' son ambos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> o uno es hidrógeno y el otro es en un 5-10% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido glucurónico monosulfatado y en un 10-15% de SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido idurónico monosulfatado, el grado de sulfatación es de desde 4 hasta 4,6 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

45 Los nuevos derivados de epiK5-N,O-sobresulfato, especialmente en su forma de sal, son productos altamente aniónicos que pueden capturar los radicales libres y pueden utilizarse en la industria cosmética como adyuvantes contra la pérdida de cabello o para preparar cremas "antienvejecimiento" y, en la industria farmacéutica, como productos para el tratamiento de la dermatitis. Además, los derivados de epiK5-N,O-sobresulfato de la presente invención, en particular los LMW-epiK5-N,O-sobresulfatos tienen actividad antiangiogénica y antiviral y por tanto constituyen principios activos para la preparación de medicamentos.

50 Por tanto, según uno de sus aspectos adicionales, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen, como uno de sus principios activos, una cantidad farmacológicamente activa de un derivado de epiK5-

N,O-sobresulfato tal como se mostró anteriormente o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con un excipiente farmacéutico.

5 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración oral, subcutánea, intravenosa, transdérmica o tópica, los principios activos se administran preferiblemente en forma de unidades de dosificación; en mezcla con los vehículos o excipientes farmacéuticos clásicos. La posología puede variar ampliamente dependiendo de la edad, el peso y el estado de salud del paciente. Esta posología incluye la administración de una dosis de desde 1 hasta 1000 mg, ventajosamente desde 10 hasta 750 mg, preferiblemente de 250 a 500 mg de una a tres veces al día mediante administración intravenosa, subcutánea, oral, transdérmica o tópica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan con los excipientes clásicos adecuados para las diferentes formas de administración. Particularmente ventajosas son las formulaciones en forma de cremas, pomadas, linimentos, geles, espumas, bálsamos, óvulos vaginales, supositorios, disoluciones o suspensiones adecuadas para la administración local.

15 Ventajosamente, las composiciones de la presente invención incluyen, como uno de sus principios activos, un derivado de epiK5-N,O-sobresulfato que puede obtenerse partiendo de un derivado de epiK5 según las etapas (a), (b) y (c) del procedimiento descrito anteriormente, o partiendo de un epiK5 no despolimerizado, según las etapas (a), (b) y (c) del procedimiento descrito anteriormente, con la posible despolimerización nitrosa posterior tras la etapa (c), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con un excipiente farmacéutico. Ventajosamente, dicho derivado de epiK5-N,O-sobresulfato consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula III para un grado de sulfatación de desde 4 hasta 4,6.

20 Finalmente, según otro de sus aspectos, la presente invención proporciona una composición cosmética que incluye una cantidad eficaz de un derivado de epiK5-N,O-sobresulfato o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con un excipiente cosmético.

25 Una sal seleccionada del grupo que consiste en sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio y zinc de los derivados de epiK5-N,O-sobresulfato, en particular aquéllos que consisten en mezclas de cadenas en las que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula III constituye un componente activo eficaz de las composiciones farmacéuticas o cosméticas de la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

#### PREPARACIÓN I

##### *Preparación de polisacárido K5 de Escherichia coli*

30 En primer lugar se lleva a cabo una fermentación en un matraz Erlenmeyer usando el siguiente medio:

Harina de soja libre de grasa	2 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,7 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/l
MgCl <sub>2</sub>	0,11 g/l
Citrato de sodio	0,5 g/l
Sulfato de amonio	1 g/l
Glucosa	2 g/l
Agua de manantial	1000 ml
pH=	7,3

35 Se esteriliza el medio a 120°C durante 20 minutos. Se prepara por separado la glucosa en forma de disolución, que se esteriliza a 120°C durante 30 minutos y se añade de manera estéril al medio. Se inocula el matraz Erlenmeyer con una suspensión de células de *E. coli* Bi 8337/41 (O10:K5:H4) procedentes de un cultivo inclinado mantenido en agar de soja triptica, y se incuba a 37°C durante 24 horas con agitación controlada (160 rpm, desplazamiento de 6 cm). Se midió el crecimiento bacteriano contando las células usando un microscopio. En una operación posterior, un fermentador Chemap-Braun de 14 l que contiene el mismo medio como el anterior, se inocula al 0,1% con el cultivo del matraz Erlenmeyer como el anterior y se realiza la fermentación mediante la aeración de 1 vvm, (vvm = volumen de aire por volumen de líquido por minuto) 400 rpm de agitación y temperatura de 37°C durante 18 horas. Durante la fermentación se miden el pH, el oxígeno, el residuo de glucosa, el polisacárido K5 producido y el crecimiento bacteriano.

40

Al final de la fermentación, se lleva la temperatura hasta 80°C durante 10 minutos. Se separan las células del medio a través de centrifugación a 10.000 rpm y se somete a ultrafiltración el sobrenadante usando un módulo SS 316 (MST) equipado con una membrana PES con un punto de corte nominal de 800 y 10.000 D para reducir el volumen hasta 1/5. Después se precipita el polisacárido K5 mediante la adición de 4 volúmenes de acetona a 4°C y se deja sedimentar durante la noche a 4°C. Finalmente se recupera mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos o la filtración. Se lleva a cabo la desproteínización del sólido obtenido usando una proteasa de tipo II de *Aspergillus oryzae* en un tampón de NaCl 0,1 M y EDTA 0,15 M a pH 8 que contiene SDS (dodecilsulfato de sodio al 0,5%) (10 mg/l de filtrado) a 37°C durante 90 minutos. Se somete a ultrafiltración la disolución obtenida sobre un modelo SS 316 con una membrana a un punto de corte nominal de 10.000 D con 2 extracciones con NaCl 1 M y se lava con agua hasta que desaparece la absorbancia en el ultrafiltrado. Después se precipita el polisacárido K5 con acetona y se obtiene un rendimiento de 850 mg por litro de fermentador. Se mide la pureza del polisacárido obtenido a través de la determinación de los ácidos urónicos (método del carbazol), protón y carbono 13, UV y contenido proteico. La pureza es superior al 80%.

El polisacárido obtenido se compone de dos restos de diferente peso molecular, respectivamente 30.000 y 5.000 D tal como se desprende de la determinación mediante HPLC usando una columna Pharmacia 75 HR y un solo resto con un tiempo de retención de aproximadamente 9 minutos usando dos columnas en serie de Bio-sil SEC 250 (Bio Rod) y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvil a temperatura ambiente y un flujo de 0,5 ml/minuto. Se realiza la medición frente a la curva patrón obtenida con restos de heparina de peso molecular conocido.

El espectro de <sup>1</sup>H-RMN del K5 purificado así obtenido muestra diferentes señales que pueden atribuirse a metilos de sustancias lipófilas.

## PREPARACIÓN II

### *Purificación de K5*

En 100 ml de una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio y mantenida a una temperatura de 4°C se disuelve 1 g de K5 obtenido al final de la PREPARACIÓN I y a la disolución así obtenida se le añaden 3 volúmenes de isopropanol frío. La concentración salina de la disolución se lleva hasta 3 M mediante la adición de la cantidad calculada de una disolución saturada de cloruro de sodio y se deja la disolución obtenida en un ambiente frío (aproximadamente 4°C) durante la noche. Se separa el precipitado que se forma mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos y se verifica la pureza del producto mediante diálisis durante la noche y posterior examen del espectro de <sup>1</sup>H-RMN, del que deben estar ausentes las señales en la región bajo 1,5 ppm. Opcionalmente, se repite la operación de disolución en agua saturada con NaCl y la precipitación con isopropanol. Se disuelve el precipitado en agua y se somete a ultrafiltración sobre una membrana Miniplat Millipore con 10.000 D de punto de corte hasta la desaparición de las sales. Por tanto se obtiene un K5 que tiene una pureza de al menos el 99% a partir de cuyo espectro de <sup>1</sup>H-RMN no resulta ninguna traza de impurezas lipófilas en la región bajo 1,5 ppm.

## PREPARACIÓN III

### *Preparación de un K5-N-sulfato*

#### *(i) N-Desacetilación*

Se disuelven diez gramos de polisacárido K5 puro preparado tal como se describió en la PREPARACIÓN II en 1000 ml de hidróxido de sodio 2 N y se deja la disolución así preparada a 60°C durante 24 horas. Se lleva la disolución hasta temperatura ambiente después hasta pH neutro (pH 7) con ácido clorhídrico 6 N.

#### *(ii) N-sulfatación*

A la disolución que contiene el K5 desacetilado, mantenida a 40°C, se le añadieron 16 g de carbonato de sodio y después y en 4 horas, 16 g de piridina.SO<sub>3</sub>-. Al final de la reacción, tras 24 horas, se lleva la disolución hasta temperatura ambiente, después hasta pH de 6.5-7 con una disolución de ácido clorhídrico al 5%. Se purifica el producto a partir de las sales mediante diafiltración usando una membrana enrollada helicoidalmente de 1.000 D (cartucho prepscale de Millipore). El procedimiento termina cuando la conductividad del permeado es inferior a 1000 µS, preferiblemente inferior a 100 µS. La intradiálisis es reducida hasta que se obtiene una concentración del 10% del polisacárido usando el mismo en un sistema de diálisis de concentración. Se seca la disolución concentrada mediante liofilización. Tras el análisis del espectro de <sup>13</sup>C-RMN no aparecen residuos N-acetilo o NH<sub>2</sub>.

## PREPARACIÓN IV

### *LMW-K5-N-sulfato*

El producto obtenido tal como se describe en el ejemplo 1, etapas (i) y (ii), del documento WO 02/068477, se despolimeriza mediante el método de degradación con ácido nitroso y una posterior reducción del aldehído que se forma. Se continúa disolviendo 1 g de K5-N-sulfato en 200 ml de agua destilada y se le añaden 480 mg de nitrito de sodio disuelto en 240 ml de agua destilada. Después se lleva la disolución hasta 4°C y el pH hasta 2 con HCl 0,1 N y

se mantiene durante 30 minutos. Al final de la reacción se lleva la disolución hasta pH 7 con NaOH 0,1 M y después hasta temperatura ambiente. Después se le añaden a la disolución 450 mg, de NaBH<sub>4</sub> y se deja reaccionar durante 4 horas. Se elimina el exceso de NaBH<sub>4</sub> con HCl llevando el pH hasta 5-6. El producto, neutralizado con NaOH 0-1 M, se recupera mediante precipitación con 3 volúmenes de acetona a 4°C, filtración con embudo filtrante y se seca a 40°C en un horno de vacío. Se obtienen 900 mg de LMW-K5-N-sulfato con un peso molecular medio de aproximadamente 2.000, que consiste en una mezcla de cadenas en la que la especie preponderante es un compuesto de fórmula l'b en la que m es 4 y las unidades urónicas son las de ácido glucurónico.

#### EJEMPLO 1

*LMW-epiK5-N-sulfato. Secuencia (i)→(ii)*

##### 10 (i) Epimerización para dar epiK5-N-sulfato

Se disuelven diez gramos de K5-N-sulfato obtenido tal como se describe en el ejemplo 1, etapas (i) y (ii), del documento WO 02/068477, en cuyo espectro de <sup>1</sup>H-RMN no aparecen señales que se refieren a grupos acetilo o NH<sub>2</sub>, en 600 ml de tampón HEPES 25 mM a pH 7, que contiene CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM y se hace recircular la disolución así obtenida a través de una columna de 50 ml rellena con una resina Sepharose 4B que contiene 5 g de C5-epimerasa recombinante (documento WO 96/14425) inmovilizada tal como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/72848. Se lleva a cabo la reacción a 30°C a pH 7 con un flujo de 200 ml/h durante 24 horas. Se purifica el producto obtenido mediante ultrafiltración y precipitación con etanol. Por tanto se obtiene un epiK5-N-sulfato cuyo contenido en ácido idurónico es del 54%.

*(ii) Despolimerización de epiK5-N-sulfato.*

20 A una disolución de 1 g del producto así obtenido, en 25 ml de agua destilada, se le añaden 230 mg de nitrito de sodio disueltos en 115 ml de agua destilada. Después se lleva la disolución hasta 4°C y el pH hasta 2 con HCl 0,1 N y se mantiene durante 30 minutos. Al final de la reacción se lleva la disolución hasta temperatura ambiente y el pH hasta 7 con NaOH 0,1 M. Después se añaden a la disolución 450 mg de NaBH<sub>4</sub> y se deja reaccionar durante 4 horas. Se recupera el producto mediante precipitación con 3 volúmenes de acetona a 4°C, filtración con embudo filtrante y se seca a 40°C en un horno de vacío. Se obtienen 900 mg de LMW-epiK5-N-sulfato con un contenido en ácido idurónico del 54% y una distribución de peso molecular de desde 1.000 hasta 4.000, medida con el método de HPLC.

#### EJEMPLO 2

*LMW-epiK5-N-sulfato. Secuencia (ii)→(i)*

##### 30 (ii) Despolimerización de K5-N-sulfato

Se despolimerizan 2 g de K5-N-sulfato, obtenido tal como se describe en el ejemplo 1, etapas (i) y (ii), del documento WO 02/068477, tal como se describe en la PREPARACIÓN I, usando 100 mg de nitrito de sodio y 300 mg de borohidruro de sodio. Se obtienen 1,8 g de LMW-K5-N-sulfato con un peso molecular medio de 5.000.

*(i) Epimerización de LMW-K5-N-sulfato*

35 Se trata 1 g de LMW-K5-N-sulfato obtenido en la etapa (ii) anterior en el presente documento tal como se describe en la etapa (i) del ejemplo 1. Se obtiene un producto epimerizado con una razón ácido idurónico/ácido glucurónico de 44/56 frente a una razón de 0/100 del producto de partida, con una distribución de peso molecular de desde 2.000 hasta 10.000 y con un peso molecular medio de 5.000 D. El rendimiento, calculado midiendo el contenido en ácidos urónicos frente a un patrón con el método del carbazol (Bitter y Muir, Anal. Biochem. 1971, 39, 88-92) es del 90%.

#### EJEMPLO 3

*LMW-epiK5-N-sulfato. Secuencia (i)→(ii)*

*(i) Epimerización de K5-N-sulfato*

45 Se disuelve una cantidad de 2 g de K5-N-sulfato, obtenido tal como se describe en el ejemplo 1, etapas (i) y (ii), del documento WO 02/068477, en 120 ml de tampón HEPES 25 mM, pH 7, que contiene CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Se hace recircular la disolución obtenida a través de una columna de 50 ml cargada con la resina que contiene la enzima inmovilizada obtenida tal como se describe en el documento WO 96/14425. Se lleva a cabo esta operación a 30°C con un flujo de 200 ml/h durante 24 horas. Se purifica el producto obtenido a través de ultrafiltración sobre una membrana de 1000 D y haciéndolo pasar por una columna de intercambio iónico IR 120 H<sup>+</sup>, neutralizando el eluato con NaOH 1 N. Se recupera la muestra mediante precipitación con etanol o acetona. Se obtiene un producto epimerizado con una razón ácido idurónico/ácido glucurónico de 55/45 frente a una razón de 0/100 del producto de partida. Se calculó el porcentaje de epimerización con <sup>1</sup>H-RMN según el método descrito en el documento WO



96/14425. El rendimiento, calculado midiendo el contenido en ácidos urónicos frente a un patrón con el método del carbazol (Bitter y Muir Anal. Biochem. 39, 88-92-1971) es del 90%.

(ii) *Despolimerización de epiK5-N-sulfato*

5 Un gramo del producto obtenido en la etapa (a) se despolimeriza mediante el método de degradación con ácido nitroso y una posterior reducción del aldehído que se forma. En particular se continúa disolviendo el producto en 25 ml de agua destilada y añadiéndole 230 mg de nitrito de sodio disuelto en 115 ml de agua destilada. Después se lleva la disolución hasta 4°C y el pH desde 2 con HCl 0,1 N y se mantiene durante 30 minutos. Al final de la reacción se lleva la disolución hasta temperatura ambiente y el pH hasta 7 con NaOH 0,1 M. Después se añaden a la disolución 450 mg de NaBH<sub>4</sub> y se deja reaccionar durante 4 horas. Se recupera el producto mediante precipitación con 3 volúmenes de acetona a 4°C, filtración con embudo filtrante y se seca a 40°C en un horno de vacío. Se obtienen 900 mg de LMW-epiK5-N-sulfato con una distribución de peso molecular medida con el método de HPLC que se oscila desde 1.000 hasta 4.000 y con un contenido en unidades glucurónicas del 45% y un contenido en unidades idurónicas del 55%.

EJEMPLO 4

15 *EpiK5-N,O-sobresulfato*

(a) *Sal de tetrabutilamonio de epiK5-N-sulfato*

20 Una disolución en 40 ml de agua de 400 mg de epiK5-N-sulfato, tal como se obtiene al final de la etapa (i) del ejemplo 1, se mantiene a una temperatura de 4°C, después se hace pasar por una resina de intercambio iónico IR 120 H<sup>+</sup> acondicionada previamente con agua a 4°C. El eluato obtenido, que consiste en 100 ml de una disolución a pH 1,94, se neutraliza con una disolución de hidróxido de tetrabutilamonio al 15% y se deja a temperatura ambiente durante una hora, manteniendo el pH a 7 mediante la adición de hidróxido de tetrabutilamonio al 15% y finalmente se liofiliza. Así se obtienen 805 mg de sal de tetrabutilamonio de epiK5-N-sulfato.

(b) *EpiK5-amina-O-sobresulfato*

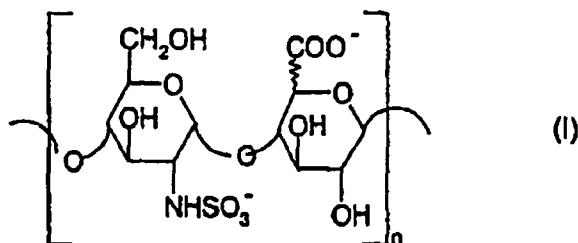
25 Una disolución que contiene 805 mg de la sal así obtenida en 30 ml de dimetilformamida se fija a 55°C y se trata con 30 ml de dimetilformamida que contiene 2,26 g de un aducto de piridina.SO<sub>3</sub>. Se continúa con la reacción a 55°C durante la noche, después se añaden 60 ml de agua a la mezcla. Tras la neutralización con NaOH 1 N, se precipita el producto con 3 volúmenes de acetona saturada con NaCl y se fija a 4°C durante la noche. Se recupera el precipitado mediante filtración en un guch G4 y después se somete a ultrafiltración con un sistema 1000 D TFF Millipore y se seca a presión reducida. Se obtienen 550 mg de epiK5-amina-O-sobresulfatado que tiene un contenido en ácido idurónico del 54%, de glucosamina-6-O-sulfato del 100%, de glucosamina-3-O-sulfato del 60%, de ácido glucurónico monosulfatado del 10%, de ácido idurónico monosulfatado del 15%, estando el resto de las unidades urónicas siendo disulfatadas, con un grado de sulfatación de 3,55 medido con el método conductométrico según Casu *et al.* 1975.

(c) *EpiK5-amina-O-sobresulfato-N-sulfato*

35 A una disolución de 250 mg del epiK5-amina-O-sobresulfatado obtenido en la etapa (b) en 15 ml de agua se le añaden 400 mg de carbonato de sodio, después a la mezcla así obtenida se le añaden 400 mg de aducto de piridina.SO<sub>3</sub> en forma sólida un poco cada vez en 4 horas. Se mantiene la mezcla de reacción a 55°C durante la noche, después se detiene llevando el pH hasta 7 con HCl 0,1 N. Tras la ultrafiltración sobre una membrana de 1000 D se añaden 3 volúmenes de acetona saturada con cloruro de sodio y se recupera el precipitado mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5'. Así se obtienen 244 mg de epiK5-N,O-sobresulfato cuyo grado de sulfatación, medido con el método conductométrico según Casu *et al.* 1975. es de 4,25. Mediante el análisis del espectro de <sup>1</sup>H-RMN se obtiene como resultado que el epiK5-N,O-sobresulfato así obtenido tiene un contenido en ácido idurónico del 54%, 6-O-sulfato del 100%, N-sulfato del 100%, glucosamina-3-O-sulfato del 60%, ácido glucurónico monosulfatado del 10%, ácido idurónico monosulfatado del 15%, estando el resto de las unidades urónicas siendo disulfatadas. A partir del espectro de <sup>1</sup>H-RMN se calcula por tanto un grado de sulfatación de 4,35 que, considerando los márgenes de error de los métodos, corresponde al grado de sulfatación de sulfatación del epiK5-amina-O-sobresulfato obtenido al término de la etapa (b), N-sulfatado al 100%. Por tanto se supone que, más allá de un cierto porcentaje de grupos sulfato, la naturaleza aniónica fuerte del producto puede llevar a una subestimación del grado de sulfatación determinado con el método conductométrico.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un polisacárido K5 N-desacetilado, N,O-sobresulfatado, epimerizado en C5 desde el 20% hasta el 60%, que tiene un grado de sulfatación de desde 4 hasta 4,6 (derivado de epiK5-N,O-sobresulfato), caracterizado porque
- 5 (a) un polisacárido K5 N-desacetilado, N-sulfatado, epimerizado en C5 desde el 20% hasta el 60%, (derivado de epiK5-N-sulfato) que tiene un peso molecular medio de desde 1.000 hasta 25.000, en forma ácida, se trata con una base orgánica terciaria o cuaternaria, dejando que la mezcla de reacción repose durante un periodo de tiempo de 30-60 minutos a un pH de 7 y se aísla su sal con dicha base orgánica;
- 10 (b) dicha sal de base orgánica de dicho derivado de epiK5-N-sulfato se trata con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobresulfatación;
- (c) el polisacárido K5 N-desacetilado, O-sobresulfatado, epimerizado en C5 desde el 20% hasta el 60% (derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato), que tiene un grado de sulfatación de desde 3,55 hasta 3,8 así obtenido se somete a N-sulfatación mediante métodos conocidos y se aísla el derivado de epiK5-N,O-sobresulfato así obtenido.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho derivado de epiK5-N,O-sobresulfato se aísla en forma de sal de sodio y se transforma opcionalmente en otra sal química o farmacéuticamente aceptable.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque en la etapa (a) se usa hidróxido de tetrabutilamonio como base orgánica.
- 20 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque en la etapa (b) se lleva a cabo la O-sobresulfatación en dimetilformamida usando 2-4 moles de reactivo de O-sulfatación por OH disponible por disacárido a una temperatura de 40-60°C durante 15-20 horas.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque un derivado de epiK5-N-sulfato N-sulfatado al 100% se usa como material de partida.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho derivado de epiK5-N-sulfato de partida está epimerizado en C5 el 40-60%.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho derivado de epiK5-N-sulfato de partida tiene un peso molecular medio de desde 1.500 hasta 25.000.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho derivado de epiK5-N-sulfato de partida tiene un peso molecular medio de entre 10.000 y 25.000.
- 30 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho material de partida tiene un peso molecular medio de desde 1.000 hasta 12.000.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho material de partida tiene un peso molecular medio de desde 1.500 hasta 8.000.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque un derivado de epiK5-N-sulfato se usa como material de partida que consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I

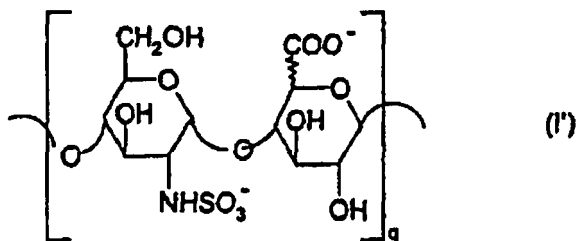


en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque dicho material de partida consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I, en la que las unidades urónicas consisten en un 40-60% de ácido idurónico.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizado porque, en la fórmula I, n representa un número entero desde 3 hasta 100.

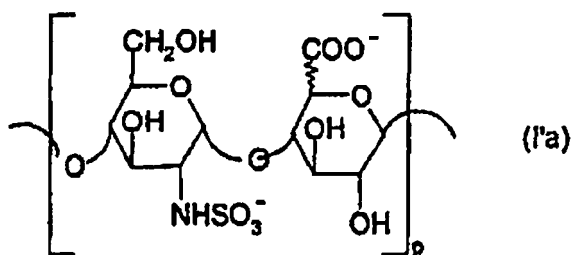
14. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho material de partida consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I'



5 en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, q es un número entero desde 2 hasta 20 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

10 15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque dicho material de partida consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I', en la que q es un número entero desde 3 hasta 15.

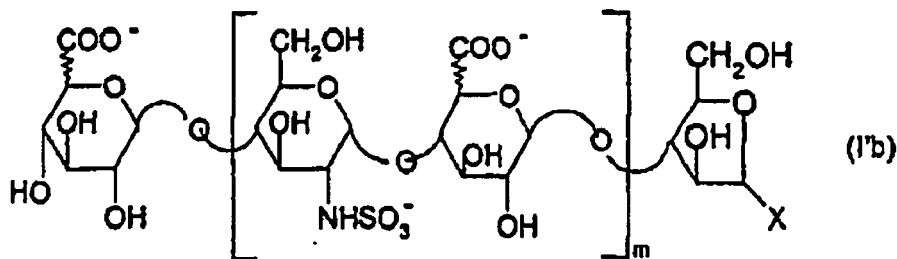
16. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho material de partida consiste en una mezcla de cadenas en la que la especie preponderante tiene la fórmula I'a



15 en la que las unidades urónicas consisten en un 60-40% de ácido glucurónico y de un 40% a un 60% de ácido idurónico, p es un número entero desde 4 hasta 8 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque el peso molecular medio de dicho material de partida es de desde 2000 hasta 4000.

20 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, caracterizado porque dicho material de partida consiste en una mezcla de cadenas en la que la especie preponderante tiene la fórmula I'b

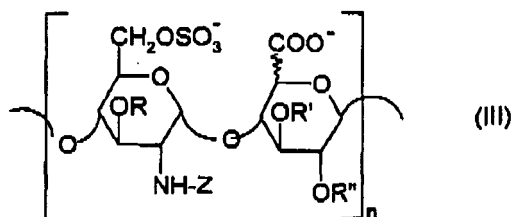


en la que X es hidroxietilo, m es 4, 5 ó 6 y las unidades glucurónicas e idurónicas están presentes de manera alternante, empezando con una unidad glucurónica o idurónica.

25 19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 18, caracterizado porque dicho material de partida procede de una N-desacetilación y de una N-sulfatación de un K5 que está libre de sustancias lipófilas.

20. Derivado de epiK5-N,O-sobresulfato que puede obtenerse según el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 19.

21. Derivado de epiK5-N,O-sobresulfato según la reivindicación 20, caracterizado porque consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula III



5 en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, R, R', R'' representan hidrógeno o SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R siendo SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en al menos el 40% de dicha mezcla de cadenas, Z es un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, n es un número entero desde 2 hasta 100, el grado de sulfatación es de desde 4 hasta 4,6 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

22. Derivado de epiK5-N,O-sobresulfato según la reivindicación 21, en el que dicho catión química o farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en iones de metal alcalino, metales alcalinotérreos, amonio, tetraalquil(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amonio, aluminio y zinc.

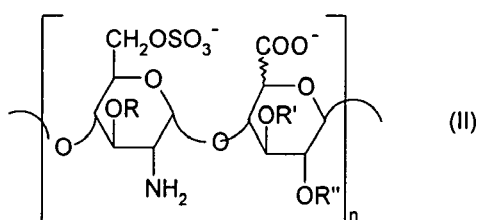
10 23. Derivado de epiK5-N,O-sobresulfato según la reivindicación 22, en el que dicho catión química o farmacéuticamente aceptable es un ión sodio, calcio o tetrabutilamonio.

24. Derivado de epiK5-N,O-sobresulfato según la reivindicación 21, que consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula III en la que R es SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el 50%-80% de dichas cadenas, para un grado de sulfatación de desde 4 hasta 4,6.

15 25. Derivado de epiK5-N,O-sobresulfato según la reivindicación 21, que consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula III, en la que Z es SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, las unidades urónicas consisten en un 40-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, con un peso molecular medio de desde 2.000 hasta 45.000, R es en un 50-80% SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R' y R'' son ambos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> o uno es hidrógeno y el otro es en un 5-10% SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido glucurónico monosulfatado y en un 10-15% SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido idurónico monosulfatado, para un grado de sulfatación de desde 4 hasta 4,6 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

20 26. Derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato cuyo contenido en ácido idurónico es del 20-60% del total de los ácidos urónicos, que tiene un grado de sulfatación de desde 3,55 hasta 3,8, que puede obtenerse según las etapas (a) y (b) de la reivindicación 1, aislado en forma de sal de sodio y, opcionalmente, transformada en otra sal química o farmacéuticamente aceptable.

25 27. Derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato según la reivindicación 26, caracterizado porque dicho derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II



en la que las unidades urónicas consisten en un 20-60% de ácido idurónico, n es un número entero desde 2 hasta 100, R, R' y R'' son hidrógeno o SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

30 28. Derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato según la reivindicación 27, que consiste en una mezcla de cadenas en la que al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II en la que las unidades urónicas consisten en un 40-60% de ácido idurónico, R es en un 50-80% SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R' y R'' son ambos SO<sub>3</sub><sup>-</sup> o uno es hidrógeno y el otro es en un 5-14% SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido glucurónico monosulfatado y en un 10-15% SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ácido idurónico monosulfatado.

35 29. Composición farmacéutica que incluye, como uno de sus principios activos, una cantidad farmacológicamente activa de un derivado de epiK5-N,O-sobresulfato según una cualquiera de las reivindicaciones de 20 a 25 en mezcla con un excipiente farmacéutico.

30. Composición cosmética que incluye una cantidad eficaz de un derivado de epiK5-N,O-sobresulfato según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en mezcla con un excipiente cosmético.