

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 409**

51 Int. Cl.:  
**C07H 19/01** (2006.01)  
**C08B 37/00** (2006.01)  
**A61K 31/70** (2006.01)  
**A61P 25/02** (2006.01)  
**A61P 25/14** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00969634 .5**  
96 Fecha de presentación: **18.10.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1226148**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.07.2002**

54 Título: **NUEVOS OLIGOSACÁRIDOS, SU PREPARACIÓN Y LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN.**

30 Prioridad:  
**22.10.1999 FR 9913182**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.03.2012**

73 Titular/es:  
**AVENTIS PHARMA S.A.**  
**20, AVENUE RAYMOND ARON**  
**92160 ANTONY, FR**

72 Inventor/es:  
**MOURIER, Pierre;**  
**PERRIN, Elisabeth;**  
**VISKOV, Christian;**  
**STUTZMANN, Jean-Marie y**  
**WAHL, Florence**Chez M. Karoby

74 Agente/Representante:  
**de Elizaburu Márquez, Alberto**

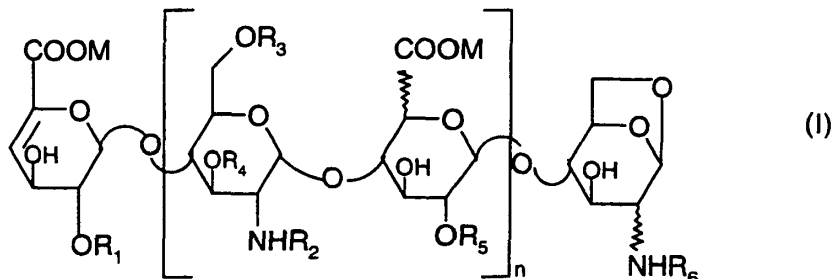
ES 2 376 409 T3

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**

Nuevos oligosacáridos, su preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

La presente invención se refiere a los oligosacáridos de fórmula:



5 sus mezclas, sus diaestereoisómeros, su procedimiento de preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

Han sido descritos disacáridos sulfatados que poseen en la extremidad reductora una estructura 1,6-anhidro por H.P. WESSEL, J. Carbohydrate Chemistry, 11(8), 1039-1052 (1992); no se menciona para éstos ninguna actividad farmacológica.

10 Han sido descritos igualmente trisacáridos sulfatados que comprenden un resto 1,6-anhidro en la patente EP84999 y por Y. ICHIKAWA et coll., Carbohydr. Res, 141, 273-282 (1985) como intermedios para la preparación de oligosacáridos superiores. Estos trisacáridos tienen una actividad anti-Xa débil.

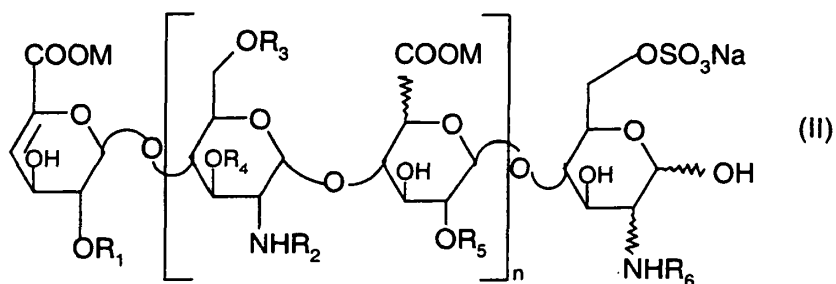
15 En la fórmula (I) n es un número entero de 0 a 25, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>M, R<sub>2</sub> y R<sub>6</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>M o COCH<sub>3</sub> y M es sodio, calcio, magnesio o potasio.

Estos oligosacáridos comprenden así un número par de sacáridos.

En la fórmula (I), R<sub>4</sub> es, de preferencia, un átomo de hidrógeno.

De forma preferencial, n es un número entero de 0 a 10 y, en particular, de 0 a 6 e incluso más particularmente de 1 a 6.

20 Los oligosacáridos de fórmula (I) pueden prepararse por acción de un hidróxido de metal alcalino o de amonio cuaternario sobre los oligosacáridos de fórmula :



25 en la que n es un número entero de 0 a 25, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>M, R<sub>2</sub> y R<sub>6</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>M o COCH<sub>3</sub> y M es sodio, calcio, magnesio o potasio o una mezcla de éstos.

Esta reacción se efectúa en medio acuoso, a una temperatura de 40 a 80°C, a un pH de 10 a 13.

Como hidróxido de metal alcalino que se puede utilizar, se puede citar la sosa, la potasa, el hidróxido de litio y el hidróxido de cesio.

Como hidróxido de amonio cuaternario que se puede utilizar, se puede citar el hidróxido de tetrabutilamonio.

La cantidad de hidróxido de metal alcalino o de amonio cuaternario debe ser suficiente para que el pH del medio de reacción permanezca estable durante toda la duración de la reacción. Así es necesario añadir en continuo a lo largo de la reacción el hidróxido de metal alcalino o amonio cuaternario.

5 De preferencia, el hidróxido de metal alcalino o de amonio cuaternario está en forma de disolución acuosa de 1 a 5%.

De forma preferente, la reacción se efectúa a una temperatura de 60 a 70°C.

Ventajosamente, el pH de reacción es de 11 a 12,5.

La reacción se para por acidificación del medio de reacción, por ejemplo por adición de resina ácido tal como la resina Amberlite IR120<sup>R</sup> (Fluka).

10 Los oligosacáridos de fórmula (I) se pueden purificar opcionalmente por cromatografía por permeación de gel de tipo poliacrilamida-agarosa tal como el comercializado con la marca Ultrogel ACA202<sup>R</sup> (Biosepra) según el protocolo descrito a continuación para la separación de los oligosacáridos intermedios de fórmula (II). Los oligosacáridos de fórmula (I) para los que n es 0 o 1 pueden también opcionalmente purificarse sobre columna de alúmina como una mezcla agua-etanol como eluyente.

15 Los oligosacáridos intermedios de fórmula (II) y sus mezclas se pueden obtener por separación por cromatografía sobre gel de una mezcla de oligosacáridos (III) obtenida por despolimerización enzimática de la heparina o despolimerización básica del éster bencílico de la heparina o de un éster bencílico de heparina de semisíntesis.

20 Esta cromatografía se efectúa sobre columnas rellenas de gel de tipo poliacrilamida-agarosa tal como el comercializado con la marca Ultrogel ACA202<sup>R</sup> (Biosepra). De preferencia, se utiliza una batería de columnas de gel poliacrilamida agarosa. El número de columnas utilizadas se adapta en función del volumen, del gel y de los oligosacáridos que se van a separar. La mezcla se eluye con una disolución que contiene un tampón fosfato y cloruro de sodio. De preferencia, la disolución tampón fosfato es una disolución de 0,02 mol/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7) que contiene 0,1 mol/l de cloruro de sodio. La detección de las diferentes fracciones se realiza por espectrometría UV (254 nm) e iónica (IBF). Las fracciones así obtenidas se pueden purificar opcionalmente por  
25 cromatografía SAX (intercambio aniónico fuerte, del inglés strong anion exchange) según los métodos conocidos por el experto en la materia y particularmente según los métodos descritos por K.G. Rice et R.J Linhardt, Carbohydrate Research 190, 219-233 (1989), A. Larnkjaer, S.H. Hansen et P.B. Ostergaard, Carbohydrate Research, 266, 37-52 (1995) y en la patente WO90/01501 (ejemplo 2). A continuación se liofilizan las fracciones y después se desalan en una columna rellena de gal tal como una columna de Séphadex G10<sup>R</sup> ( Pharmacia Biochemicals).

30 Cuando la purificación no se realiza por cromatografía SAX, los liofilizados pueden purificarse opcionalmente por precipitación simple o fraccionada según los métodos conocidos por el experto en la materia y particularmente según el método descrito en la patente FR2548672. De forma general, se opera según el siguiente protocolo :

35 La fracción liofilizada que se va a purificar se disuelve a 25°C en alrededor de diez volúmenes de agua destilada. Por adición de metanol o etanol, se hace precipitar el oligosacárido deseado controlando su enriquecimiento por cromatografía HPLC (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento). La adición de metanol o de etanol se determina en función de la pureza y del rendimiento deseado de dicho oligosacárido. Igualmente, esta operación se puede realizar en varias etapas sucesivas a partir de la disolución inicial de liofilizado. Para ello, se añade el agente insolubilizante (metanol o etanol) en pequeñas porciones y se aísla después de cada adición el precipitado obtenido.  
40 Los precipitados así obtenidos preparados se analizan por cromatografía HPLC. Según la pureza y el rendimiento deseado, se reúnen las fracciones adecuadas de precipitado.

Para los intermedios de fórmula (II) para los que n = 0, 1 o 2, es preferible partir de una mezcla (III) obtenida por despolimerización enzimática.

45 Esta despolimerización se efectúa por medio de heparinasa I (EC 4.2.2.7), en el seno de una disolución tampón fosfato de pH 7, en presencia de cloruro de sodio y de BSA (Albúmina de Suero Bovino), a una temperatura comprendida entre 10 y 18°C y, de preferencia 15°C, durante 8 a 10 días y, de preferencia, 9 días. La despolimerización se detiene por ejemplo por calentamiento del medio de reacción a 100°C durante 2 minutos y la mezcla se recupera por liofilización. Es preferible utilizar 7UI de heparinasa I por 25 g de heparina. La disolución tampón fosfato comprende generalmente 0,05 mol/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7) en presencia de 0,1 mol/l de cloruro de sodio. La concentración de BSA es generalmente de 2%.

50 Para los intermedios de fórmula (II) para los que n = 0, 1, 2, 3 o 4, es preferible partir de una mezcla (III) obtenida por despolimerización de un éster bencílico de la heparina.

El éster bencílico de la heparina se puede preparar según los métodos descritos en las patentes US5389618, EP40144, FR2548672. El nivel de esterificación estará comprendido de preferencia entre 50 y 100 %. De forma preferente, estará comprendido entre 70 y 90%.

La despolimerización se efectúa en medio acuoso, por medio de un hidróxido de metal alcalino (hidróxido de litio, sosa, potasa o hidróxido de cesio, por ejemplo) o de un hidróxido de amonio cuaternario (hidróxido de tetrabutilamonio, por ejemplo), de preferencia, a una molaridad comprendida entre 0,1 y 0,2 mol/l, a una temperatura comprendida entre 40 y 80°C, durante 5 a 120 minutos. En un modo preferido, se opera durante 5 a 15 minutos, a una temperatura comprendida entre 60 y 70°C, con una disolución de hidróxido de sodio de 0,15 mol/l. La reacción de despolimerización se detiene por neutralización por adición de un ácido tal como el ácido acético. Después de la adición de 10% en peso por volumen de acetato de sodio, la mezcla de oligosacáridos se precipita por adición de metanol, de preferencia 2 volúmenes por 1 volumen de medio de reacción y se filtra.

Según un aspecto preferido de la invención, la mezcla de oligosacáridos obtenida después de la despolimerización química, en forma de una disolución acuosa, se enriquece por ultrafiltración sobre membranas con un umbral de corte nominal apropiado (tipo Pellicon en celulosa regenerada comercializadas por Millipore); adaptándose el tipo de membrana en función del tipo de oligosacáridos enriquecidos que se van a recuperar. Para los oligosacáridos (II) para los que  $n = 0$ , se utilizará una membrana de umbral de corte nominal de 1 kDa, para los oligosacáridos (II) para los que  $n = 1$ , se utilizará una membrana 1 kDa o 3 kDa, para los oligosacáridos (II) para los que  $n = 2$ , se utilizará una membrana 3 kDa, para los oligosacáridos (II) para los que  $n = 3$  ó 4, se utilizará una membrana 5 kDa. Durante esta operación, se recupera el permeado y se rechaza el retenido. Así, la fracción de producto enriquecido puede representar de 50 a 10% de la mezcla de oligosacáridos inicial, conservando al menos 80% del oligosacárido deseado.

Para los intermedios de fórmula (II) para los que  $n = 0$  a 25, es preferible partir de una mezcla (III) obtenida por despolimerización de un éster bencílico de polisacárido sulfatado de semisíntesis. El éster bencílico de polisacárido sulfatado de semisíntesis se prepara a partir de polisacáridos sulfatados de semisíntesis obtenidos a partir del polisacárido K5 y según los métodos descritos en las patentes WO94/29352 y WO96/14425. Las condiciones de esterificación, de despolimerización y de recuperación son las mismas que las descritas anteriormente para el éster bencílico de la heparina.

En todos los procedimientos anteriores, la heparina inicial puede ser de origen porcino, ovino, caprino o bovino y puede provenir de mucosidad, pulmones o piel de los animales. De preferencia, se utiliza una heparina de mucosidad porcina, ovina o de pulmones de vaca, e incluso más preferentemente de mucosidad porcina.

Los oligosacáridos de fórmula (I) presentan propiedades anti-inflamatorias y se pueden así utilizar para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a un proceso inflamatorio que implica la producción de sustancias citotóxicas tal como el monóxido de nitrógeno (NO) cuya forma inducible es liberada particularmente por los neutrófilos o los macrófagos cuando éstos migran y son activados a nivel de un tejido. La activación, la migración, la adhesión y la infiltración de los neutrófilos se produce a nivel de las zonas tisulares isquémicas como consecuencia de una oclusión o de un espasmo de una arteria que vasculariza este tejido. Estas isquemias pueden producirse bien a nivel cerebral (accidente vascular cerebral), bien a nivel del miocardio (infarto de miocardio), bien a nivel de los miembros inferiores (isquemias denominadas periféricas). Los oligosacáridos de fórmula (I) pueden así utilizarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas para las que la inflamación cerebral juega un papel deletéreo que puede conducir a la muerte entre las que se pueden citar las isquemias cerebrales, las isquemias cardíacas (infarto de miocardio), las isquemias periféricas, los traumatismos del sistema nervioso central y particularmente los traumatismos craneales, espinales y craneo-espinales, la esclerosis múltiple, los dolores neuropáticos y las neuropatías periféricas, las enfermedades de la neurona motora, entre las que se encuentra la esclerosis lateral amiotrófica, el neuro-sida, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la Corea de Huntington y algunas formas de osteoartritis, particularmente de localización articular.

La actividad anti-inflamatoria de estos productos se ha demostrado in vivo en el ensayo de producción de NOx (nitrito y nitrato) inducido por un lipopolisacárido (LPS) proveniente de E. Coli según el protocolo descrito por M. YAMASHITA et coll., Eur. J. Pharmacol, 338, 2, 151-158 (1997) ou J.E. SHELLITO et coll. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 13, 1, 45-53 (1995).

Se inyecta, a ratones CD1 machos (Charles River, 25-35g), a T0 por vía intravenosa bolo de 0,5 mg/kg del oligosacárido, a T+15 minutos, por vía subcutánea 1 ó 2 mg/kg del oligosacárido. A T+30 minutos, se administran 100 mg/kg de lipopolisacárido (LPS) proveniente de E. Coli (Sigma L3129, serotipo 0127:B8). A T+3 horas se inyecta de nuevo por vía subcutánea 1 o 2 mg/kg del oligosacárido. A T+5 horas 30 minutos, se recupera una muestra de sangre por punción en el ojo y se determinan las concentraciones de NOx (nitrito y nitrato) en el plasma con el método colorimétrico de Griess después de reducción del nitrato con nitrato reductasa de la siguiente manera : Se mezclan 12  $\mu$ l de la muestra de plasma con 88  $\mu$ l de agua desionizada y se incuban en la oscuridad 1 hora a temperatura ambiente con 40  $\mu$ l de tampón fosfato (0,31 M, pH 7,5), 20  $\mu$ l de  $\beta$ -NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) (0,86mM), 20  $\mu$ l de FDA (flavina adenina dinucleótido) (0,11 mM) y 20  $\mu$ l de nitrato reductasa (2U/ml) (Boehringer Mannheim). Se añaden 10  $\mu$ l de ZnSO<sub>4</sub> (1M) para precipitar las proteínas y después de la mezcla se centrifugan las muestras a 20000g durante 5 minutos. Finalmente, 50  $\mu$ l del sobrenadante se incuban 10 minutos a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l del reactivo de Griess (sulfanilamida al 1 % en una mezcla de ácido fosfórico/naftietilendiamina al 0,1% en agua desionizada (V/V)). Las densidades ópticas se leen a 540 nm con un espectrofotómetro en microplacas; determinándose cada punto 2 veces. Se utilizan KNO<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub> como patrones para el método colorimétrico.

En este ensayo, los oligosacáridos según la invención inhiben en más de 50 % la formación de NOx.

Entre los oligosacáridos de fórmula (I) preferidos, se pueden citar particularmente los oligosacáridos para los que :

- n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio y la mezcla de sus diastereoisómeros
- n es igual a 1, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio y la mezcla de sus diastereoisómeros
- n es igual a 2, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio y la mezcla de sus diastereoisómeros
- n es igual a 2, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>5</sub> representa un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio y la mezcla de sus diastereoisómeros (derivado 1,6 anhidro ΔIs-Is-Is).

Los siguientes ejemplos son representativos de la preparación de los oligosacáridos de fórmula (I) y de los intermedios.

En estos ejemplos los significados de las abreviaturas son los siguientes :

ΔIs : (ácido 4-deoxi-2-O-sulfo-α-L-treo-hex-enopiranosilurónico)-(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopiranososa, sal de tetrasodio o bien ΔUAp2S-(1→4)-α-D-GlcNp2S6S

Is : (ácido 2-sulfo-α-L-idopiranosilurónico)-(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopiranososa, sal de tetrasodio o bien α-L-IdoAp2S- (1→4)-α-D-GlcNp2S6S

Is : (ácido α-L-idopiranosilurónico)-(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopiranososa, sal de trisodio o bien α-L-IdoAp- (1→4)-α-D-GlcNp2S6S

IIIs : (ácido 2-sulfo-α-L-idopiranosilurónico)-(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-α-D-glucopiranososa, sal de trisodio o bien α-L-IdoAp2S- (1→4)-α-D-GlcNp2S

IdoAp : ácido idopiranosilurónico

GlcNp : 2-deoxi-2-aminoglucopiranososa

ΔUap : ácido 4-deoxi-α-L-treo-hex-enopiranosilurónico

S : sulfato

## EJEMPLOS DE PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS DE FÓRMULA (II)

### EJEMPLO A - preparación de los oligosacáridos de fórmula (II) para los que n=0, 1 y 2 por despolimerización enzimática y separación

Se disuelven 25 g de heparina en 250 ml de una disolución tampón fosfato que contiene 0,05 mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 7), 0,2 mol/l de cloruro de sodio y 2 % de BSA (Albúmina de Suero Bovino). Se introducen en la mezcla 7 UI de heparinasa I (EC 4.2.2.7) y la disolución obtenida se enfría a 15°C, después se mantiene a esta temperatura durante toda la duración de la reacción de despolimerización. El avance de la reacción se sigue con extracciones escalonadas de alícuotas y que se analizan por cromatografía sobre permeación de gel. Al cabo de 9 días, la reacción enzimática se detiene calentando el medio de reacción a 100°C durante dos minutos. A continuación se liofiliza la mezcla enfriada. Así se obtiene una mezcla de oligosacáridos (III).

A continuación la mezcla de oligosacáridos (III) obtenida se cromatografía según el siguiente método : La cromatografía se efectúa sobre columnas rellenas de gel de poliacrilamida-agarosa conocido con la denominación Ultrogel ACA 202 y la mezcla se eluye con una disolución que contiene un tampón fosfato (0,02 mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH = 7 y 0,1 mol/l de cloruro de sodio. La detección se realiza en espectrometría UV (254 nm) e iónica (IBF). Los productos pueden purificarse opcionalmente por cromatografía SAX (intercambio aniónico fuerte) o por precipitación fraccionada según el método descrito en la patente FR 2548672. Las fracciones de producto recuperado se liofilizan, después se desalan sobre una columna rellena de gel sephadex G10<sup>R</sup> (Pharmacia Biochemicals).

Por este método, se obtienen 3 g de disacárido Is, 1100 mg de una mezcla de hexasacárido que contiene típicamente 55 % de derivado ΔIs-Is-Is , 35 % de ΔIs-Is-Is y 10 % de ΔIs-Is-IIIIs. Esta última mezcla se puede purificar según los métodos conocidos por el experto en la materia para separar cada uno de los constituyentes o se puede utilizar tal cual para la transformación en derivados 1,6 anhidro de fórmula (I). Debe señalarse que durante esta transformación, el hexasacárido ΔIs-Is-IIIIs no puede conducir a la formación de compuestos de fórmula (I).

**EJEMPLO B - preparación de los oligosacáridos de fórmula (II) para los que n=0, 1, 2, 3 o 4 por despolimerización del éster bencílico de heparina y separación****a - Preparación del éster bencílico de la heparina**

El éster bencílico de la heparina se prepara según el ejemplo 3 de la patente de EE.UU. nº 5.389.618.

**5 b- Despolimerización**

Se disuelven 100 g de éster bencílico de la heparina en 1,9 l de agua desmineralizada. La mezcla se lleva a 60°C con agitación. Después de la obtención de una disolución homogénea, se introducen en una sola vez aproximadamente 35 ml de una disolución de hidróxido de sodio al 23 %. Después de 10 minutos de reacción, a continuación se enfría la disolución y se neutraliza con 80 ml de una disolución de ácido acético aproximadamente 2 N. A esta disolución, se añade acetato de sodio al 10 % en peso/volumen. La mezcla de oligosacáridos se precipita por adición de aproximadamente 2 volúmenes de metanol. El precipitado se aísla por filtración, se lava con metanol dos veces y después se seca a presión reducida a 50°C. Después de secado se obtienen 73,8 g de una mezcla de oligosacáridos (II).

**c- Enriquecimiento de oligosacárido para el que n = 1**

15 Se disuelven 30 g de la mezcla de oligosacáridos obtenida anteriormente en aproximadamente 35 volúmenes de agua. Esta disolución se ultrafiltra sobre una membrana 3 kDa (Pellicon). Cuando se han retirado 600 ml de permedo, se diluye en retenido con 500 ml de agua. La operación se prosigue hasta que se retiran 450 ml de permeado adicionales. Se reúnen las dos fracciones de permeado, después se concentran a sequedad a presión reducida. Se obtienen 6,1 g de un sólido blanco amarillento. El análisis del sólido por cromatografía de permeación sobre gel indica que contiene aproximadamente 30 % de oligosacárido de fórmula (II) para el que n=1.

**d - Fraccionamiento de las mezclas de oligosacáridos ultrafiltradas**

La mezcla enriquecida se fracciona sobre columnas rellenas con gel de poli(acrilamida-agarosa) conocido con la denominación Ultrogel ACA 202 (se utilizan 4 columnas en serie de un diámetro de 10 cm y de una altura de 50 cm). Se disuelven 5g de la mezcla enriquecida por ultrafiltración en 25 ml de agua, después se eluyen con una disolución 25 0,2 mol/l de cloruro de sodio a la velocidad de 5 ml/min. Se recogen en la parte baja de la columna fracciones de 25 ml. La detección de los productos se realiza en espectrometría UV (254 nm) e iónica (IBF). Se recuperan las fracciones de producto para el que n = 1, se liofilizan y después se desalan sobre una columna rellena de gel Sephadex G 10. Después de la liofilización, se obtiene 1 g de tetrasacárido que contiene típicamente 70 % de derivado  $\Delta$ Is-Is de fórmula II ( $R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 = SO_3Na$ ;  $R_4 = H$  y  $M = Na$ ). El derivado  $\Delta$ Is-Is se puede 30 opcionalmente purificar por cromatografía SAX (intercambio aniónico fuerte) o según un aspecto preferente por precipitación fraccionada según el método descrito en la patente FR 2548672.

**EJEMPLO 1**

En un reactor mantenido a 66°C, se introducen 5 ml de una disolución de hidróxido de sodio a 0,0063 mol/l. Se mide entonces el pH de la disolución y se toma como valor diana (pH = 11,35). Con agitación, se añaden de una vez 35 30 mg del oligosacárido de fórmula (II) para el que n es igual a 0,  $R_1$  y  $R_6$  representan un radical  $SO_3Na$  y M es sodio. Entonces se regula el pH y se mantiene a pH 11,35 por adición continua de una disolución de hidróxido de sodio a 0,5 mol/l. Después de 10 horas, se detiene la adición de hidróxido de sodio y la mezcla de reacción se enfría a 25°C. El pH de la disolución se lleva entonces entre 6 y 7 por adición de resina Amberlite IR120. La mezcla se filtra sobre una membrana Whatman GF/B, después se concentra a sequedad a presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura próxima a 25°C. El producto se recoge con 0,5 ml de agua destilada, después se liofiliza. Se obtienen así 29 mg de una mezcla de diastereoisómeros del oligosacárido de fórmula (I) para el que n es igual a 0,  $R_1$  y  $R_6$  representan un radical  $SO_3Na$  y M es sodio [(ácido 4-deoxi-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-treo-hex-4-enopiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfoamino- $\beta$ -D-mannopiranososa, sal de trisodio) : Espectro protón en  $D_2O$ , 400MHz, T=298K,  $\delta$  en ppm: 3,15 (1H, s, H2), 3,75 (2H, m, H6 et H3), 3,88 (1H, m, H4), 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6), 4,22 (1H, t, J=5Hz, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,75 (1H, m, H5), 5,53 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, J=6 y 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4'); (ácido 4-deoxi-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-treo-hex-4-enopiranosilurónico-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfoamino- $\beta$ -D-glucopiranososa, sal de trisodio) : Espectro protón en  $D_2O$ , 400MHz, T=298K,  $\delta$  en ppm: 3,34 (1H, dd, J=7 et 2Hz, H2), 3,72 (1H, t, J=8Hz, H6), 3,90 (1H, m, H3), 4,03 (1H, s, H4), 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6), 4,23 (1H, t, J=5Hz, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,78 (1H, m, H5), 5,50 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, J=6 y 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4')].

**50 EJEMPLO 2**

En un reactor mantenido a 62°C, se introducen 33,3 ml de una disolución de hidróxido de sodio a 0,0063 mol/l. Se mide entonces el pH de la disolución y se toma como valor diana (pH = 11,15). Con agitación, se añaden de una vez 200 mg del oligosacárido de fórmula (II) para el que n es igual a 1,  $R_1, R_2, R_3, R_5$  y  $R_6$  representan un radical  $SO_3Na$ ,  $R_4$  representa un átomo de hidrógeno y M es sodio. Entonces se regula el pH y se mantiene a pH 11,15 por adición continua de una disolución de hidróxido de sodio a 0,5 mol/l. Después de 12 horas, se detiene la adición de hidróxido de sodio y la mezcla de reacción se enfría a 25°C. El pH de la disolución se lleva entonces entre 6 y 7 por

adición de resina Amberlite IR120. La mezcla se filtra sobre una membrana Whatman GF/B, después se concentra a sequedad a presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura próxima a 25°C. El producto se recoge con 3 ml de agua destilada, después se liofiliza. Se obtienen así 230 mg del oligosacárido de fórmula (I) para el que n es igual a 1, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio, en forma de una  
 5 mezcla de los diastereoisómeros [(ácido 4-deoxi-2-O-sulfo-α-L-treo-hex-4-enopiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-ácido 2-O-sulfo-α-L-idopiranosilurónico -(1→4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfoamino-β-D-mannopiranososa, sal de heptasodio): Espectro protón en D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2), 3,25 (1H, m, H2"), 3,60 (1H, m, H3"), entre 3,70 y 4,70 (14H, masivo, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4"/H5"/H6", H2'''/H3'''), 4,75 (1H, m, H5), entre 5,20 et 5,40 (2H, m, H1' et H1"), 5,45 (1H, m, H1'''), 5,56 (1H, m, H1), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H4); (ácido 4-deoxi-2-O-sulfo-α-L-treo-hex-4-enopiranosilurónico -(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopyranosyl-(1→4) ácido -2-O-sulfo-α-L-idopiranosilurónico -(1→4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfoamino-β-D-glucopiranososa, sal de heptasodio) : Espectro protón en D<sub>2</sub>O, 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,25 (1H, m, H2"), 3,42 (1H, dd, J=4 et 1Hz, H2), 3,60 (1H, m, H3"), entre 3,70 y 4,70 (14H, masivo, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4"/H5"/H6", H2'''/H3'''), 4,75 (1H, m, H5), entre 5,20 y 5,40 (2H, m, H1' y H1''), 5,45 (1H, m, H1'''), 5,52 (1H, m, H1), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H4)].

### EJEMPLO 3

En un reactor mantenido a 62°C, se introducen 16,7 ml de una disolución de hidróxido de sodio a 0,0063 mol/l. Se mide entonces el pH de la disolución y se toma como valor diana (pH = 11,7). Con agitación, se añaden de una vez  
 20 100 mg del oligosacárido de fórmula (II) para el que n es igual a 2, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio. Entonces se regula el pH y se mantiene a pH 11,7 por adición continua de una disolución de hidróxido de sodio a 0,5 mol/l. Después de 10 horas, se detiene la adición de hidróxido de sodio y la mezcla de reacción se enfría a 25°C. El pH de la disolución se lleva entonces entre 6 y 7 por adición de resina Amberlite IR120. La mezcla se filtra sobre una membrana Whatman GF/B, después se concentra a sequedad a presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura próxima a 25°C. El producto se recoge con 3 ml de agua destilada, después se liofiliza. Se obtienen así 108 mg del oligosacárido de fórmula (I) para el que n es igual a 2, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio, en forma de una  
 25 mezcla de diastereoisómeros. Se denominan de A a F los azúcares constitutivos de los hexasacáridos, siendo A el resto 1,6-anhidro y F el resto ácido urónico insaturado. [(ácido 4-deoxi-2-O-sulfo-α-L-treo-hex-4-enopiranosilurónico -(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)- ácido 2-O-sulfo-α-L-idopiranosilurónico -(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-ácido 2-O-sulfo-α-L-idopiranosilurónico-(1→4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfoamino-β-D-mannopiranososa, sal de undecasodio) : Espectro protón en D<sub>2</sub>O, 600MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2(A)), 3,25 (2H, m, H2(C+E)), 3,60 (2H, m, H3(C+E)), entre 3,65 y 4,50 (19H, masivo, H2(B+D)/H3(A+B+D+F)/H4(A+B+C+D+E)/HS(C+E)/H6(A+C+E)), 4,60 (1H, s, H2(F)), 4,80 (3H, m, H5(A+B+D)), 5,18 (1H, s, H1(D)), 5,30 (1H, s, H1(B)), 5,34 (1H, d, H1(C)), 5,36 (1H, d, H1(E)), 5,46 (1H, s, H1(F)), 5,57 (1H, s, H1(A)),  
 30 5,95 (1H, d, J=5Hz, H4(F)) ; (ácido 4-deoxi-2-O-sulfo-α-L-treo-hex-4-enopiranosilurónico-(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-ácido 2-O-sulfo-α-L-idopiranosilurónico -(1→4)-2-deoxi-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-ácido 2-O-sulfo-α-L-idopiranosilurónico-(1→4)-1,6-anhidro-2-deoxi-2-sulfoamino-β-D-glucopiranososa, sal de undecasodio) : Espectro protón en D<sub>2</sub>O, 600MHz, T=298K, δ en ppm: 3,25 (2H, m, H2(C+E)), 3,42 (1H, m, H2(A)), 3,60 (2H, m, H3(C+E)), entre 3,65 y 4,50 (19H, masivo, H2(B+D)/H3(A+B+D+F)/H4(A+B+C+D+E)/H5(C+E)/H6(A+C+E)), 4,60 (1H, s, H2(F)), 4,80 (3H, m, H5(A+B+D)), 5,18 (1H, s, H1(D)), 5,31 (1H, s, H1(B)), 5,34 (1H, d, H1(C)), 5,36 (1H, d, H1(E)), 5,46 (1H, s, H1(F)), 5,52 (1H, s, H1(A)), 5,95 (1H, d, J=5Hz, H4(F))].

### EJEMPLO 4

En un reactor mantenido a 62°C, se introducen 4 ml de una disolución de hidróxido de sodio a 0,0316 mol/l. Se mide entonces el pH de la disolución y se toma como valor diana (pH = 11,8). Con agitación, se añaden de una vez  
 45 100,8 mg de una mezcla de oligosacáridos de fórmula (II) para el que n es igual a 2 que comprende 55 % de derivado ΔIs-Is-Is (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio), 35 % de ΔIs-Is-Is (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, et R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>5</sub> representa bien un radical SO<sub>3</sub>Na o un átomo de hidrógeno, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio) y 10 % de ΔIs-Is-Is (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio, estando reemplazada con un hidrógeno la  
 50 función SO<sub>3</sub>M del carbono C6). Entonces se regula el pH y se mantiene a pH 11,8 por adición continua de una disolución de hidróxido de sodio a 0,5 mol/l. Después de 11 horas, se detiene la adición de hidróxido de sodio y la mezcla de reacción se enfría a 25°C. El pH de la disolución se lleva entonces entre 6 y 7 por adición de resina Amberlite IR120. La mezcla se filtra sobre una membrana Whatman GF/B, después se concentra a sequedad a presión reducida (2,7 kPa), a una temperatura próxima a 25°C. El producto se recoge con 1,5 ml de agua destilada, después se liofiliza. Se obtienen así 110 mg de una mezcla de oligosacáridos de fórmula (I) para el que n es igual a 2, que contiene particularmente el derivado 1,6 anhidro ΔIs-Is-Is (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio) y el derivado 1,6 anhidro ΔIs-Is-Is (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>5</sub> representa bien un radical SO<sub>3</sub>Na o un átomo de hidrógeno, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno  
 55 y M es sodio). El análisis HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) en modo par de iones permite seguir la transformación en derivados de fórmula (I). En este caso, la dosificación HPLC muestra que la transformación se realiza para los derivados ΔIs-Is-Is, ΔIs-Is-Is.

**EJEMPLO 5**

En un reactor mantenido a 66°C, se introducen 8,6 ml de una disolución de hidróxido de litio a 0,025 mol/l. Se mide entonces el pH de la disolución y se toma como valor diana (pH = 11,68). Con agitación, se añaden de una vez 50 mg del oligosacárido de fórmula (II) para el que n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio. Entonces se regula el pH y se mantiene a pH 11,68 por adición continua de una disolución de hidróxido de litio a 0,466 mol/l. Después de 8 horas, se detiene la adición de hidróxido de litio y la mezcla de reacción se enfría a 25°C. El análisis HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) en modo par de iones permite seguir la transformación en derivado de fórmula (I) para el que n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio o litio. En este caso, la dosificación HPLC muestra que la transformación se realiza a 100%. El rendimiento por calibrado externo es de 81,2%.

**EJEMPLO 6**

En un reactor mantenido a 66°C, se introducen 8,3 ml de una disolución de hidróxido de potasio a 0,0063 mol/l. Se mide entonces el pH de la disolución y se toma como valor diana (pH = 11,1). Con agitación, se añaden de una vez 50 mg del oligosacárido de fórmula (II) para el que n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio. Entonces se regula el pH y se mantiene a pH 11,1 por adición continua de una disolución de hidróxido de potasio a 0,515 mol/l. Después de 24 horas, se detiene la adición de hidróxido de potasio y la mezcla de reacción se enfría a 25°C. El análisis HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) en modo par de iones permite seguir la transformación en derivado de fórmula (I) para el que n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio o potasio. En este caso, la dosificación HPLC muestra que la transformación se realiza a 100%. El rendimiento por calibrado externo es de 75,6%.

**EJEMPLO 7**

En un reactor mantenido a 66°C, se introducen 8,3 ml de una disolución de hidróxido de cesio a 0,0063 mol/l. Se mide entonces el pH de la disolución y se toma como valor diana (pH = 10,75). Con agitación, se añaden de una vez 50 mg del oligosacárido de fórmula (II) para el que n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio. Entonces se regula el pH y se mantiene a pH 10,75 por adición continua de una disolución de hidróxido de cesio a 0,476 mol/l. Después de 20 horas, se detiene la adición de hidróxido de cesio y la mezcla de reacción se enfría a 25°C. El análisis HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) en modo par de iones permite seguir la transformación en derivado de fórmula (I) para el que n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio o cesio. En este caso, la dosificación HPLC muestra que la transformación se realiza a 90,3%. El rendimiento por calibrado externo es de 73%.

**EJEMPLO 8**

En un reactor mantenido a 66°C, se introducen 8,3 ml de una disolución de hidróxido de tetrabutilamonio a 0,0063 mol/l. Se mide entonces el pH de la disolución y se toma como valor diana (pH = 10,95). Con agitación, se añaden de una vez 50 mg del oligosacárido de fórmula (II) para el que n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio. Entonces se regula el pH y se mantiene a pH 10,95 por adición continua de una disolución de hidróxido de tetrabutilamonio a 0,521 mol/l. Después de 16 horas, se detiene la adición de hidróxido de cesio y la mezcla de reacción se enfría a 25°C. El análisis HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) en modo par de iones permite seguir la transformación en derivado de fórmula (I) para el que n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio o tetrabutilamonio. En este caso, la dosificación HPLC muestra que la transformación se realiza a 96,7%. El rendimiento por calibrado externo es de 65%.

Los medicamentos según la invención comprenden como principio activo al menos un oligosacárido de fórmula (I) o una mezcla de oligosacáridos de fórmula (I), en forma de una composición en la que está asociado a cualquier otro producto farmacéuticamente compatible, que puede ser inerte o fisiológicamente activo. Los medicamentos según la invención pueden emplearse por vía intravenosa, sub-cutánea, oral, rectal, tópica o pulmonar (inhalación).

Las composiciones estériles para administración intravenosa o subcutánea, son generalmente soluciones acuosas. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, en particular agentes humectantes, isotonizantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. La esterilización puede realizarse de diversas formas, por ejemplo por filtración esterilizante, incorporando a la composición agentes esterilizantes, por irradiación. También se pueden preparar en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en el momento del uso en agua estéril o en cualquier otro medio estéril inyectable.

Como composiciones sólidas para administración oral, se pueden utilizar comprimidos, píldoras, polvos (cápsulas de gelatina, sellos) o gránulos. En estas composiciones, el principio activo se mezcla con uno varios diluyentes inertes, tales como el almidón, celulosa, sacarosa, lactosa o sílice, en corriente de argón. Estas composiciones pueden comprender igualmente otras sustancias distintas de los diluyentes, por ejemplo uno o varios lubricantes tales como el estearato de magnesio o el talco, un agente que favorece la absorción oral, un colorante, un recubrimiento (grageados) o un barniz.



Como composiciones líquidas para administración oral, se pueden utilizar disoluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables conteniendo diluyentes inertes tales como agua, etanol, glicerol, aceites vegetales o aceite de parafina. Estas composiciones pueden comprender otras sustancias aparte de los diluyentes, por ejemplo productos humectantes, edulcorantes, espesantes, aromatizantes o estabilizantes.

- 5 Las composiciones para administración rectal son los supositorios o las cápsulas rectales que contienen, además del producto activo, excipientes tales como manteca de cacao, glicéridos semisintéticos o polietilenglicoles.

Las composiciones para administración tópica pueden ser por ejemplo cremas, lociones, colirios, colutorios, gotas nasales o aerosoles.

- 10 Las dosis dependen del efecto buscado, de la duración del tratamiento y de la vía de administración utilizada; están comprendidas generalmente entre 0,5 mg y 10 mg por kg por día por vía subcutánea, bien 3 a 60 mg por día para un adulto de 60 kg.

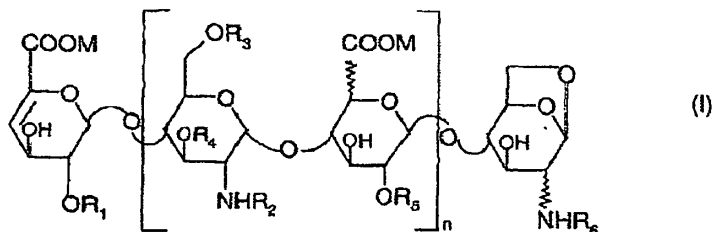
De forma general, el médico determinará la posología apropiada en función de la edad, el peso y los demás factores propios del sujeto que se va a tratar.

- 15 Se describe igualmente un método de prevención o de tratamiento de enfermedades asociadas a un proceso inflamatorio que implica la producción de sustancias citotóxicas tales como el óxido nítrico (NO). Los oligosacáridos de fórmula (I) también se pueden utilizar para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas para las que la inflamación cerebral juega un papel deletéreo que puede conducir a la muerte, entre las que se pueden citar las isquemias del sistema nervioso central, las isquemias cerebrales, las isquemias de la retina y de la cóclea, las isquemias cardíacas (infarto de miocardio), las isquemias periféricas, los traumatismos del sistema nervioso central y particularmente los traumatismos craneales, espinales y cráneo-espinales, los traumatismos de la retina y de la cóclea, la esclerosis múltiple, los dolores neuropáticos y las neuropatías periféricas, las enfermedades de la neurona motora, entre las que se encuentra la esclerosis lateral amiotrófica, el neuro-sida, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la Corea de Huntington y algunas formas de osteoartritis, particularmente de localización articular.

25

REIVINDICACIONES

1. Oligosacáridos de fórmula :



5 en la que n es un número entero de 0 a 25, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>M, R<sub>2</sub> y R<sub>6</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>M o COCH<sub>3</sub> y M es sodio, calcio, magnesio o potasio.

2. Oligosacáridos de fórmula (I) según la reivindicación 1 para los que R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno.

3. Oligosacáridos de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 o 2 para los que n es 0 o un número entero de 1 a 10.

10 4. Oligosacáridos de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 o 2 para los que n es 0 o un número entero de 1 a 6.

5. Oligosacáridos de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 o 2 para los que n es un número entero de 1 a 6.

6. Oligosacáridos de fórmula (I) según la reivindicación 1 en la que n es igual a 0.

15 7. Oligosacáridos de fórmula (I) según la reivindicación 1 en la que n es igual a 1.

8. Oligosacáridos de fórmula (I) según la reivindicación 1 en la que :

- n es igual a 0, R<sub>1</sub> y R<sub>6</sub> representan un radical SO<sub>3</sub>Na y M es sodio y la mezcla de sus diastereoisómeros

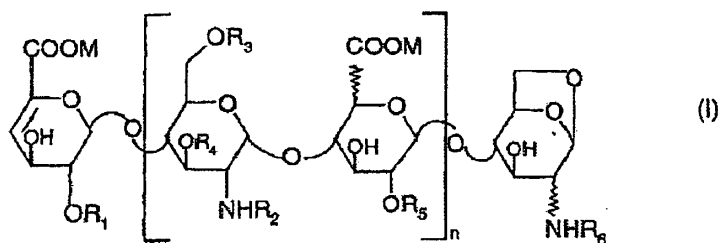
- n es igual a 1, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio y la mezcla de sus diastereoisómeros

20 - n es igual a 2, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio y la mezcla de sus diastereoisómeros

- n es igual a 2, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, representan un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>5</sub> representa un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> representa un átomo de hidrógeno y M es sodio y la mezcla de sus diaestereoisómeros (derivado 1,6 anhidro Δ1s-1s-1Is).

25 9. Oligosacáridos de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, opcionalmente purificados por cromatografía por permeación de gel de tipo poliacrilamida-agarosa.

10. Una composición farmacéutica que comprende un oligosacárido de fórmula :



30 o sus diaestereoisómeros, en la que n es 0 o un número entero de 1 a 25, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>M, R<sub>2</sub> y R<sub>6</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical SO<sub>3</sub>M o COCH<sub>3</sub> y M es sodio, calcio, magnesio o potasio o una mezcla de éstos.

11. Una composición farmacéutica que comprende un oligosacárido de fórmula (I) o sus diastereoisómeros según la reivindicación 10 en la que  $R_4$  representa un átomo de hidrógeno.

12. Una composición farmacéutica que comprende un oligosacárido de fórmula (I) o sus diastereoisómeros según la reivindicación 10 en la que  $n$  es 0 o un número entero de 1 a 10.

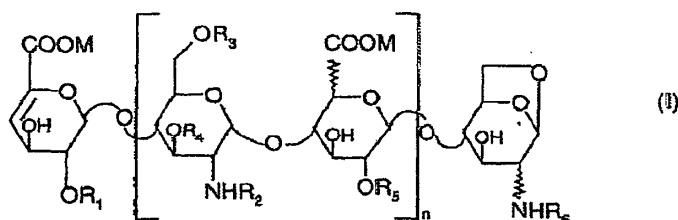
5 13. Una composición farmacéutica que comprende un oligosacárido de fórmula (I) o sus diastereoisómeros según la reivindicación 10 en la que  $n$  es igual a 0 o un número entero de 1 a 6.

14. Una composición farmacéutica que comprende un oligosacárido de fórmula (I) o sus diastereoisómeros según la reivindicación 10 en la que  $n$  es un número entero de 1 a 6.

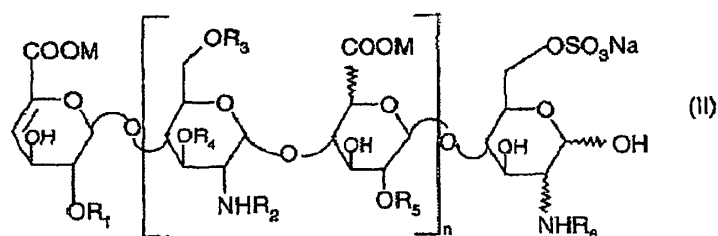
10 15. Una composición farmacéutica que comprende un oligosacárido de fórmula (I) o sus diastereoisómeros según la reivindicación 10 en la que  $n$  es igual a 0.

16. Una composición farmacéutica que comprende un oligosacárido de fórmula (I) o sus diastereoisómeros según la reivindicación 10 en la que  $n$  es igual a 1.

17. Procedimiento de preparación de oligosacáridos de fórmula (I)



15 o sus mezclas, en la que  $n$  es 0 o un número entero de 1 a 25,  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$ , idénticos o diferentes representan un átomo de hidrógeno o un radical  $SO_3M$ ,  $R_2$  y  $R_6$ , idénticos o diferentes representan un átomo de hidrógeno o un radical  $SO_3M$  o  $COCH_3$  y  $M$  es sodio, calcio, magnesio o potasio, caracterizado por que se hace reaccionar un hidróxido de metal alcalino o de amonio cuaternario sobre los oligosacáridos de fórmula :



20 o una mezcla de éstos en la que  $n$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  y  $M$  don tal como se definen anteriormente.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado por que se efectúa la reacción en medio acuoso, a una temperatura de 40 a 80°C y a un pH de 10 a 13.

19. Procedimiento según la reivindicación 17 caracterizado por que se utiliza una disolución acuosa de 1 a 5% de hidróxido de metal alcalino o de amonio cuaternario.

25 20. Procedimiento según la reivindicación 17 caracterizado por que la reacción se efectúa a una temperatura de 60 a 70°C.

21. Procedimiento según la reivindicación 17 caracterizado por que el pH de reacción es de 11 a 12,5.

22. Procedimiento según la reivindicación 17 caracterizado por que el hidróxido de metal alcalino o de amonio cuaternario es sosa, potasa, hidróxido de litio, de cesio o hidróxido de tetrabutilamonio.

30 23. Procedimiento según la reivindicación 17 en el que se aíslan los oligosacáridos de fórmula (I) según la reivindicación 1 o sus mezclas.

35 24. Oligosacáridos de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 9 para utilización para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a un proceso inflamatorio que implica la producción de óxido nitrito (NO), elegidas entre las isquemias cerebrales, cardíacas o vasculares periféricas, las osteoartritis, los traumatismos del sistema nervioso central, los traumatismos craneales, espinales y cráneo-espinales, la esclerosis múltiple, los

dolores neuropáticos y las neuropatías periféricas, las enfermedades de la neurona motora, la esclerosis lateral amiotrófica, el neurosida, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la Corea de Huntington.

- 5 **25.** Composiciones según la reivindicación 10 a para utilización para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a un proceso inflamatorio que implica la producción de óxido nítrico (NO), elegidas entre las isquemias cerebrales, cardíacas o vasculares periféricas, las osteoartritis, los traumatismos del sistema nervioso central, los traumatismos craneales, espinales y cráneo-espinales, la esclerosis múltiple, los dolores neuropáticos y las neuropatías periféricas, las enfermedades de la neurona motora, la esclerosis lateral amiotrófica, el neurosida, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la Corea de Huntington.