

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 088**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/737** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**A61L 15/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05775263 .6**  
96 Fecha de presentación: **06.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1765366**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Uso de derivados de exopolisacáridos (EPS) despolimerizados sulfatados, como cicatrizantes**

30 Prioridad:  
**14.06.2004 FR 0406405**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.07.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR  
L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER)  
155, RUE JEAN-JACQUES ROUSSEAU  
92138 ISSY-LES-MOULINEAUX, FR y  
UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES - PARIS 5**

72 Inventor/es:  
**SENNI, Karim;  
GEUNICHE, Farida;  
YOUSFI, Miriam;  
FIORETTI, Florence;  
GODEAU, Gaston-Jacques;  
COLLIEC-JOUAULT, Sylvia;  
RATISKOL, Jacqueline;  
SINQUIN, Corinne;  
RAGUENES, Gérard;  
COURTOIS, Anthony y  
GUEZENNEC, Jean**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 385 088 T3

## DESCRIPCIÓN

Uso de derivados de exopolisacáridos (EPS) despolimerizados sulfatados, como cicatrizantes.

La presente invención se refiere al uso de derivados polisacáridicos obtenidos a partir de polisacáridos nativos de un tipo particular denominado exopolisacáridos (EPS), que son excretados por diversas cepas de bacterias marinas mesófilas procedentes del medio hidrotérmal profundo.

Más en particular, la presente invención se refiere a derivados polisacáridicos de baja masa molar y altamente sulfatados, susceptibles de obtenerse por despolimerización radicalar y sulfatación de los exopolisacáridos.

Se conocen ya polisacáridos altamente sulfatados y de baja masa molecular que no se derivan de exopolisacáridos bacterianos. Presentan propiedades interesantes, especialmente como sustancias terapéuticas. Por ejemplo, la heparina, polisacárido sulfatado, es el agente anticoagulante y antitrombótico más utilizado en la prevención y el tratamiento de la trombosis venosa. Las heparinas comercializadas se extraen actualmente de las mucosas intestinales del cerdo. Sin embargo, el uso de estas heparinas de origen animal presenta un riesgo de contaminación por agentes patógenos (por ejemplo el prión). Con el fin de reducir o evitar el riesgo de contaminación, la identificación de nuevos polisacáridos procedentes de orígenes distintos de los animales aparece como una vía de investigación particularmente prometedora.

Los polisacáridos procedentes de las bacterias, y más particularmente de las bacterias marinas, permiten responder a esta necesidad. El estudio y la explotación de los polisacáridos excretados por las bacterias marinas o exopolisacáridos se inscribe, por lo tanto en este eje de investigación, en particular para la concepción de nuevos principios activos o de análogos de moléculas ya existentes.

Un cribado de muestras procedentes del medio hidrotérmal de las profundidades de los océanos ha permitido aislar una gran variedad de cepas bacterianas mesófilas, capaces de producir EPS nativos a presión atmosférica y a temperatura ambiente.

Un pequeño número de EPS nativos ya ha sido objeto de registro de patentes y de publicaciones: por ejemplo, la patente europea EP 975 791 describe la cepa *Vibrio diabolicus*, el EPS HE 800 nativo y su uso como medicamento, en particular como agente retroviral, antitumoral y antitrombótico. En estado nativo, el EPS HE 800 de 800 000 g/mol no está sulfatado; está constituido aproximadamente por el 30% en peso de osamina, el 32% en peso de osas ácidas y el 1% en peso de osas neutras; su contenido en proteínas es próximo al 1% en peso. La solicitud de patente europea N° 1 296 695 describe el uso del EPS HE 800 en su forma nativa como material que facilita la cicatrización ósea (Zanchetta et al., *Calcif Tissue Int*, 2003, 72: 74-79).

Un segundo EPS nativo denominado GY 785 y producido por la bacteria *Alteromonas infernus* igualmente se ha identificado y descrito en la patente francesa FR 2.755.142. El EPS GY 785 nativo está constituido por una población heterogénea de cadenas polisacáridas de masa molecular media superior a  $10^6$  g/mol. El EPS GY 785 nativo está poco sulfatado (tasa de sulfato inferior al 10% en peso); está constituido del 57 % en peso de osas neutras (glucosa y galactosa mayoritariamente) y del 42% de osas ácidas (ácido glucurónico y ácido galacturónico); no comprende osaminas ni sustituyentes acetato, lactato, piruvato y succinato; su contenido de proteína es de aproximadamente un 4% en peso (Guezennec J., *Ind. Microb. Biotech.*, 2002, 29, 204-208).

Un tercer EPS nativo denominado ST 716 y producido por la bacteria *Alteromonas macleodii subsp. fijiensis* se ha identificado y descrito también en la patente europea EP 117125 (Rougeaux H et al., *Carbohydr. Res.*, 1998, 312: 53-59). El EPS ST 716 nativo está poco sulfatado (su tasa de sulfato es aproximadamente del 5% en peso); está constituido por el 40% en peso de osas neutras y el 40% en peso de osas ácidas; su contenido en proteínas es del 2 al 4% en peso.

Otros EPS nativos nuevos también han sido identificados y descritos en la bibliografía; especialmente el EPS HYD 721 producido por una *Pseudoalteromonas* (Rougeaux H et al., *Carbohydr Res.*, 1999, 315 : 273-285 y Raguene G. et al., 1997), el EPS HYD 657 (Cambon-Bonavita M et al., *J Applied Microbio.*, 2002, 93 : 310-315) y el EPS MS 907 (Raguene G et al., *Curr Microbiol*, 2003, 46 : 448-52).

La presente invención tiene como objeto derivados polisacáridicos sulfatados procedentes del tratamiento de EPS nativos excretados por cepas bacterianas mesófilas procedentes del medio hidrotermal profundo y con un interés farmacéutico, cosmético o de ingeniería tisular para su uso como agentes cicatrizantes. Los derivados polisacáridicos sulfatados de exopolisacáridos (EPS) nativos excretados por bacterias marinas mesófilas procedentes del medio hidrotermal profundo según la invención son susceptibles de obtenerse por el procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- Una etapa de despolimerización radicalar de dichos EPS nativos, para la obtención de derivados despolimerizados de baja masa molar, inferior o igual a 100.000 g/mol,
- Una etapa ulterior de sulfatación de derivados despolimerizados, eventualmente liofilizados, que comprende la adición de al menos un agente de sulfatación en una cantidad suficiente para obtener derivados

polisacarídicos sulfatados que presentan una tasa de sustitución en grupos sulfato comprendida entre el 10 y el 45% en peso respecto del peso total del derivado polisacarídico sulfatado, estando dicha etapa de sulfatación eventualmente seguida por una etapa de diálisis.

5 Durante la primera etapa de despolimerización, el EPS nativo se puede utilizar bajo una forma líquida, es decir tal como es excretado por las bacterias en el medio de cultivo. De preferencia, el medio de cultivo se centrifuga, y solo el sobrenadante que contiene el EPS nativo y desprovisto de restos bacterianos se conserva. El EPS nativo se puede recoger por cualquier técnica apropiada bien conocida por el experto en la técnica, en particular por ultrafiltración por membrana y, a continuación, ser eventualmente liofilizado tal cual o en forma de una sal de adición.

10 La etapa de despolimerización por vía radicalar del EPS nativo se realiza de preferencia mediante la adición de una solución de un agente oxidante a una mezcla de reacción que comprende el EPS nativo preferiblemente en presencia de un catalizador metálico. El agente oxidante se elige preferiblemente entre los peróxidos, en particular el peróxido de hidrógeno y los perácidos en particular el ácido peracético y ácido 3-cloroperbenzoico; Efectuándose preferiblemente la adición en continuo y con agitación durante un periodo comprendido entre 30 minutos y 10 horas. Manteniéndose preferiblemente la mezcla de reacción a un pH comprendido entre 6 y 8 mediante la adición continua de un agente alcalinizante tal como la sosa, a una temperatura comprendida entre 30 y 70°C aproximadamente durante toda la duración de la reacción de despolimerización radicalar.

Según un modo de realización particular de la presente invención, durante esta etapa el EPS nativo está presente en la mezcla de reacción a una concentración comprendida entre aproximadamente 2 y 10 mg/ml de mezcla de reacción.

20 Según otro modo de realización particular de la presente invención el agente oxidante es una solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que presenta preferiblemente una concentración comprendida entre 0,1% y 0,5% en peso aproximadamente, preferiblemente del orden de 0,1 a 0,2% en peso, y que se añade a un caudal comprendido entre, de V1/1000 a V1/10 ml/minuto, preferiblemente V1/50 y V1/500 ml/min. , muy preferiblemente del orden de V1/100 ml/minuto, siendo V1 el volumen del medio de reacción que contiene un exopolisacárido (EPS) marino al cual se añade una solución de peróxido de hidrógeno.

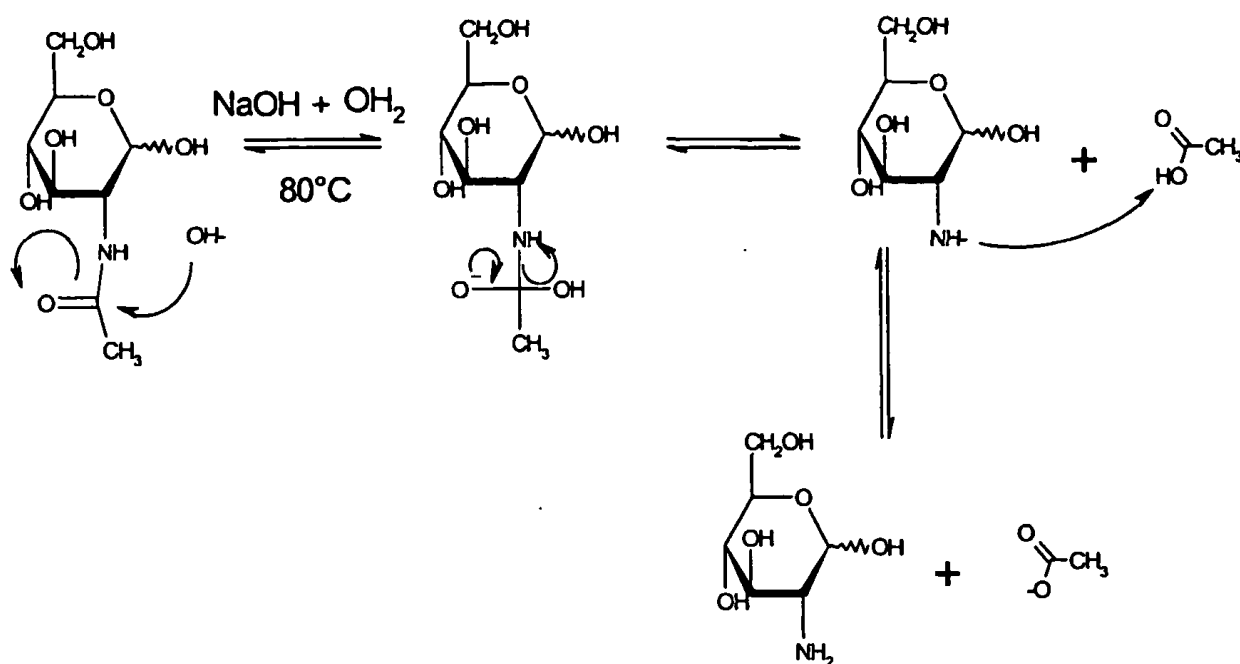
25 Los catalizadores metálicos utilizables en la etapa de despolimerización se eligen preferiblemente entre los iones  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Cr^{+++}$  y el anión  $Cr_2O_7^{2-}$  tales como se describen especialmente en la solicitud de patente EP-A-0.221.977. Según un modo de empleo particular de la presente invención, el catalizador metálico está presente en la mezcla de reacción a una concentración comprendida entre  $10^{-3}$  M y  $10^{-1}$  M aproximadamente, y aún más preferiblemente a una concentración comprendida entre 0,001 y 0,05 M aproximadamente.

30 El procedimiento de despolimerización radicalar según la invención, y tal como se ha descrito anteriormente, permite obtener en una sola etapa, sin fraccionamiento por cromatografía de exclusión estérica, y con un buen rendimiento, derivados polisacarídicos homogéneos de baja masa molar: Por "derivados polisacarídicos de baja masa molar" se entienden derivados de masa molar inferior o igual a 100.000 g/mol, preferiblemente comprendida entre 5.000 y 50.000 g/mol, y más preferiblemente inferior o igual a 25.000 g/mol. En el marco de la memoria de la presente invención, se entiende por "derivados homogéneos", derivados que, en cromatografía de exclusión estérica de alto rendimiento, presentan un solo pico principal que representa una población mayoritaria de cadenas polisacarídicas homogéneas en dimensión caracterizada por un índice de polidispersidad  $I(Mp/Mn) < 5$ , preferiblemente comprendido entre 1,5 y 4, más preferiblemente inferior o igual a 2 con  $MP$  = masa molar media ponderada y  $Mn$  = masa molecular media en número).

35 Cuando la reacción de despolimerización termina, según un modo de realización particular de la invención, el procedimiento comprende una etapa de reducción de los derivados polisacarídicos obtenidos, con la ayuda de un agente reductor para estabilizar las cadenas cuyos extremos reductores son muy reactivos y especialmente para evitar una hidrólisis de las cadenas por la reacción denominada de "peeling". La naturaleza de los agentes reductores utilizables con este fin no es crítica. Puede tratarse en particular del borohidruro de sodio.

40 El catalizador metálico utilizado para la despolimerización se puede eliminar después de la reacción de despolimerización, y en el modo de realización en el cual una etapa de reducción se efectúa, tras la reducción por cromatografía de intercambio de iones, preferiblemente una resina cambiadora débil de cationes previamente pasivada o por tratamiento con EDTA (Etileno Diamina Tetra Acético).

45 Según un modo de realización particular del procedimiento de la invención, previamente a la etapa de sulfatación, se procede a una etapa de N-desacetilación de los derivados polisacarídicos que comprenden hexosaminas N-acetiladas y obtenidos tras la etapa de despolimerización radicalar y/o tras la etapa de reducción. Esta etapa de N-desacetilación se realiza según un protocolo adaptado de Zou et al., (Carbohydr. Res., 1998, 309 : 297-301). Ventajosamente, la etapa de N-desacetilación se realiza por adición a la mezcla de reacción que comprende los derivados polisacarídicos, de una solución de borohidruro de sodio, con agitación. Cuando la temperatura de la mezcla de reacción alcanza aproximadamente 80°C, un agente alcalinizante, preferiblemente la sosa se añade al medio de reacción. El mecanismo de hidrólisis básica de un amido en medio básico, y preferiblemente en presencia de sosa se esquematiza a continuación:



Después de una hora de reacción, el medio de reacción se neutraliza por adición continua de ácido acético hasta la obtención de un pH de 5. Los derivados polisacáridicos obtenidos se pueden recoger por ultrafiltración por membrana y a continuación ser liofilizados.

- 5 Según un modo de realización particular, la etapa de N-desacetilización se aplica sobre los derivados polisacáridicos procedentes de la despolimerización de EPS nativos excretados por bacterias marinas mesófilas hidrotérmicas del género *vibrio*, preferiblemente HE 800. Los EPS nativos excretados por dichas bacterias del género *Vibrio* se caracterizan por que contienen hexasaminas N-acetiladas.

- 10 Los derivados polisacáridicos que resultan de la despolimerización, y/o de la reducción y/o de la N-desacetilación pueden, si fuese necesario, ser recogidos por cualquier técnica apropiada bien conocida por el experto en la técnica tal como por ejemplo por ultrafiltración por membrana, y eventualmente ser liofilizados tal cuales o en forma de una sal de adición con una base débil o fuerte, que se puede elegir entre la piridina, trietilamina, tributilamina, hidróxido de tetrabutilamonio y sosa. Esta sal liofilizada se puede preparar por ejemplo por elución de una solución acuosa de los derivados polisacáridicos a una concentración comprendida entre 1 y 8 mg/ml sobre una columna de resina cambiando de iones de manera tal como por ejemplo las vendidas bajo la denominación Dowex® por la sociedad Dow Chemical. El eluato se recoge mientras el pH permanece ácido., por ejemplo inferior a 5 y a continuación el pH se ajusta a aproximadamente 6,5 con la base deseada tal como se define anteriormente. Los derivados polisacáridicos en forma de una sal a continuación se ultrafiltran y liofilizan.

- 20 Los derivados polisacáridicos liofilizados, en forma de sal de adición o no, se disuelven preferiblemente en un disolvente anhidro al inicio de la etapa de sulfatación; este disolvente se elige preferiblemente entre el dimetilformamida (DMF), el dimetilsulfoxido (DMSO) y/o el formamida. La cantidad de derivados polisacáridicos presente en el seno del disolvente anhidro puede estar comprendida entre 1 y 10 mg/ml aproximadamente, preferiblemente entre 1 y 5 mg/ml aproximadamente y más preferiblemente esta cantidad es de 2,5 mg/ml aproximadamente. La disolución del EPS en el disolvente anhidro se realiza preferiblemente, con agitación, a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas aproximadamente y a continuación a una temperatura comprendida entre 25 40 y 50°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 45°C durante aproximadamente 2 horas bajo atmósfera de argón con tamiz molecular.

El o los agentes de sulfatación química utilizados durante la etapa de sulfatación se puede añadir a los EPS despolimerizados y/o reducidos y/o N-acetilados que están en forma liofilizada o en forma de una solución.

- 30 Los agentes de sulfatación se eligen preferiblemente entre los complejos de sulfato de piridina (libre o acoplado con un polímero), sulfato de dimetilformamida, sulfato de trietilamina y sulfato de trimetilamina. El o los agentes de sulfatación química se añaden a la solución de derivados polisacáridicos en una cantidad en peso que representa preferiblemente de 4 a 6 veces aproximadamente, y aún más preferiblemente 5 veces aproximadamente, la masa de derivados polisacáridicos en solución. La reacción de sulfatación química se realiza preferiblemente con agitación durante un periodo comprendido entre 2 y 24 horas aproximadamente, según el grado de sulfatación deseado. Cuando se alcanza el grado de sulfatación deseado, se detiene la reacción de sulfatación, después del enfriamiento del medio de reacción:

- bien mediante la adición de agua en una proporción preferiblemente igual a 1/10 del volumen de reacción y ajuste del pH del medio de reacción a 9 con un agente alcalinizante tal como, por ejemplo, sosa (3 M);

- o bien preferiblemente mediante precipitación en presencia de acetona saturada de cloruro de sodio o metanol y después disolución del precipitado en agua.

- 5 Según una forma de realización particular, la solución de derivados polisacarídicos sulfatados preferiblemente se dializa para eliminar las diferentes sales y después se liofiliza.

En el contexto de la invención, por "derivados polisacarídicos sulfatados", se entienden derivados polisacarídicos que se han sometido a un tratamiento de sulfatación química y que comprenden grupos sulfato, con o sin grupos sulfato antes de este tratamiento de sulfatación.

- 10 Preferiblemente, los derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados según la invención tienen una masa molar inferior o igual a 100.000 g/mol, preferiblemente comprendido entre 5.000 y 50.000 g/mol, un índice de polidispersidad inferior a 5, preferiblemente comprendido entre 1,5 y 4 y una tasa de sustitución en grupos sulfato comprendidos entre 10 y 45% en peso, y preferiblemente comprendido entre el 20 y el 40% en peso, inclusivo.

- 15 Más preferiblemente, los derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados según la invención tienen una masa molar inferior o igual a 25.000 g/mol, un índice de polidispersidad inferior a 2, una tasa de sustitución en grupos sulfato comprendido entre 10 y 45% en peso, y preferiblemente comprendido entre 20 y 40% en peso, inclusivo.

- 20 Los derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados según la invención se obtienen por tratamiento de PS nativos excretados por bacterias marinas mesófilas de origen hidrotermal pertenecientes preferiblemente al género *Alteromonas* o *Vibrio*

Según una variante de la invención, las bacterias del género *Alteromonas* se seleccionan entre las cepas GY 785, HYD 657, HYD 721, HYD 1545, HYD 1644, ST 716 y MS 907.

- 25 La invención se refiere a derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos a partir de EPS nativos excretados por bacterias del género *Alteromonas*, dichos EPS nativos con un contenido del 20 al 70%, preferiblemente del 30 al 60% y más preferiblemente del 38% al 57% en peso de osas neutras.

La invención se refiere igualmente a derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos a partir de EPS nativos excretados por bacterias del género *Alteromonas*, dichos EPS nativos con un contenido del 5 al 60%, preferiblemente del 6 al 50% y más preferiblemente del 8% al 42% en peso de osas ácidas.

- 30 La invención se refiere igualmente a derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos a partir de EPS nativos excretados por bacterias del género *Alteromonas*, dichos EPS nativos con un contenido del 0 al 1%, en peso de osaminas en su composición osídica.

Según un modo de realización particular, los derivados polisacarídicos de baja masa molecular y sulfatados de la invención se obtienen a partir de EPS nativos excretados de las bacterias del género *Alteromonas*, dichos EPS nativos tienen una composición osídica que comprende:

- 35
- del 20 al 70%, preferiblemente del 30 al 60%, y más preferiblemente del 38 al 57% en peso de osas neutras,
  - del 5 al 60%, preferiblemente del 6 al 50%, y más preferiblemente del 8 al 42% en peso de osas ácidas,
  - del 0 al 1% en peso de osaminas.

- 40 Según otro modo de realización particular, los derivados polisacarídicos de baja masa molecular y sulfatados de la invención se obtienen a partir de EPS nativos excretados de las bacterias del género *Vibrio*, preferiblemente por la cepa bacteriana HE 800. Los EPS nativos excretados de las bacterias del género *Vibrio* no son sulfatados.

La invención se refiere a derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos a partir de EPS nativos excretados por bacterias del género *Vibrio*, dichos EPS nativos con un contenido del 0 al 5%, preferiblemente del 0 al 10% en peso de osas neutras.

- 45 La invención se refiere igualmente a derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos a partir de EPS nativos excretados por bacterias del género *Vibrio*, dichos EPS nativos con un contenido del 20 al 50%, preferiblemente del 25 al 40% y más preferiblemente del 30% al 32% en peso de osas ácidas.

- 50 La invención se refiere igualmente a derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos a partir de EPS nativos excretados por bacterias del género *Vibrio*, dichos EPS nativos con un contenido del 20 al 50%, preferiblemente del 25 al 40% , y más preferiblemente del 30 a 35% en peso de osaminas.

La invención se refiere a derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos a partir de EPS nativos excretados por bacterias del género *Vibrio*, dichos EPS nativos con un contenido del 0 al 15%, preferiblemente del 4 al 8%, y más preferiblemente del 5 al 6% en peso de grupos N-acetilados.

5 Según un modo particular de realización de la invención, los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados según la invención se caracterizan porque se obtienen a partir de EPS nativos excretados por bacterias del género *Vibrio*, dichos EPS nativos tienen una composición osídica que comprende:

- del 0 al 5%, preferiblemente del 0 al 1% en peso de osas neutras,
- del 20 al 50%, preferiblemente del 25 al 40%, y más preferiblemente del 30 al 32% en peso de osas ácidas,
- del 20 al 50%, preferiblemente del 25 al 40%, y más preferiblemente del 30 al 35% en peso de osaminas.

10 - del 0 al 15%, preferiblemente del 4 al 8%, y más preferiblemente del 5 al 6% en peso de grupos N-acetilados.

La invención se refiere a derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos a partir de EPS nativos que tienen un contenido del 0 al 15%, preferiblemente del 0 a 5%, y más preferiblemente del 0 al 1% en peso de proteínas.

15 De manera sorprendente e inesperada, los inventores han puesto de manifiesto que los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados según la invención son útiles como agentes cicatrizantes de los tejidos conjuntivos, y son en particular capaces de estimular la proliferación de los fibroblastos, de inhibir la secreción de los mediadores solubles o citoquinas pro-inflamatorias por los fibroblastos, de inhibir la secreción de metaloproteasas matriciales por los fibroblastos, estimular selectivamente la proliferación de las células medulares de vocación mesenquimatosa en detrimento de otras subpoblaciones en una población heterogénea de células.

Los fibroblastos tienen un papel central en el proceso de cicatrización de un tejido lesionado para la formación de un tejido de sustitución para restaurar su funcionalidad. Típicamente, el proceso de cicatrización se desarrolla en 3 fases a lo largo de las cuales los fibroblastos hacen progresar los procesos de regeneración según secuencias cronológicas precisas, pero imbricadas las unas en las otras.

25 (1) La primera fase de la cicatrización vascular e inflamatoria se caracteriza por la liberación de un gran número de factores de crecimiento y de citoquinas, de proteasas y la migración de células inflamatorias, fibroblásticas y vasculares al nivel de la lesión. El flujo de células inflamatorias y la producción de citoquinas inducen la producción de hidrolasas como las serinas proteasas o las metaloproteasas matriciales por los fibroblastos. Cuando la fase inflamatoria, normalmente transitoria se prolonga sin control, se instala una patología inflamatoria crónica.

30 (2) La fase de reconstrucción (fase proliferativa o tejido de granulación) del tejido se traduce por la colmatación de la pérdida de sustancias tisulares sobrevenida durante una lesión por una matriz extracelular poco organizada y muy vascularizada. Los fibroblastos proliferan rápidamente bajo el efecto de factores de crecimiento. Estos fibroblastos efectúan un trabajo notable de reconstrucción secretando componentes de la matriz extracelular tales como glicosaminoglicanos (GAG), la fibronectina y el colágeno. Una parte de estos fibroblastos adquiere un fenotipo miofibroblástico expresando en particular la  $\alpha$ -actina de los músculos lisos. El tejido cicatricial se encoge gracias a las capacidades contráctiles de los miofibroblastos.

35 (3) Durante la fase de maduración, una gran parte de los miofibroblastos desaparece por apoptosis u se sustituye por fibroblastos que no expresan ya la  $\alpha$ -actina de los músculos lisos. En este momento la persistencia de los miofibroblastos, debido a su actividad, puede llevar a patologías de tipo fibrótico. Al término de este proceso, un tejido fibroso denso cicatricial se constituye y puede entonces remodelarse. La maduración del tejido cicatricial se caracteriza particularmente por una modificación de la orientación de las fibras matriciales que tienen a disponerse según las líneas de mayor tensión como en un tejido conjuntivo normal.

45 El remodelaje tisular es un balance dinámico entre la síntesis de la matriz extracelular y su degradación. Cuando este balance dinámico se equilibra, la cicatrización es normal. Sin embargo, cuando el balance se inclina de manera duradera por la síntesis de matriz extracelular, se asiste al desarrollo de una fibrosis. Cuando el balance se inclina por la degradación excesiva de la matriz extracelular, se instala una patología inflamatoria.

La presente invención se refiere al uso de los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados según la invención como agentes cicatrizantes de los tejidos conjuntivos, en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales.

50 Teniendo en cuenta que los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados de la invención tienen propiedades de activación de la proliferación de los fibroblastos, es particularmente interesante utilizarlos como agente capaz de estimular la proliferación de los fibroblastos, o como agente regenerador para la preparación de una composición farmacéutica de actividad cicatrizante, permitiendo dicha composición en particular favorecer la

reconstrucción y el remodelaje de los tejidos conjuntivos, en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales.

5 Los inventores han demostrado asimismo que los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados según la invención son útiles como agentes capaces de inhibir la secreción de los mediadores solubles o citoquinas pro-inflamatorias por los fibroblastos de los tejidos conjuntivos, de los cuales en particular la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y/o el TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral)

10 Algunas patologías inflamatorias crónicas, tales como las parodontitis, las úlceras crónicas, las cicatrizaciones retardadas o la artritis reumatoide, van acompañada de una degradación excesiva e incontrolada de las macromoléculas matriciales. Estas patologías están a menudo asociadas a la secreción deletérea de citoquinas, en particular citoquinas proinflamatorias, con la activación persistente del complemento que conduce, entre otros a la sobreproducción perjudicial de anafilatoxinas quimioatrayentes. En estas patologías inflamatorias, la producción excesiva de citoquinas pro-inflamatorias perturba las funciones celulares y tisulares fisiológicas, en particular la migración celular, proliferación celular, expresión, secreción y activación de algunas proteasas como las metaloproteasas matriciales (MMP). La expresión de estas MMP implicadas en la degradación de las proteínas matriciales no es generalmente constitutiva y es inducida por citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 $\beta$  y/o el TNF- $\alpha$  y/o factores de crecimiento.

20 Los inventores han mostrado que los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados según la invención son útiles como agentes capaces de inhibir la secreción de metaloproteasas matriciales por los fibroblastos de los tejidos conjuntivos en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales. En particular, los derivados según la invención son particularmente eficaces para inhibir la secreción de la gelatinasa A (MMP-2) y/o la estromelina 1 (MMP-3). La inhibición de la secreción de metaloproteasas se ha puesto de manifiesto en fibroblastos estén estos o no bajo la influencia de citoquinas pro-inflamatorias tales como la IL-1 $\beta$ . Es en efecto particularmente interesante regular la secreción de MMP que pueden ser responsables de la degradación incontrolada de las macromoléculas matriciales en patologías inflamatorias que afectan a los tejidos conjuntivos y gingivales, en particular las parodontitis o las ulceraciones crónicas.

25 Regulando la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y de metaloproteasas matriciales de los fibroblastos de los tejidos conjuntivos y en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales, los derivados sulfatados polisacáridicos según la invención muestran una buena actividad anti-inflamatoria.

30 El complemento es una componente de la inmunidad innata (activación espontánea en respuesta a una agresión) que se define como un conjunto complejo de proteínas solubles o membranares. Durante una respuesta inflamatoria estas proteínas se activan en una serie de reacciones de proteólisis en cadena que genera péptidos provistos de actividades biológicas. La activación del complemento que es rápido y localizado, se somete a diversos mecanismos de control particularmente eficaces. Sin embargo, algunos de estos mecanismos de control se perturban en patologías inflamatorias, tales como las patologías auto-inmunes, que implican una activación persistente del complemento. De manera sorprendente e inesperada, los inventores han puesto de manifiesto el uso de los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados de la invención como agentes capaces de inhibir la vía clásica del complemento. Ventajosamente, los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados y de la invención se utilizan como agentes anti-inflamatorios para la preparación de una composición farmacéutica que permite tratar patologías inflamatorias en las cuales el complemento se activa, en particular patologías auto-inmunes, como por ejemplo los pénfigos.

40 Teniendo en cuenta sus propiedades anti-inflamatorias, es interesante utilizar los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados y de la invención como agentes anti-inflamatorios para la preparación de una composición farmacéutica que permite en particular tratar patologías inflamatorias de los tejidos conjuntivos, en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales como por ejemplo parodontosis, ulceraciones crónicas o cicatrizaciones retardadas.

45 Numerosas patologías son susceptibles de provocar la aparición de un proceso inflamatorio: no solo las patologías auto-inmunes sino también las patologías neoplásticas o infecciosas. Ventajosamente, los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados y de la invención se utilizan como agentes anti-inflamatorios para la preparación de una composición farmacéutica que permite tratar patologías inflamatorias que afectan a los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales, en particular patologías auto-inmunes, infecciosas o neoplásticas, como por ejemplo sarcomas.

50 El desarrollo de las fibrosis patológicas parece seguir un recorrido similar al seguido durante la regeneración tisular. Sin embargo, el control normal de las funciones celulares que sobrevienen durante los procesos de regeneración tisular se ve perturbado. En efecto, desequilibrios en la componente celular pueden traducirse entre otro en el aflujo no controlado de células inflamatorias que mantienen la degradación tisular y/o en la persistencia de subpoblación celular tal como los miofibroblastos que implican patologías fibróticas. Mientras que los miofibroblastos aparecen de manera transitoria durante los procesos de cicatrización normal, esta subpoblación celular persiste cuando la regeneración tisular se vuelve patológica.

Los inventores han mostrado que derivados polisacarídicos sulfatados según la invención son útiles como agentes capaces de estimular la proliferación de los fibroblastos en detrimento de los miofibroblastos en los tejidos conjuntivos, en particular tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales. Más en particular, los derivados polisacarídicos sulfatados según la invención son útiles como agentes capaces de estimular la proliferación de los fibroblastos en detrimento de los miofibroblastos en cultivos celulares bidimensionales o en tejidos conjuntivos reconstruidos dérmicos y gingivales.

La utilización de los derivados polisacarídicos sulfatados según la invención permite estimular la proliferación de los fibroblastos responsables de la homeostasia tisular a la vez que controlan la persistencia de los miofibroblastos, dos eventos celulares procedentes de la estimulación del proceso no patológico de la regeneración tisular.

Teniendo en cuenta su propiedad para seleccionar la subpoblación fibroblástica en detrimento de la subpoblación miofibroblástica, es particularmente interesante utilizar los derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados tales como se han definido anteriormente como agente anti-fibrótico para la preparación de una composición farmacéutica, permitiendo dicha composición especialmente prevenir o tratar los procesos de cicatrización hipertrófica o de las patologías fibróticas de los tejidos conjuntivos en particular dérmicos y gingivales.

Esta propiedad que los derivados polisacarídicos sulfatados según la invención tienen para seleccionar una subpoblación celular particular en el seno de una población heterogénea se ha explotado también para favorecer la obtención de una subpoblación de células medulares con vocación mesenquimatosas. Las células medulares con vocación mesenquimatosas son células madre adultas capaces de desarrollarse en células mesenquimatosas diferenciadas según el tejido en el cual se encuentran, en particular en fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, adipocitos y células musculares con características morfológicas y funciones especializadas.

De este modo, los inventores han demostrado que los derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados según la invención eran capaces de estimular selectivamente la proliferación de las células medulares con vocación mesenquimatosas en detrimento de otras subpoblaciones en una población heterogénea de células. Este efecto proliferativo selectivo es tanto más interesante cuanto que las células medulares con vocación mesenquimatosas son raras ya que son particularmente difíciles de obtener y de mantener en cultivo. Por lo tanto es ventajoso complementar medios de cultivo celular destinados a la obtención y al mantenimiento de las células medulares con vocación mesenquimatosas en el marco de terapia tisular o celular.

De este modo, los derivados polisacarídicos sulfatados según la invención permiten por lo tanto una selección-amplificación por proliferación de las células medulares con vocación mesenquimatosas. Estas células medulares con vocación mesenquimatosas representan una fuente de células pluripotentes utilizables en terapia tisular confines de trasplante en el ser humano en la medida en que son capaces de diferenciarse en fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, adipocitos y células musculares según el tejido en el cual se implantan.

Estas células tiene por lo tanto un interés tisular y celular y más particularmente cuando es imposible tomar fragmentos de piel como en los grandes quemados, o cuando el tejido no posee ya las capacidades de regenerarse como el cartílago en el adulto.

Cada una de las composiciones farmacéuticas o medicamentos que contienen los derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados obtenidos según la invención pueden usarse además en asociación con uno o varios factores de crecimiento presentes en dicha composición farmacéutica o presentes en una composición farmacéutica distinta que se administrará entonces de forma separada, es decir, antes, al mismo tiempo o después que la administración de la composición farmacéutica que incluye los derivados polisacarídicos sulfatados. Tales factores de crecimiento pueden elegirse en particular entre FGF (Factores de crecimiento de fibroblastos), TGF $\beta$ , BMP (Proteínas morfogénicas de los huesos), CTGF (Factor de crecimiento de tejido conectivo).

Teniendo en cuenta sus propiedades sobre los fibroblastos, los derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados tales como se definen anteriormente pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica de actividad cicatrizante y/o anti-fibrótica y/o anti-inflamatoria.

Las composiciones farmacéuticas o medicamentos según la invención se destinan preferiblemente a administrarse cualquier vía apropiada. La composición farmacéutica o el medicamento según la invención se presenta preferiblemente en forma inyectable, en el cual los derivados polisacarídicos sulfatados presentan una masa molar comprendida entre 5.000 y 50.000 g/mol, preferiblemente inferior o igual a 25.000 g/mol, y un índice de polidispersidad comprendido entre 1,5 y 5, preferiblemente inferior o igual a 2, y una tasa de sustitución en grupos sulfato comprendida entre el 10 y el 45 % y preferiblemente comprendida entre el 20 y el 40%, inclusivo.

La presente invención se refiere igualmente a una composición cosmética o dermatológica para su utilización como cicatrizante, caracterizada porque comprende derivados polisacarídicos de baja masa molar y sulfatados según la invención en asociación con cualquier excipiente apropiado.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas, cosméticas o dermatológicas se pueden administrar localmente y presentarse en forma de un gel, una crema, una pomada, una emulsión, una solución..



Pueden administrarse igualmente *in situ* a través de sustratos, de dispositivos médicos reabsorbibles o no tales como, por ejemplo, soportes de liberación retardada o esponjas de disgregación lenta, o implantes quirúrgicos.

La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda de los siguientes ejemplos, que se leen con referencia a las figuras adjuntas; estos ejemplos se dan solo a título de ilustración del objeto de la invención.

- 5 - la figura 1 es un espectro infrarrojo de los derivados polisacáridicos HE 800 que han experimentado una despolimerización radicalar, antes (HE 800 DR) y después de la reacción de N-desacetilación (HE 800 DRN).
- la figura 2 representa los espectros infrarrojos del derivado HE 800 que ha experimentado una despolimerización radicalar (derivado HE 800 DR) y del derivado HE 800 N-desacetilado y sulfatado (HE 800 DRNS);
- 10 - la figura 3 es un gráfico que muestra el efecto del derivado GY 85 despolimerizado radicalmente y a continuación sulfatado, según la invención, en la proliferación de fibroblastos en una dermis reconstruida;
- la figura 4 es un conjunto de 6 fotos a,b, c, d, e, f. Esta figura se refiere a una prueba de inmunodetección, en un cultivo fibroblástico dérmico, de los filamentos  $\alpha$ -actina, característicos de la subpoblación de miofibroblastos;
- 15 - la figura 5 es un gráfico que refleja un resultado obtenido en zimografía, y muestra el efecto del HE 800 DRNS sobre la secreción de MMP-2 por los fibroblastos en cultivo: la figura 5 muestra que se inhibe la secreción de MMP-2;
- la figura 6 es un conjunto de dos fotos, a y b, que muestran el efecto de un derivado según la invención sobre la secreción de una proteasa matricial, la estromelina (MMP-3).
- 20

**Ejemplo 1: Composición osídica de los eps nativos bacterianos**

*Procedimientos*

El contenido en proteína se determinó según el procedimiento del BCA (ácido bicinconínico) descrito por Wieheman, K. et al., (Anal Biochem. 1988, 175 : 231-237).

- 25 El contenido en osas neutras se determinó por el procedimiento de Tilmans y Philippi (Analyt. Chem., 1929, 28 : 350) modificado por Rimington (Biochem. J., 1931, 25: 1062-1071).

El contenido en ácido urónicos (GlcA) se estableció utilizando una modificación del procedimiento m-hidroxi-difenilo-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Filisetti-Cozzi y Carpitta, Anal. Biochem., 1991, 197: 157-162) y utilizando el ácido glucurónico como patrón. La interferencia de hexosasa neutras se evitó utilizando sulfamato de potasio y procediendo a controles que comprenden todos los reactivos salvo m-hidroxifenilo.

Los contenidos en osas neutras y ácidas se determinaron por cromatografía engase gaseosa. El análisis de los residuos glicosídicos en forma de derivados trimetilsililados se realizó según el procedimiento de Kamerling et al., (Biochem. J., 1975, 151: 491-495) y modificado por Montreuil *et al.* ("Glycoproteins" en: "Carbohydrate analysis, a practical approach", 1986, Chaplin M.F. y Kennedy J.F. (eds), IRL Press, Oxford, 143-204).

- 35 El contenido enhexosaminas y N-acetilhexosaminas (GalNAc y GlcNAC) se determina mediante el procedimiento de Belcher et al., (Analyst, 1954, 79 : 201-208) adaptado a partir del de Nelson y Morgan (Biochem J. 1933, 27 : 1824-1828) y utilizando la N-acetilglusomaina y la glucosamina como patrones.

Se determinaron los contenidos de sulfatos totales (libres más ligados de los EPS nativos) mediante análisis elemental del azufre (% de S) y aplicando la siguiente relación: porcentaje de grupos sulfato (%)= 3,22 x % de S. La tasa de sulfatos libres se cuantifica mediante cromatografía de intercambio de iones en un sistema Dionex® DX-500 ligado a un conductímetro y siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante Dionex. El resultado obtenido permite calcular la tasa de sulfatos realmente ligados al derivado de EPS, que es igual a la tasa de sulfatos totales (obtenida mediante análisis elemental) menos la tasa de sulfatos libres (obtenida mediante cromatografía de intercambio de iones).

45 *Descripción*

Cepa	EPS	COMPOSICIÓN OSÍDICA			Sulfatos
		% de neutra	% de ácida	% de osamina	%

(cont.)

HYD 1545 <sup>1,2,3</sup> <i>Alteromonas sp</i>	1545 <sup>1,2,3</sup>	49	34	0,2	11
HYD 721 <sup>1,2,12</sup> <i>Pseudoalteromonas sp</i>	721 <sup>1,2,12,16</sup>	55	11	< 0,5	12
HYD 1644 <sup>2,7,8</sup> <i>Alteromonas sp</i>	1644 <sup>2,7,8,16</sup>	55	35	< 1	5
HYD 657 <sup>2,14</sup> <i>Alteromonas macleodii sp subsp fijiensis biovar deepsane</i>	657 <sup>2,14</sup>	47	26	1,6	5
ST 716 <sup>4,9,10</sup> <i>Alteromonas macleodii sp subsp. Fijiensis</i>	716 <sup>9,10,16</sup>	40	40	< 1	5
GY 785 <sup>5</sup> <i>Alteromonas infernus sp</i>	GY 785 <sup>5,11,15,16</sup>	55	40	< 0,7	10
MS 907 <sup>16</sup> <i>Alteromonas macleodii sp subsp fijiensis biovar medioatlantica</i>	MS 907 <sup>16</sup>	50	37	0	0
HE 800 <sup>6,9,13</sup> <i>Vibrio diabolicus sp</i>	HE 800 <sup>6,9,13</sup>	1	32	30	0
<p>1) (Aymard et al., 1991 Food Hydrocoll, <b>5</b>, 167-169); 2) (Guezennec et al., 1994 Carbohydr. Polym., <b>24</b>, 287-294) ; 3) (Vincent et al., 1994 Appl. Environ. Microb., <b>60</b>, 4134-4141) ; 4) Raguenes et al, 1996 Appl Env Microbiol, <b>62</b>, 67-73) ; 5) (Raguenes et al., 1997 Journal of Systematic Bacteriology, <b>47</b>, 989-995); 6) (Raguenes et al., 1997 J. Appl. Microbiol., <b>82</b>, 422-430); 7) (Dubreucq et al., 1996 Carbohydr Res, <b>290</b>, 175-81) ; 8) (Bozzi et al., 1996 Int J Biol Macromol, <b>18</b>, 9-17); 9) (Rougeaux et al., 1996 Carbohydr. Polym., <b>31</b>, 237-242); 10) (Rougeaux et al., 1998 Carbohydr. Res., <b>312</b>, 53-59); 11) (Guezennec et al., 1998 Carbohydr. Polym. 37, 19-24.) ; 12) (Rougeaux et al., 1999 Carbohydr Res., 315, 273-285); 13) (Rougeaux et al., 1999 Carbohydr. Res., 322, 40-45); 14) Cambon-Bonavita et al, 2002 J Applied Microbiol, 93, 310-315) ; 15) (Guezennec, 2002 J Ind Microbiol Biot, 29, 204-208) ; 16) (Raguenes et al, 2003 Curr Microbiol, 46, 448-52); 17) (Roger et al, 2004. Res., 339, 2371-2380)</p>					

**Ejemplo 2: Preparación de derivados según la invención a partir del eps he 800 nativo**

- (1) HE 800 DR corresponde al derivado polisacárido de baja masa molar
- (2) HE 800 DRS corresponde al derivado polisacárido de baja masa molar y sulfatado
- 5 (3) HE 800 DRNS corresponde al derivado polisacárido de baja masa molar, N-desacetilado y sulfatado

Los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados según la invención se obtiene: (i) para la serie DRS aplicando una primera etapa de despolimerización radicalar (DR) y de una etapa de sulfatación (S) y (ii) para la serie DRNS aplicando una primera etapa de despolimerización radicalar (DR) seguida por una etapa de N-desacetilación (N) y por una etapa de sulfatación (S).

10 2.1 Despolimerización radicalar de un EPS nativo

Se producen 500 mg de EPS de la bacteria marina de origen hidrotermal HE 800 según el procedimiento descrito el documento EP 975 971 y se liofilizan. El EPS nativo se rehidrata lentamente durante una noche en 100 ml de agua y

se introduce en un reactor de vidrio de doble pared. El catalizador metálico se añade al medio de reacción en forma de una solución de acetato de cobre a 16 mg/ml. La temperatura del medio se lleva a 60°C. Una agitación magnética se mantiene durante toda la reacción. El medio de reacción se lleva a un pH comprendido entre 7,5 y 8 con sosa concentrada 10N. Se sigue el pH del medio de reacción y se garantiza su regulación por la adición de una solución de sosa.

5

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se añade a continuación al reactor con un caudal de 1 ml/min con la ayuda de una bomba peristáltica. El peróxido de hidrógeno se prepara extemporáneamente a partir de una solución concentrada.

#### *Reducción*

Se disuelve 1 g de borohidruro de sodio por 1 g de derivado polisacárido en un volumen reducido de agua y a continuación se añade directamente en un reactor. La reacción se desarrolla a temperatura ambiente y con agitación a lo largo de una duración de 2 a 20 horas. Se detiene mediante la adición de ácido acético 10 N. Se forma un precipitado negruzco debido al cobre a lo largo de la reacción.

10

#### *Eliminación del catalizador*

Para eliminar el precipitado formado durante la reacción de reducción, la solución que contiene el derivado polisacárido se filtra en un Büchner equipado con filtros de microfibras de vidrio de 3 µm. el cobre residual se elimina a continuación por paso de la solución que contiene el derivado polisacárido por una resina Chelex<sup>TM</sup>, de capacidad de 0,4 meq/ml. Se lleva a cabo la percolación de la solución que contiene el derivado polisacárido con un caudal de 4 a 5 ml/min en una columna (25X400 mm) de 200 ml de resina previamente pasivada. A la salida, la solución que contiene el derivado polisacárido tiene un pH básico de 10.

15

#### *Diafiltración, concentración por Ultra-filtración y liofilización:*

La solución que contiene el derivado polisacárido se ultrafiltra en un sistema de ultrafiltración Pellicon 2 (Millipore) equipado con una membrana Pall de 1.000 g/mol). La conductividad de la solución (4 a 5 mS) se mide a lo largo de toda la diafiltración. Cuando se alcanza un valor estable e inferior a 100 µS en el filtrado, la solución ha vuelto a un pH neutro. Se puede entonces concentrar y a continuación liofilizar (Liofilizador CIRP). Una vez liofilizado, el derivado polisacárido obtenido se caracteriza.

25

#### *2.2 N-desacetilación*

*Principio:* Con el fin de sustituir a la vez las unidades osídicas en grupos N- y O-sulfato, el derivado polisacárido HE 800 DR se N-desacetila. El procedimiento de N-desacetilación del derivado HE 800 se realiza en cantidades importantes de producto.

#### *30 Procedimiento:*

Se solubilizan 259 mg de EPS HE 800 DR en 10 ml de agua y se colocan en un matraz con agitación magnética. Se solubilizan 263 mg de NaBH<sub>4</sub> en 1,25 ml de agua y a continuación se añaden a la solución de EPS HE 800 DR. Cuando la temperatura de la mezcla alcanza 80°C, se añade 1,25 ml de NaOH 10 N. La concentración final de la solución es entonces de 1 N en sosa y del 2% en NaBH<sub>4</sub> para un volumen total de 12, 5 ml.

35 Después de una hora de reacción, la solución se neutraliza con ácido acético 10 N hasta la parada de la efervescencia. El volumen añadido es de 1,5 ml y el pH es de 5. La solución se ultrafiltra a continuación por membrana de 1.000 g/mol y a continuación se liofilizan. Se obtienen 167 mg de EPS HE 800 DR N-desacetilado (HE 800 DRN) reflejando un rendimiento del 65%.

#### *2.3. Sulfatación del EPS HE 800 DR o de HE 800 DRN*

#### *40 Preparación del polisacárido en forma de sal:*

Se solubilizan 50 mg de EPS en 20 ml de H<sub>2</sub>O. El derivado polisacárido se pone en forma de H<sup>+</sup> por elución en una columna de resina Dowex. La elución se realiza con agua, el eluato se recoge mientras el pH permanece ácido, preferiblemente inferior a 5. El pH se ajusta inmediatamente a 6,5 con la base deseada, (piridina, trietilamina, tiburilamina, sosa). Entonces el derivado polisacárido en forma de sal se liofiliza.

#### *45 Sulfatación del polisacárido:*

El derivado polisacárido en forma de sal se disuelve en 100 ml de DMF anhidro con agitación suave (250 vuelta/min) durante 2 horas a temperatura ambiente, y a continuación durante 2 horas a una temperatura de 45°C.

50 Cuando la disolución se completa, se añaden 2,5 g de complejo de piridina-SO<sub>3</sub> al medio de reacción, es decir 5 veces la masa del polisacárido. La temperatura de la mezcla se mantiene entonces a 45°C durante 2 horas con agitación. La reacción se termina por adición de 40 ml de agua y de sosa para obtener un pH de 9. La mezcla de reacción se dializa entonces en agua con una membrana de diálisis que presenta un umbral de acorte de 3.500 Da.

Después de la diálisis, la solución que contiene el EPS se filtra en filtros de 2,7 µm y a continua de 0,7 µm y se ultrafiltra por membrana de 1.000 g/mol y a continuación se liofiliza.<sup>2</sup>

2.4 Caracterización de los diferentes derivados: (1) HE 800 DR; (2) HE 800 DRS y (3) HE 800 DRNS.

5 Las masas molares (Mc : Masa molar cromatográfica determinada en el vértice del pico; Mp o Mw: Masa molar media ponderal y Mn: Masa molar en número) y la polidispersidad ( $I = Mp/Mn$ ) de los diferentes derivados de EPS HE 800 obtenido se han determinado mediante cromatografía de exclusión estérica de alta resolución (HPSEC) en una cadena Biotech, en acetato de de amonio acuoso 0,1 M a un caudal de 0,1 ml/min usando una columna Superdex® 200 o una columna Superdex™ Peptide (AMERSHAM). Se calibró la columna con los siguientes patrones polisacáridicos: pululanos: 758.000-5.900 g/mol (Polymer Laboratories, Interchim), polisacáridos estándar no comerciales: 4.000; 3.000 y 1.500 g/mol; melecitosa: 522 g/mol (FLUKA), sacarosa: 342 g/mol; glucosa: 180 g/mol (SIGMA). Se analizan los resultados usando el software Aramis® (Variant, Francia).

Se determinó el contenido de osas neutras mediante el procedimiento de Tillmans y Philippi (Analyt. Chem., 1929, 28, 350-) modificado por Rimington (Biochem. J., 1931, 25, 1062-1071).

15 Se estableció el contenido de ácidos urónicos (alcA) usando una modificación del procedimiento de m-hidroxidifenil-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Filisetti-Cozzi y Carpitta, Anal. Biochem., 1991, 197, 157-162) y usando ácido glucurónico como patrón. Se evitó la interferencia de las hexosas neutras usando sulfamato de potasio y procediendo a controles que comprenden todos los reactivos a excepción del m-hidroxidifenilo.

20 El contenido en hexosaminas y N-acetilhexosaminas (GalNAC y GlcNAC) se determina mediante el procedimiento de Belcher et al., (Analyst, 1954, 79 : 201-208) adaptado a partir del de Nelson y Morgan (Biochem J. 1933, 27 : 1824-1828) y utilizando la N-acetilglusomaina y la glucosamina como patrones.

Se determinaron los contenidos de sulfatos totales (libres más ligados de los EPS nativos) mediante análisis elemental del azufre (% de S) y aplicando la siguiente relación: porcentaje de grupos sulfato (%)= 3,22 x % de S.

25 La tasa de sulfatos libres se cuantifica mediante cromatografía de intercambio de iones en un sistema Dionex® DX-500 ligado a un conductímetro y siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante Dionex. El resultado obtenido permite calcular la tasa de sulfatos realmente ligados al derivado de EPS, que es igual a la tasa de sulfatos totales (obtenida mediante análisis elemental) menos la tasa de sulfatos libres (obtenida mediante cromatografía de intercambio de iones).

30 La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF) se realizó en un Vector 22 que poseía una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Los espectros infrarrojos de los polisacáridos se realizaron en pastillas de KBr (se mezclan 2 mg de polisacárido con 200 mg de KBr seco) y todos los espectros infrarrojos se registraron a entre y 4000 y 400 cm<sup>-1</sup>.

## 2.5 Resultados

*Composición de un derivado HE 800 DR:*

Características	Derivado HE 800 DR
Osas neutras (g/100g) <sup>1</sup>	0
Osas ácidas (g/100g) <sup>1</sup>	40
Hexosaminas (g/100g) <sup>1</sup>	40
-SO <sub>3</sub> Na total (g/100g) <sup>2</sup>	0
Mc (g/mol) <sup>4</sup>	15.000
Mp (g/mol) <sup>4</sup>	29.000
Mn (g/mol) <sup>4</sup>	13.000
I (Mp/Mn) <sup>4</sup>	2,2
1 : Valoraciones colorimétricas 2 : Valoración por análisis elemental 3 : Valoración por cromatografía de intercambio de iones 4: Determinado por cromatografía HPSEC en equivalente Pululanos:	

Composición de un derivado EPS HE 800 DRS

Características	Derivado HE 800 DRS
Osas neutras (g/100g) <sup>1</sup>	0
Osas ácidas (g/100g) <sup>1</sup>	30
Hexosaminas (g/100g) <sup>1</sup>	30
-SO <sub>3</sub> Na total (g/100g) <sup>2</sup>	25
Mc (g/mol) <sup>4</sup>	4.800
Mp (g/mol) <sup>4</sup>	5.800
Mn (g/mol) <sup>4</sup>	4.500
I (Mp/Mn) <sup>4</sup>	1,3
1 : Valoraciones colorimétricas 2 : Valoración por análisis elemental 3 : Valoración por cromatografía de intercambio de iones 4: Determinado por cromatografía HPSEC en equivalente Pululanos:	

Composición de un derivado EPS HE 800 DRNS

Características	Derivado HE 800 DRS
Osas neutras (g/100g) <sup>1</sup>	0
Osas ácidas (g/100g) <sup>1</sup>	20
Hexosaminas (g/100g) <sup>1</sup>	20
-SO <sub>3</sub> Na total (g/100g) <sup>2</sup>	34
Mc (g/mol) <sup>4</sup>	22.000
Mp (g/mol) <sup>4</sup>	17.000
Mn (g/mol) <sup>4</sup>	19.000
I (Mp/Mn) <sup>4</sup>	1,4
1 : Valoraciones colorimétricas 2 : Valoración por análisis elemental 3 : Valoración por cromatografía de intercambio de iones 4: Determinado por cromatografía HPSEC en equivalente Pululanos:	

- 5 La figura 1 muestra los espectros infrarrojos de los derivados polisacáridicos, antes (HE 800 DR) y después de la reacción de N-desacetilación (HE 800 DRN). Los espectros FT-IR de la figura 1 se han registrado en un espectrofotómetro Bruker Vector 22 (resolución de 4 cm<sup>-1</sup>) 2 mg de derivado de EPS HE 800 se trataron con 200 mg de Kbr durante la etapa de N-desacetilación. El análisis de los espectros infrarrojos de los derivados, antes y después de la etapa de N-desacetilación, muestra a la frecuencia de 1.550 cm<sup>-1</sup> la pérdida de una banda de absorción característica de los grupos N-acetilados (figura 1).

La figura 2 muestra los espectros infrarrojos (IR) del derivado polisacáridico HE 800 no sulfatado (HE 800 DR) y del derivado polisacáridico HE 800 N-desacetilado y sulfatado (HE 800 DRNS). La aparición de las bandas correspondientes a la presencia de ester sulfato (1.250, 820, 600 cm<sup>-1</sup>) se observa para el derivado polisacáridico HE 800 DRNS.

15 **Ejemplo 3: Preparación de derivados según la invención a partir del eps gy 785 nativo**

- (1) Gy 785 DR corresponde al derivado polisacáridico de baja masa molar, obtenido después de una etapa de despolimerización

(2) GY 785 DRS corresponde al derivado polisacárido de baja masa molar, obtenido después de una etapa de despolimerización seguida por una etapa de sulfatación.

1) Despolimerización radicalar y reducción con borohidruro de sodio.

5 Se disolvieron 400 mg de EPS GY 875 sulfatado obtenido anteriormente en la etapa anterior en 95 ml de agua. Después de la disolución, se añadió 2 ml de una solución catalítica que contenía 36 mg de acetato de cobre monohidratado ( $10^{-3}$  M). La temperatura del reactor se llevó entonces a 60°C y el pH se ajustó a 7,5 por adición de sosa 1M. Se añadió una solución al 0,115% (v/v) de peróxido de hidrógeno a un caudal de 1 ml por minuto, y el pH se reguló alrededor de 7,5 por adición de sosa 1M. La reacción se detuvo al cabo de una hora.

10 La reducción se realiza al final de la despolimerización por adición en el reactor de borohidruro de sodio (270 mg de  $\text{NaBH}_4$  disueltos en 10 ml de agua). La reducción se desarrolla con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. La reducción se detiene por adición de ácido acético 10N que permite eliminar el exceso de  $\text{Na BH}_4$  que permanece en forma de desprendimiento gaseoso de hidrógeno. La solución se filtró a continuación en Büchner con filtros de microfibras de vidrio (porosidad 3  $\mu\text{m}$ ). La solución filtrada se eluyó en una columna CHELEX® (BIORAD) para eliminar el cobre residual. La solución descontaminada se ultrafiltra a continuación en un casete (umbral de corte 1.000 Da) y a continuación se liofilia.

2) Sulfatación química del EPS GY 785

20 Se disolvieron 500 mg de liofilizado de EPS GY 785 producido por la bacteria marina de origen hidrotermal *Alteromonas infernus* según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 de la patente FR 2.755.142 en 100 ml de DMF anhidra con agitación suave (250 rpm/min.) durante 2 horas a temperatura ambiente y después durante 2 horas a una temperatura de 45°C. Cuando se completó la disolución, se añadieron 2,5 g de complejo de piridina- $\text{SO}_3$  comercializado con la referencia 84737 por la compañía Fluka (o sea 5 veces la masa del polisacárido GY 785) al medio de reacción. Se llevó enseguida la temperatura de la mezcla a 45°C y se mantuvo durante 2 horas con agitación. Se transfirió la mezcla de reacción a un vaso de precipitados. Se detuvo entonces la reacción mediante la adición de 40 ml de agua y después se llevó el pH a 9 con sosa 3 M. Se dializó entonces la mezcla de reacción en un tubo de diálisis que presentaba un umbral de corte comprendido entre 12.000 y 16.000 Da frente a agua del grifo (1 noche con agua corriente) y después 3 veces durante 24 horas frente a agua Milli-Q.

Después de la diálisis, se congeló la solución que contenía EPS GY 785 sulfatado y se liofilizó.

Las características de los derivados EPS DR y EPS DRS se determinaron según los procedimientos descritos anteriormente en el ejemplo 1 y se resumen en la siguiente Tabla

Características	EPS DR	EPS DRS
Osas neutras (g/100g) <sup>1</sup>	51	nd
Osas ácidas (g/100g) <sup>1</sup>	38	nd
- $\text{SO}_3\text{Na}$ total (g/100g) <sup>2</sup>	10	42
Mc (g/mol)	7.800	13.000
Mp (g/mol)	17.300	23.600
Mn (g/mol)	6.000	8.800
I (Mp/Mn)	2,8	2,7
Actividad anticoagulante <sup>3</sup>	inactivo	7
1 : Valoraciones colorimétricas 2 : Valoración por análisis elemental 3 :Cantidad de polisacárido en $\mu\text{g/ml}$ de plasma humano necesario para suplicar el tiempo de coagulación control, TCA (tiempo de control = 40 segundo); nd : no determinado		

30

Composición de otro derivado GY 785 DR

Características	Derivado GY 785 DR
Osas neutras (g/100g) <sup>1</sup>	40

Osas ácidas (g/100g) <sup>1</sup>	15
Hexosaminas (g/100g) <sup>1</sup>	0
-SO <sub>3</sub> Na total (g/100g) <sup>2</sup>	10
Mc (g/mol) <sup>4</sup>	16.000
Mp (g/mol00) <sup>4</sup>	40.000
Mn(m/mol) <sup>4</sup>	13.000
I (Mp/Mn) <sup>4</sup>	3
1 : Valoraciones colorimétricas 2 : Valoración por análisis elemental 3 : Valoración por cromatografía de intercambio de iones 4: Determinado por cromatografía HPSEC en equivalente Pululanos:	

*Composición de otro derivado GY 785 DRS*

<b>Características</b>	<b>Derivado GY 785 DRS</b>
Osas neutras (g/100g) <sup>1</sup>	20
Osas ácidas (g/100g) <sup>1</sup>	10
Hexosaminas (g/100g) <sup>1</sup>	0
-SO <sub>3</sub> Na total (g/100g) <sup>2</sup>	45
Mc (g/mol) <sup>4</sup>	23.000
Mp (g/mol00) <sup>4</sup>	29.000
Mn(m/mol) <sup>4</sup>	21.000
I (Mp/Mn) <sup>4</sup>	1,4
1 : Valoraciones colorimétricas 2 : Valoración por análisis elemental 3 : Valoración por cromatografía de intercambio de iones 4: Determinado por cromatografía HPSEC en equivalente Pululanos:	

**Ejemplo 4: Preparación de derivados según la invención a partir del eps hyd 721 nativo**

- 5 (1) HYD 721 DR corresponde al derivado polisacárido de baja masa molar, obtenido después de una etapa de despolimerización,
- (2) HYD 721 DRS corresponde al derivado polisacárido de baja masa molar y sulfatado por sulfatación química según la invención

10 El derivado polisacárido sulfatado HYD 721 se obtiene aplicando el procedimiento tal como se describe en el ejemplo 2. Sin embargo, en la medida en que el EPS HYD 721 nativo no contiene hexosaminas N-acetiladas, el procedimiento de preparación del derivado sulfatado no comprende etapa de N-desacetilación.

*Composición de un derivado HYD 721 DR*

<b>Características</b>	<b>Derivado HYD 721 DR</b>
Osas neutras (g/100g) <sup>1</sup>	68
Osas ácidas (g/100g) <sup>1</sup>	17
Hexosaminas (g/100g) <sup>1</sup>	0

-SO <sub>3</sub> Na total (g/100g) <sup>2</sup>	11
Mc (g/mol) <sup>4</sup>	10.000
Mp (g/mol00) <sup>4</sup>	12.000
Mn(m/mol) <sup>4</sup>	7.000
I (Mp/Mn) <sup>4</sup>	1,7
1 : Valoraciones colorimétricas 2 : Valoración por análisis elemental 3 : Valoración por cromatografía de intercambio de iones 4: Determinado por cromatografía HPSEC en equivalente Pululanos.	

Composición de un derivado HYD 721 DRS

Características	Derivado HYD 721 DRS
Osas neutras (g/100g) <sup>1</sup>	35
Osas ácidas (g/100g) <sup>1</sup>	5
Hexosaminas (g/100g) <sup>1</sup>	0
-SO <sub>3</sub> Na total (g/100g) <sup>2</sup>	43
Mc (g/mol) <sup>4</sup>	17.500
Mp (g/mol00) <sup>4</sup>	20.000
Mn(m/mol) <sup>4</sup>	10.000
I (Mp/Mn) <sup>4</sup>	2
1 : Valoraciones colorimétricas 2 : Valoración por análisis elemental 3 : Valoración por cromatografía de intercambio de iones 4: Determinado por cromatografía HPSEC en equivalente Pululanos.	

5 **Ejemplo 5: Efecto de derivados según la invención sobre la proliferación de los fibroblastos dérmicos y gingivales**

Los derivados polisacáridicos sulfatados utilizados en los ensayos de proliferación se prepararon y caracterizaron según los protocolos de los ejemplos 2 y 3.

5.1 Células en cultivo bidimensional

10 Las células se sembraron en cajas de cultivo a razón de 10.000 por pocillo en un medio de cultivo Dupleco MEM Glutamax I que contiene 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 2 µg/ml de fungizona y suplementada con el 10% de suero de feto de ternera (SVF).

15 Después de la adhesión y dispersión de las células durante 12 horas, el medio de cultivo se sustituye por un medio de cultivo suplementado o no con diferentes concentraciones de un derivado polisacáridico sulfatado de baja masa molar : (i) el EPS GY 785 (GY785DRS) o (ii) el EPS HE 800 (HE 800 DRNS)) HE800. Las células se cuentan a continuación después de 2, 4, 7 y 10 días de cultivo. Los testigos corresponden a cultivos de células en ausencia de derivados según la invención (\*).

Efecto del derivado GY 785 DRS sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos en cultivo bidimensional:

	Dia 2	Dia 4	Dia 7	Dia 10
Testigo(*)	100	100	100	100
0,1 µg/ml GY 785 DRS	94,5	100,0	145,3	151,4



1 µg/ml GY 785 DRS	108,8	113,4	173,0	160,1
10 µg/ml GY 785 DRS	87,6	157,3	156,9	151,2
100 µg/ml GY 785 DRS	77,4	121,2	115,6	123,4

Efecto del GY 785 DRS sobre la proliferación de fibroblastos gingivales en cultivo bidimensional:

	Día 3	Día 4	Día 7	Día 10
Testigo(*)	100	100	100	100
0,1 µg/ml GY 785 DRS	112,0	121,8	135,0	139,1
1 µg/ml GY 785 DRS	99,2	101,5	122,6	133,0

(cont.)

10 µg/ml GY 785 DRS	90,2	124,3	160,4	183,3
100 µg/ml GY 785 DRS	77,7	95,4	118,4	161,2

5 Efecto del HE 800 DRNS sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos en cultivo bidimensional:

	Día 2	Día 4	Día 7	Día 10
Testigo(*)	100	100	100	100
10 µg/ml HE 800 DRNS	109,00	159,96	157,70	146,56
100 µg/ml HE 800 DRNS	95,49	191,12	163,60	167,60

Los derivados polisacáridicos sulfatados según la invención son capaces de estimular la proliferación de los fibroblastos dérmicos y gingivales en cultivo bidimensional.

### 5.2 Tejido reconstruido o entramado (Figura 3)

10 Los tejidos conjuntivos reconstruidos o entramados están constituidos por fibras de colágeno de tipo I ácidosoluble que después de la neutralización polimerizan y forman un gel que contiene fibroblastos. La preparación de un entramado se realiza en frío para controlar mejor la polimerización de las fibras de colágeno.

Este entramado bajo la influencia de las células va a experimentar numerosas recomposturas apreciables en particular por su encogimiento que se observa durante los 15 primeros días de cultivo. Este tipo de modelo permite estudiar el comportamiento de las células en el seno de un entorno extracelular más próximo al entorno fisiológico que el simple cultivo en caja.

La figura 3 indica que el derivado polisacáridico de baja masa molar y sulfatado GY 785 DRS según la invención es capaz a una concentración de 10 µg/ml de estimular la proliferación de los fibroblastos en tejidos conjuntivos reconstruidos

### 20 **Ejemplo 6: Puesta de manifiesto del efecto de los derivados según la invención sobre la selección de la subpoblación fibroblástica**

Como para los ensayos de proliferación en cultivo bidimensional, las células se siembran en cajas de cultivo a razón de 10.000 células por pocillo en un medio de cultivo Dupleco MEM Glutamax I que contiene 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 2 µg/ml de fungizona y suplementada con el 10% de suero de feto de ternera (SVF).

25 Después de la adhesión y dispersión de las células durante 12 horas, el medio de cultivo se sustituye por un medio de cultivo suplementado o no con diferentes concentraciones de un derivado sulfatado obtenido a partir del EPS GY785 (GY785DRS). Las células se fijan a continuación al alcohol después de 2, 4, 7 y 10 días de cultivo, se efectúa la inmunodetección sobre estos cultivos celulares como sigue:

30 Las células fijadas se repermabilizan en etanol 70 (20 min), y a continuación se rehidratan en PSB (10 min). Las peroxidases endógenas se bloquean con una solución metano (30%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%. Esta

operación va seguida de un lavado con PSB (2 min) y a continuación un bloqueo de los sitios antigénicos no específicos por una solución PBS/leche desnatada al 1% (1 h). Los cultivos se incuban entonces con un anticuerpo primario (IgG de ratón) dirigido contra la  $\alpha$ -actina humana (1/30; 50 min) a continuación se lavan (3 x 10 min). Las células se incuban entonces, a oscuras durante 60 minutos con un anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado (1/200), lavadas con PBS (3 x 10 min) y a continuación se incuban con estreptavidina acoplada a la peroxidasa (1/200).

Después del lavado (PBS 3 x 10 min), la revelación de la actividad peroxidásica con la 3-3' diaminobencidina se efectúa en un tampón Tris/HCl (100 mM, pH 7,2-7,4) que contiene el 0,1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min, a oscuras). La actividad peroxidásica hace aparecer un material fibrilar marrón que corresponde a los microfilamentos de  $\alpha$ -actina en el citoplasma de las células positivas. Los productos utilizados proceden de la firma DAKO bajo la denominación DAKOIMMUNO-Détection. La figura 4 pone de manifiesto que el derivado polisacárido de baja masa molar y sulfatado GY 785 DRS según la invención es capaz de estimular la proliferación de los fibroblastos en detrimento de los miofibroblastos. Las fotos a, c y e corresponden a cultivos suplementados con 10  $\mu$ g/ml de derivado sulfatado en las cuales la población dominante se forma por fibroblastos en detrimento de los miofibroblastos. Las fotos b, d y f corresponden a cultivos testigos sin derivado sulfatado en las cuales son visibles numerosos miofibroblastos.

Los cultivos testigos no tratados por los derivados según la invención comprenden un gran número de miofibroblastos ( $\alpha$ -actinas positivas), mientras que los fibroblastos que no expresan la  $\alpha$ -actina forman el tipo celular dominante de los cultivos tratados.

## **Ejemplo 7: Efecto de los derivados según la invención sobre la secreción de proteasas matriciales**

### 7.1 Protocolo

Las células se siembran en las cajas de cultivo a razón de 40.000 células por pocillo y se llevan a confluencia en un medio de cultivo Dubelco MEM Glutamax 1 que contiene 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, 2  $\mu$ g/ml de fungizona y suplementado con suero fetal de ternera (SVF).

A confluencia, el medio de cultivo se sustituye por un medio que no contiene SVF y suplementado o no con IL-1 $\beta$  a una concentración final de 100 U/ml, en presencia o en ausencia de derivados sulfatados.

Los medios de cultivo se muestrean después de 48 horas, con el fin de estudiar la secreción por los fibroblastos de MMP en zimografía o por wester-blot. Para cada condición experimental llevada por cuadruplicado, dos pocillos se fijan al etanol, y los dos otros se tripsinizan para desprender las células para contarlas.

La secreción de metaloproteasas se detecta y cuantifica por zimografía. Se trata de un procedimiento particularmente sensible basado en la electroforesis SDS-PAGE efectuada en condiciones reductoras. El sustrato de la MMP-2, la gelatina copolimeriza con la acrilamida. Después de la migración, el SDS se elimina mediante lavados en una solución de Triton X-100 que permite la restauración de la actividad de MMP-2. El gel se incuba a continuación a 37°C en un tampón de incubación (Tris/HCl 0,1 M pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, NaN<sub>3</sub> 0,001%, Brij 0,0015% ZnCl<sub>2</sub> 0,1  $\mu$ M).

Después de la coloración (azul de coomassie (0,5%), el ácido acético (10%), Isopropanol (30%), y a continuación la decoloración ácido acético (10%), metanol (40%), agua destilada (50%), las bandas que ilustran la actividad de la metaloproteasa MMP-2 aparecen decoloradas. El matiz de gris y la superficie de estas bandas se cuantifican con el analizador de imágenes, la relación [(matiz de gris x superficie)/número de células] permite una cuantificación de las actividades gelatinolítica y la comparación entre los cultivos testigo y los cultivos que contienen el ex polisacárido.

7.2. Efecto del HE 800 DRNS sobre la secreción de MMP-2 por los fibroblastos en cultivo, resultado obtenido en zimografía (figura 5)

El gráfico de la figura 5 muestra que la secreción de MMP-2 se inhibe cuando los fibroblastos se cultivan en presencia de derivados polisacáridos de baja masa molar y sulfatados en presencia o ausencia de IL1 $\beta$ .

7.3. Efecto del HE800DRNS sobre la secreción de la estromelina 1 (MMP-3) por fibroblastos en cultivo, resultado obtenido por western-blott (figura 6)

La figura 6 muestra que la adición de HE800 DRNS disminuye fuertemente la secreción de MMP-3 por los fibroblastos, bien sea esta secreción basal (foto a) o inducida por una citoquina inflamatoria la IL-1 $\beta$  (foto b). La foto (a) muestra fibroblastos confluentes incubados durante 48 horas en un medio sin suero (pista 1), y en un medio sin suero que contiene 10  $\mu$ g/ml de derivado de EPS (pista 2); la foto (b) fibroblastos confluentes incubados durante 48 horas en un medio sin suero que contiene 100 U/ml de IL-1 $\beta$  (pista 1), en un medio sin suero que contiene 10  $\mu$ g/ml de derivado de EPS y 100 U/ml de IL-1 $\beta$  (pista 2)

1: testigo = cultivo no tratado

2: cultivo tratado por 100 U/ml de HE800 DRNS

En conclusión, los derivados polisacáridicos sulfatados según la invención son capaces de inhibir la secreción de proteasas matriciales, la gelatinasa A (MMP-2) y la estromelina 1 (MMP-3) de los fibroblastos en cultivos bidimensionales.

**Ejemplo 8: Efecto de los derivados según la invención sobre el complemento**

5 8.1. Principio

El complemento se puede activar por 3 vías de activación diferentes: la vía clásica, la vía alterna y la vía lectina que liga la manosa (MBL) que desembocan por mecanismos diferentes, en la formación de enzimas que tienen sustratos idénticos. Las C3/C5 convertasas capaces de activar C3 y C5. Las reacciones de activación se desarrollan en cascada: un componente adquiere una actividad enzimática que induce la activación del siguiente componente y así sucesivamente.

10 En la medida en que la activación final del complemento es común a las tres vías, solo se estudia la vía clásica en este ejemplo. La activación de la vía clásica interviene cuando el complejo C1 interactúa con complejos antígenos-anticuerpos o agregados inmunes que contienen IgG o IgM. El sistema utilizado para estudiar la vía clásica se basa en la activación del complemento por un complejo inmune consistente en glóbulos rojos de oveja recubiertos por anticuerpos de conejo. Los anticuerpos de conejo que han reconocido como extranjeros, los glóbulos rojos de oveja en presencia de suero humano, disparan principalmente la activación de la vía clásica. Esta activación implica la formación de la C3 convertasa, que dispara entonces la activación de la vía alterna. La activación de estas dos vías desemboca en la formación de un complejo de ataque membranar en la superficie de los glóbulos rojos. Este complejo induce el estallido de los glóbulos rojos y la liberación de hemoglobina. La medida de la activación del sistema del complemento se hace dosificando la cantidad de hemoglobina liberada, por medida de la absorción espectrofotométrica a 414 nm. El activador (glóbulos rojos de oveja) se utiliza también como un revelador de la activación gracias a la hemoglobina liberada durante la lisis celular. La dilución del suero humano se ajusta para una cantidad dada de glóbulos, de tal manera que el 50% de las células sean lisadas.

15 Los glóbulos rojos recubiertos por anticuerpos se incuban en ausencia (testigo) y en presencia de diferentes derivados polisacáridicos sulfatados. La cantidad de hemoglobina liberada disminuye (disminución de la absorción a 414 nm), traduciendo una disminución del número de glóbulos rojos lisados y un efecto inhibitorio de los derivados polisacáridicos sulfatados sobre la activación de la vía clásica del complemento.

20 Se incuban 350 µl de suero humano normal (NHS) (diluido a 1/100 en tampón VBS2+) con 450 µl de VBS2+, 200 µl de anticuerpo de conejo (10<sup>8</sup> células/l), en presencia o ausencia de derivados polisacáridicos sulfatados. Después de un tiempo de reacción aproximado de 45 minutos a 37°C, una solución de NaCl frío (0,15 M) se añade y las células se centrifugan a 2.400 rpm durante 10 minutos. La absorción de los sobrenadantes se mide a 414 nm.

25 8.2 Resultado

Porcentajes de inhibición del complemento (vía clásica) en presencia de diferentes cantidades de derivados de EPS GY 785 DRS y HE 800 DRNS:

Cantidad de derivados	0,5 µg	2,5 µg	5µ g	10 µg
<b>Porcentaje de inhibición</b>				
<b>GY785DRS</b>	<b>42</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>GY785DR</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
		1 µg	5 µg	10 µg
<b>HE800DRNS</b>		<b>18</b>	<b>38</b>	<b>48</b>
<b>HE800DR</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

35 Los derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados según la invención son capaces de inhibir la vía clásica del complemento.

**Ejemplo 9: Efecto de los derivados según la invención sobre la proliferación de las células medulares convocación mesenquimatosa**

40 9.1. Protocolo

5 Las células estromales se obtienen a partir del triturado de médula espinal, este triturado se centrifuga para recuperar un residuo celular. Las células se resuspenden en un medio de cultivo para 500 ml de medio que contiene el 10% de suero de caballo, el 10% de suero fetal de ternera, de L-glutamina 200 nM (4 ml), de MEM vitamina 100X Gibco brl) (4 ml) de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> al 7,5% (4 ml), de aminoácidos esenciales con L-glutamina 50X (Gibco Brl) (4 ml), de piruvato de sodio 100X (4 ml), de aminoácidos no esenciales 100X (Gibco brl) (1,6 ml), diluyéndose el todo en un medio Mc Coy's 1X (Gibco Brl).

Después de 24 horas de cultivo, solo las células que se han adherido al fondo de la caja se conservan.

10 Los ensayos de proliferación se realizan en las mismas condiciones que las descritas para los ensayos de proliferación de los cultivos de fibroblastos humanos gingivales y dérmicos. Los recuentos celulares se efectúan después de 2, 4, 7 y 10 días de cultivo. Las inmunodetecciones dirigidas contra algunos marcadores fenotípicos (véase protocolo α-actina) han montado que estas células no expresan un marcador característico de los macrófagos, el CD68; una minoría de estas células expresa un marcador leucocitario el CD45 sino que por el contrario, expresan una proteína del citoesqueleto característica de las células mesenquimatosas, la vimentina, "Por otra parte, una parte de estas células es capaz de expresar sin estimulación los colágenos de tipo I y III característicos de las células mesenquimatosas en cultivo.

9.2. Resultado

Efecto del GY 785 DRS sobre la proliferación de células medulares con vocación mesenquimatosas:

	Día 2	Día 4	Día 7	Día 10
Testigo (cultivo sin derivados)	100	100	100	100
0,1 µg/ml GY 785 DRS	93,6	129,4	127,8	130,4
1 µg/ml GY 785 DRS	95,5	170,3	170,0	164,8
10 µg/ml GY 785 DRS	79,2	134,5	155,9	179,8
100 µg/ml GY 785 DRS	86,2	129,3	139,4	167,9

20 La proliferación de las células medulares convocación mesenquimatosas se estimula fuertemente en presencia del EPS GY 785 DRS.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados de exopolisacáridos nativos (EPS) nativos excretados por bacterias marinas mesófilas procedentes del medio hidrotermal profundo perteneciente al género *Alteromonas* o *Vibrio* para utilización como agentes cicatrizantes de los tejidos conjuntivos, en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales, siendo dichos derivados susceptibles de obtenerse por el procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- una etapa de despolimerización radicalar de dichos EPS nativos, para la obtención de derivados despolimerizados de baja masa molar, inferior o igual a 100.000 g/mol,
  - una etapa ulterior de sulfatación de los derivados despolimerizados, eventualmente liofilizados, que comprende la adición de al menos un agente de sulfatación en una cantidad suficiente para obtener derivados polisacáridicos sulfatados que presentan una tasa de sustitución en grupos sulfato comprendida entre el 10 y el 45% en peso respecto del peso total del derivado polisacáridico sulfatado, estando dicha etapa de sulfatación eventualmente seguida por una etapa de diálisis. A
- 2.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según la reivindicación 1, **caracterizados porque** el procedimiento comprende, además, una etapa de reducción que sucede a la etapa de despolimerización radicalar.
- 3.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** el procedimiento comprende, además, una etapa de N-desacetilación de los derivados polisacáridicos obtenidos al final de la etapa de despolimerización y/o al final de la etapa de reducción.
- 4.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** el procedimiento comprende, además, una etapa de liofilización de los derivados polisacáridicos, después de la despolimerización, y/o después de la reducción y/o después de la N-desacetilación y/o antes o después de la sulfatación.
- 5.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según la reivindicación 1, **caracterizados porque** la primera etapa de despolimerización radicalar se realiza por adición de una solución de un agente oxidante, de preferencia elegido entre los iones  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Cr}^{+++}$  y el anión  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ .
- 6.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según la reivindicación 5, **caracterizados porque** dicho agente oxidante es una solución de peróxido de hidrógeno, de preferencia de concentración comprendida entre el 0,1% y el 0,5% en peso, que se añade a un caudal comprendido entre  $\text{Vl}/1000$  y  $\text{Vl}/10$  ml/minuto, de preferencia de  $\text{Vl}/50$  a  $\text{Vl}/500$  ml/minutos, siendo  $\text{Vl}$  el volumen del medio de reacción que contiene un exopolisacárido (EPS) marino excretado por bacterias marinas mesófilas procedentes del medio hidrotermal profundo al que se añade la solución de peróxido de hidrógeno.
- 7.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizados porque** el o los agentes de sulfatación utilizados para la etapa de sulfatación se eligen entre los complejos de piridina sulfato, trietilamina sulfato, dimetilamina sulfato, o trimetilamina sulfato.
- 8.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizados porque**, para la realización de la etapa de sulfatación, el o los agentes de sulfatación química se añaden en una cantidad ponderal que representa de 4 a 6 veces la masa de los derivados polisacáridicos en solución y se añaden a los EPS despolimerizados que están en forma seca o en forma de solución en un disolvente de preferencia anhidro.
- 9.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizados porque** presentan un índice de polidispersidad inferior a 5, de preferencia comprendido entre 1,5 y 4 y una tasa de sustitución en grupos sulfato comprendida entre el 10 y el 45% en peso y de preferencia comprendida entre el 20 y el 45% en peso, inclusivo.
- 10.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según la reivindicación 9, **caracterizados porque** presentan una masa molar inferior o igual a 25.000 g/mol, un índice de polidispersidad inferior a 2, una tasa de sustitución en grupos sulfato comprendido entre 10 y 45% en peso, y de preferencia comprendida entre 20 y 40% en peso, inclusivo.
- 11.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizados porque** las bacterias del género *Alteromonas* son de la cepa GY 785.

- 12.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizados porque** las bacterias del género *Alteromonas* se seleccionan entre las cepas HYD 657, HYD 708, HYD 721, HYD 1545, HYD 1644, ST 716 y MS 907.
- 5 13.- Derivados polisacáridicos sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizados porque** las bacterias del género *Vibrio* son bacterias de la cepa HE 800.
- 14.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizados porque** dichos exopolisacáridos (EPS) nativos excretados por bacterias del género *Alteromonas* tienen una composición osídica, que comprende:
- 10 del 20 al 70%, de preferencia del 30 al 60% y más de preferencia del 38% al 57% en peso de osas neutras.
- del 5 al 60%, de preferencia del 6 al 50% y más de preferencia del 8% al 42% en peso de osas ácidas.
- del 0 al 1% en peso de osaminas.
- 15.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 13, **caracterizados porque** dichos exopolisacáridos (EPS) marinos excretados por bacterias del género *Vibrio* tienen una composición osídica que comprende:
- 15 Del 0 a 5% de preferencia del 0 al 1% en peso de osas neutras,
- del 20 al 50%, de preferencia del 25 al 40%, y más de preferencia del 30 al 32% en peso de osas ácidas,
- del 20 al 50%, de preferencia del 25 al 40%, y de preferencia del 30 al 35% en peso de osaminas, y del 0 al 15%, de preferencia del 4 al 8%, y más de preferencia del 5 al 6% en peso de grupos N-acetilados.
- 20 16.- Derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** dichos EPS nativos tienen un contenido del 0 al 15%, de preferencia del 0 a 5%, y más de preferencia del 0 al 1% en peso de proteínas.
- 17.- Derivados polisacáridicos para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque dichos** derivados polisacáridicos son capaces de estimular la proliferación de los fibroblastos en cultivos bidimensionales o en el seno de tejidos conjuntivos reconstruidos, en particular de tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales.
- 25 18.- Derivados polisacáridicos para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** dichos derivados polisacáridicos permiten favorecer la reconstrucción y el remodelaje de los tejidos conjuntivos, en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales.
- 30 19.- Derivados polisacáridicos para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** dichos derivados polisacáridicos son capaces de inhibir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por los fibroblastos de los tejidos conjuntivos, en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales, y particularmente de inhibir la secreción de la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y/o el TNF- $\alpha$ .
- 35 20.- Derivados polisacáridicos para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** dichos derivados polisacáridicos son capaces de inhibir la secreción de metaloproteasas matriciales por los fibroblastos de los tejidos conjuntivos, en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales y particularmente de inhibir la secreción de la gelatinasa A (MMP-2) y de la estromelina 1 (MMP-3).
- 21.- Derivados polisacáridicos para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** dichos derivados polisacáridicos son capaces de inhibir la vía clásica del complemento.
- 40 22.- Derivados polisacáridicos para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** dichos derivados polisacáridicos se utilizan para tratar patologías inflamatorias, como patologías infecciosas, neoplásicas o autoinmunes que afectan a los tejidos conjuntivos, en particular los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales.
- 45 23.- Derivados polisacáridicos para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** dichos derivados polisacáridicos son capaces de estimular la proliferación de fibroblastos en detrimento de los miofibroblastos.
- 24.- Derivados polisacáridicos según la reivindicación 23, **caracterizados porque** dichos derivados polisacáridicos se utilizan para prevenir o tratar los procesos de cicatrización hipertróficos o patologías fibróticas de los tejidos conjuntivos en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales.

- 25.- Derivados polisacáridicos para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados porque** dichos derivados polisacáridicos son capaces de estimular selectivamente la proliferación de las células medulares con vocación mesenquimatosa en detrimento de otras subpoblaciones en una población heterogénea de células, en particular en terapia tisular o celular.
- 5 26.- Composición farmacéutica o medicamento para utilización como cicatrizante de los tejidos conjuntivos, en particular de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales, que comprende derivados polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y un excipiente apropiado.
- 10 27.- Composición farmacéutica o medicamento para la utilización según la reivindicación 26, **caracterizado porque** se utiliza en asociación con uno o varios factores de crecimiento presentes en el seno de la composición farmacéutica o presentes en el seno de una composición farmacéutica distinta, siendo dichos factores de crecimientos en particular FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos), TGF, BMP (Proteínas morfogénicas de los huesos), CTGF (Factor de crecimiento de tejido conectivo).
- 15 28.- Composición farmacéutica o medicamento para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 27, caracterizado porque se presenta en forma de un gel, una crema, una pomada, una emulsión o una solución.
- 20 29.- Composición farmacéutica o medicamento para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 27, **caracterizado porque** se presenta en una forma inyectable, y en la cual dichos derivado polisacáridicos de baja masa molar y sulfatados presentan una masa molar comprendida entre 5.000 y 50.000 g/mol, de preferencia inferior o igual a 25.000 g/mol, un índice de polidispersidad comprendido entre 1,5 y 5, de preferencia inferior o igual a 2, y una tasa de sustitución en grupos sulfato comprendida entre 10 y 45% en peso, de preferencia comprendida entre 20 y 40% en peso, inclusivo.
- 30.- Dispositivo médico para la utilización como cicatrizante de los tejidos conjuntivos, especialmente de los tejidos conjuntivos dérmicos y gingivales, que comprende derivados polisacáridos de baja masa molar y sulfatados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.
- 25 31.- Dispositivo médico para la utilización según la reivindicación 30, **caracterizado porque** es reabsorbible o no, y se elige en el grupo consistente en soportes de liberación retardada, esponjas de disgregación lenta, o implantes quirúrgicos.

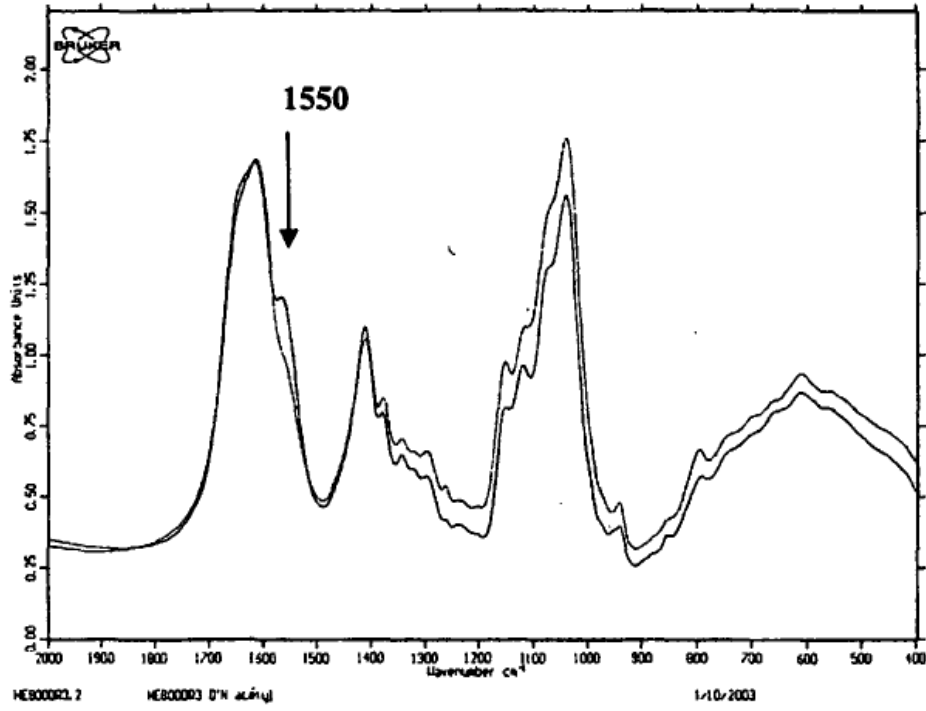


Figura 1



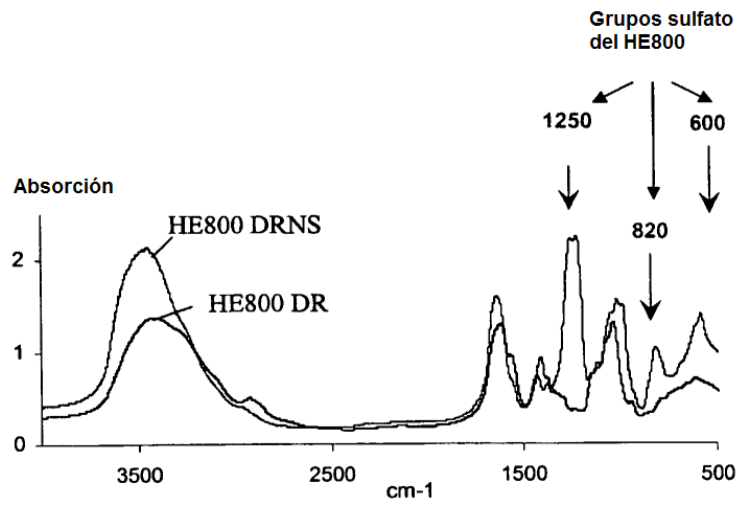


Figura 2

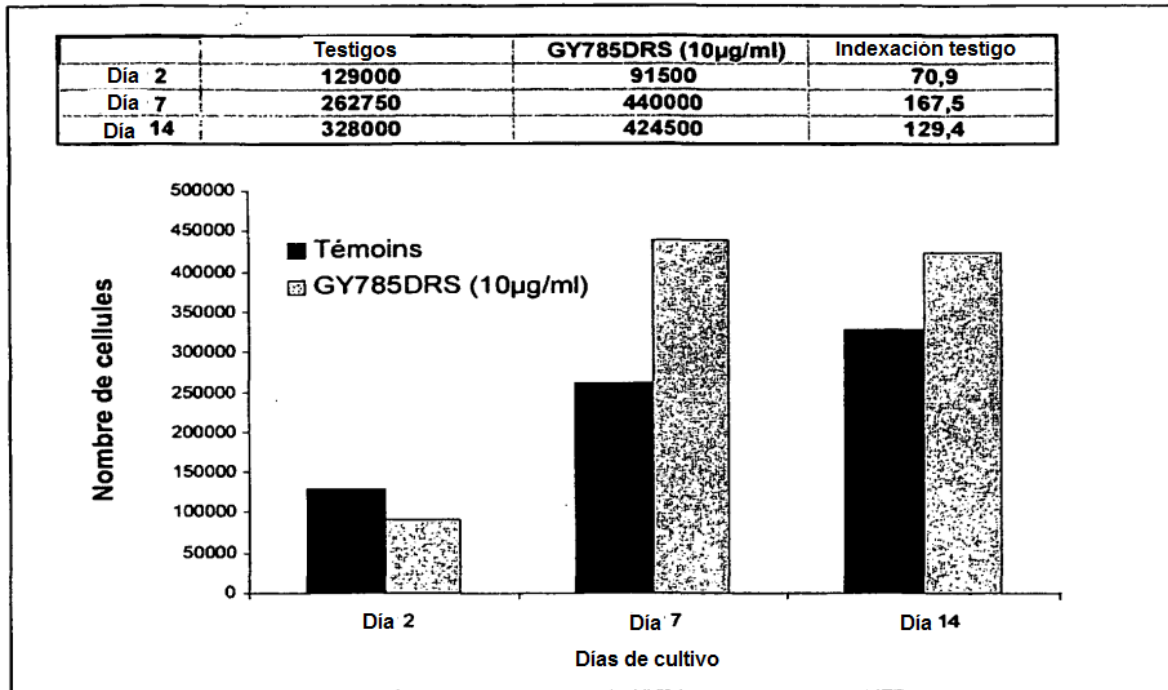
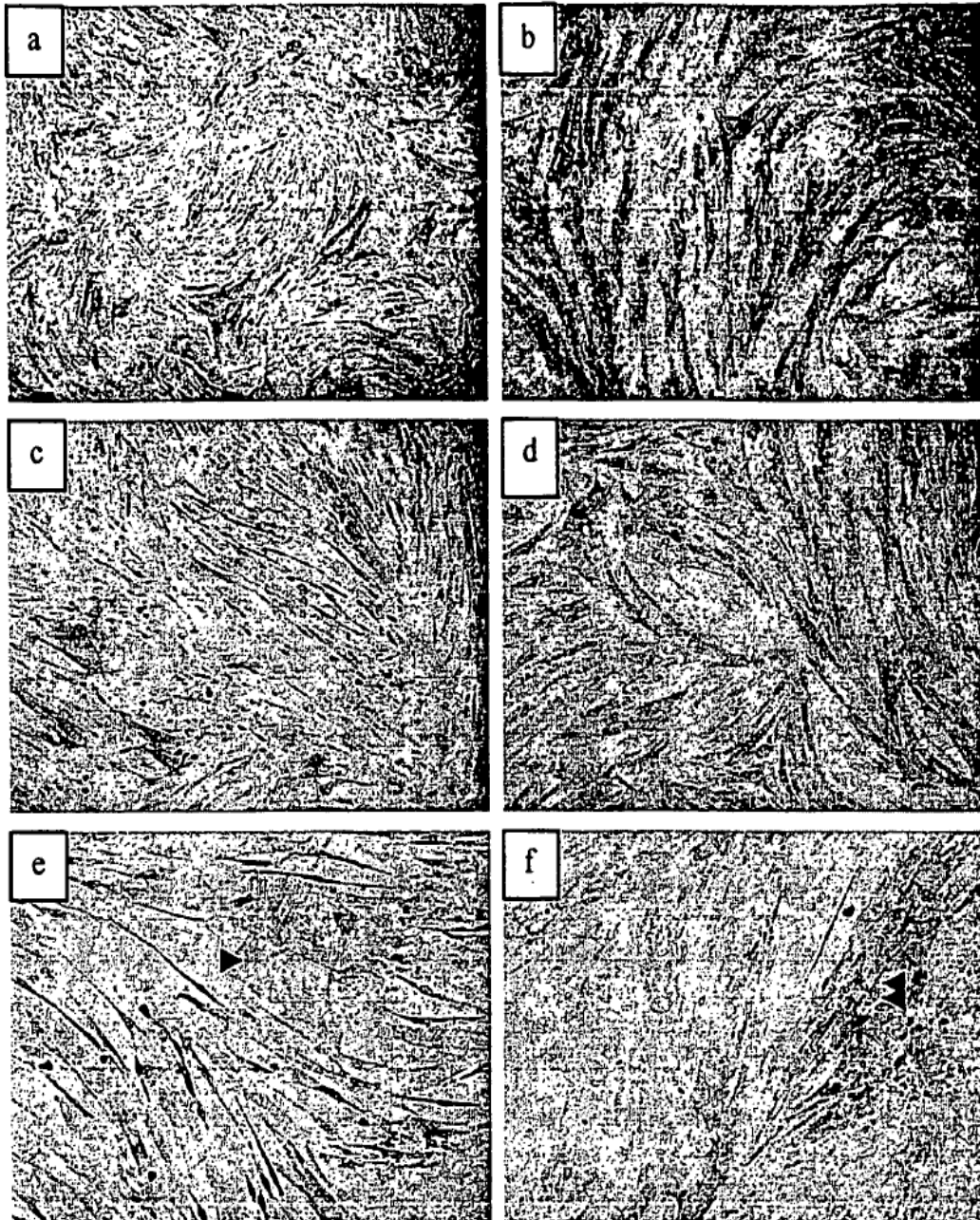


Figura 3



- Ampliaciones: a y b 13; c y d 26, e y f

- Inmuno detección de  $\alpha$ -SMA y contracoloración con hemalum

▶ Miofibroblasto aislado, ▶ Diferenciación terminal miofibroblástica

**Figura 4**

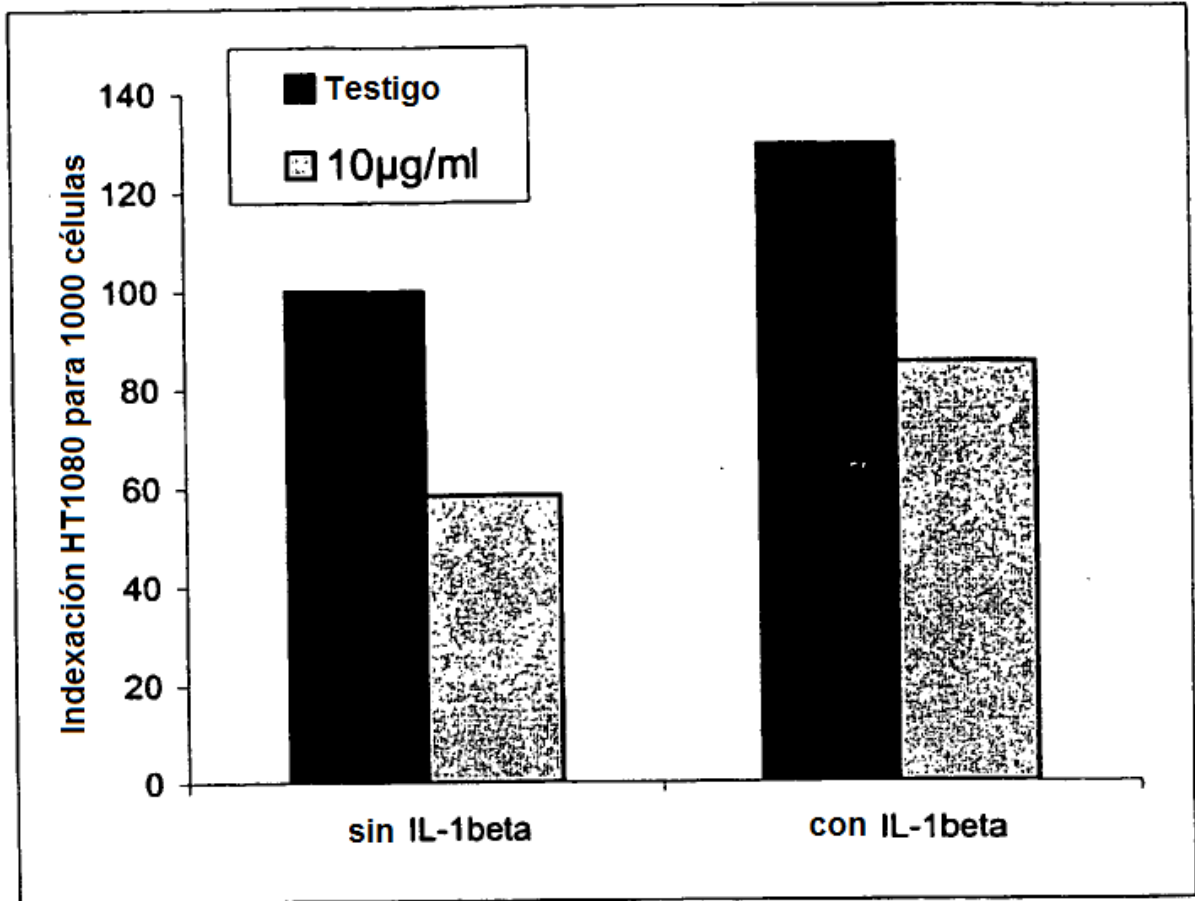
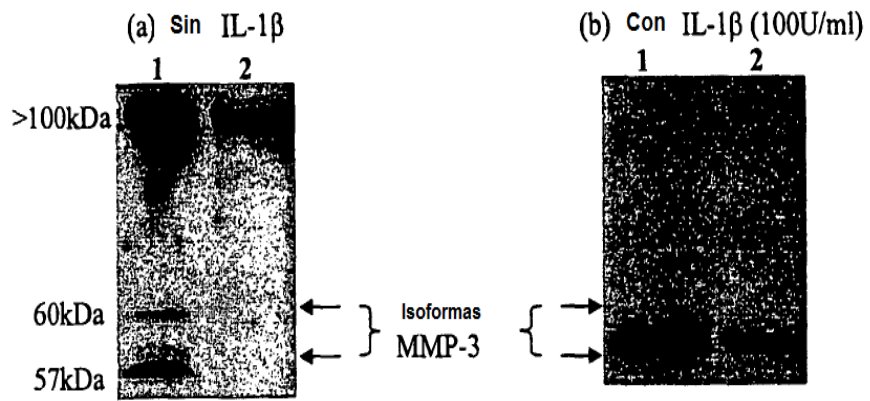


Figura 5



---

**Figura 6**