

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 322**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 31/721 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C08B 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009 E 09744446 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2344547**

54 Título: **Polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos sustituidos por un derivado de alcohol hidrófobo**

30 Prioridad:

06.10.2008 FR 0805506
06.10.2008 US 136816 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2015

73 Titular/es:

ADOCIA (100.0%)
115, Avenue Lacassagne
69003 Lyon, FR

72 Inventor/es:

SOULA, RÉMI;
SOULA, OLIVIER;
SOULA, GÉRARD y
CHARVET, RICHARD

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 527 322 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos sustituidos por un derivado de alcohol hidrófobo

5 La presente invención se refiere a nuevos polímeros biocompatibles a base de polisacáridos que contienen unos grupos funcionales carboxilos pudiendo ser útiles, en particular para la administración de principio(s) activo(s) (PA) a los seres humanos o a los animales con un fin terapéutico y/o profiláctico.

10 Los alcoholes hidrófobos presentan un interés en la formulación de principios activos farmacéuticos, en particular en razón de su biocompatibilidad y de su carácter hidrófobo permitiendo modular la hidrofobicidad de los polímeros sobre los cuales ellos pueden estar injertados.

Su biocompatibilidad es excelente dentro de la medida en la que ellos desempeñan un papel dentro de numerosos procesos bioquímicos y están presentes bajo forma esterificada dentro de la mayoría de los tejidos.

15 Sin embargo, es conocido por el experto en la materia que es difícil injertar un alcohol sobre un polisacárido que contiene los grupos funcionales carboxilos ya que es difícil ser selectivo entre las funciones hidroxilos del polisacárido y la función hidroxilo del alcohol hidrófobo. En el momento del injerto, los alcoholes del polímero pueden entrar en competición con el alcohol del injerto si no se desea recurrir a las técnicas de protección desprotección de los alcoholes del polímero y esta reacción secundaria conduce a la reticulación de las cadenas de polímero. Por lo tanto, los alcoholes hidrófobos de interés tales como el colesterol no se han podido injertar hasta la fecha sobre los polisacáridos que contienen unos grupos funcionales carboxilos.

25 Dellacherie *et al.* han puesto a punto los ésteres de polisacáridos, ya sean los alginatos, los hialuronatos (Pelletier, S. *et al.*, Carbohydr. Polym. 2000, 43, 343-349.) o los galacturonanos (Dellacherie, Edith *et al.*, Langmuir 2001, 17, 1384-1391.) mediante un método de síntesis que emplea los alfa halogenuros de alquilo, bromododecano y bromooctadecano. La síntesis de los ésteres consiste en sustituir los halogenuros por los carboxilatos de tetrabutilamonio. Este método permite acceder a los ésteres de los alcoholes hidrófobos pero él está limitado a los derivados halogenados alquílicos que pueden experimentar una sustitución nucleófila. Por lo tanto él no se puede poner en práctica para injertar los alcoholes hidrófobos tales como el colesterol. Además, estos derivados halogenados presentan riesgos de toxicidad y por lo tanto no se pueden poner en práctica de forma segura para el desarrollo de un producto farmacéutico.

35 Otros investigadores han evitado esta dificultad injertando los ácidos hidrófobos en el lugar de los alcoholes hidrófobos. Nichifor *et al.*, por ejemplo, han empleado el ácido cólico, un derivado esteroideo, para injertarlo directamente sobre los alcoholes del dextrano (Nichifor, Marieta *et al.*, Eur. Polym. J. 1999, 35, 2125-2129.). Este método evita el problema del colesterol empleando un derivado que presenta un ácido carboxílico capaz de reaccionar con los alcoholes del polisacárido. Sin embargo, el ácido cólico no está aprobado por la FDA para las inyecciones al contrario que el colesterol y esta estrategia no se ha podido poner en práctica con los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos.

45 Otros investigadores han empleado los polisacáridos no aniónicos con el fin de poder injertar los alcoholes hidrófobos. Akiyoshi *et al.*, por ejemplo, han convertido el colesterol, nucleófilo, en un derivado electrófilo (Biomacromolecules 2007, 8, 2366-2373). Este derivado electrófilo del colesterol se ha podido injertar sobre las funciones alcoholes del pululano o del manano, polisacáridos neutros. Esta estrategia no se pudo poner en práctica del mismo modo

con los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos.

Una revisión reciente de los polímeros funcionales a base de dextrano (Heinze, Thomas *et al.*, Adv Polym Sci 2006, 205, 199-291.) informó de modificaciones por los ácidos hidrófobos entre otros pero no informó de dextrans funcionalizados por los alcoholes hidrófobos. El documento de patente WO 2008/038111 A1 describe los dextrans funcionalizados por los aminoácidos hidrófobos destinados a ser utilizados en las composiciones farmacéuticas para la administración de principios activos.

La presente invención se refiere a nuevos derivados de polisacáridos anfifílicos que contienen los grupos funcionales carboxilos en parte sustituidos por al menos un derivado de alcohol hidrófobo. Estos nuevos derivados de polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos poseen una buena biocompatibilidad y su hidrofobicidad es fácilmente modulable sin alterar la biocompatibilidad.

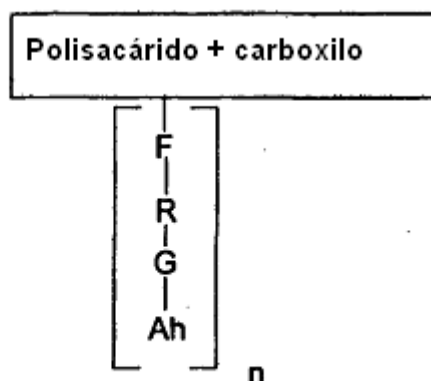
Ella se refiere igualmente a un método de síntesis que permite resolver los problemas de síntesis citados anteriormente. Este método ha permitido obtener los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos en parte sustituidos por los alcoholes hidrófobos incluyendo por ejemplo el colesterol.

La invención se refiere por lo tanto a los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos en los que uno al menos está sustituido por un derivado de alcohol hidrófobo, denominado Ah:

- estando dicho alcohol hidrófobo (Ah) injertado o unido al polisacárido aniónico por un brazo de acoplamiento R, estando unido dicho brazo de acoplamiento al polisacárido aniónico por una función F resultando dicha función F del acoplamiento entre la función amina del brazo de unión R y una función carboxilo del polisacárido aniónico, y estando dicho brazo de acoplamiento unido al alcohol hidrófobo por una función G resultante del acoplamiento entre una función carboxilo, isocianato, tioácido o alcohol del brazo de acoplamiento y una función del alcohol hidrófobo, estando las funciones carboxilos del polisacárido aniónico no sustituidas bajo forma de carboxilato de catión, preferentemente alcalino como Na⁺ o K⁺.
 - F siendo una función amida,
 - G siendo ya sea una función éster, tioéster, carbonato, carbamato,
 - R siendo una cadena que contiene entre 1 y 18 carbonos, eventualmente ramificada y/o insaturada, conteniendo eventualmente uno o varios heteroátomos, tales como O, N o/y S, y teniendo al menos una función ácida,
- Siendo Ah un resto de un alcohol hidrófobo, producto del acoplamiento entre la función hidroxilo del alcohol hidrófobo y al menos una función electrófila portada por el agrupamiento R,
- conteniendo dicho polisacárido los grupos funcionales carboxilos estando el anfifilo en un pH neutro.

En un modo de realización, G es una función éster.

Según la invención, el polisacárido que contiene los grupos funcionales carboxilos en parte sustituidos por los alcoholes hidrófobos es escogido entre los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos de fórmula general I:

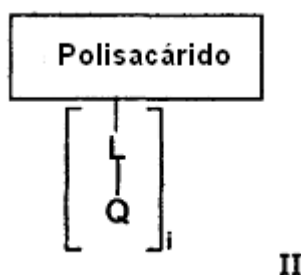


Fórmula I

- en la cual; n representa la fracción molar de las funciones carboxilos del polisacárido sustituidas por F-R-G-Ah y está comprendida entre 0,01 y 0,7,
- respondiendo F, R, G y Ah a las definiciones dadas anteriormente, y cuando la función carboxilo del polisacárido no está sustituida por F-R-G-Ah, entonces el o los grupos funcionales carboxilos del polisacárido son los carboxilatos de catión, preferentemente alcalinos como Na⁺ o K⁺.

En un modo de realización, los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos son los polisacáridos naturalmente portadores de grupos funcionales carboxilos y son escogidos entre el grupo constituido por el alginato, el hialuronano, el galacturonano.

En un modo de realización, los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos son los polisacáridos sintéticos obtenidos a partir de polisacáridos que contienen naturalmente los grupos funcionales carboxilos o a partir de polisacáridos neutros, sobre los cuales al menos 15 grupos funcionales carboxilos para 100 unidades sacarídicas han sido injertados, de fórmula general II.



- siendo escogidos los polisacáridos naturales entre el grupo de los polisacáridos constituidos mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,6) y/o (1,4) y/o (1,3) y/o (1,2),
- siendo L un enlace resultante del acoplamiento entre el brazo de unión Q y una función -OH del polisacárido y siendo ya sea una función éster, tionoéster, carbonato, carbamato o bien éter,
- i representa la fracción molar de los sustituyentes L-Q por unidad sacarídica del polisacárido
- siendo Q una cadena que comprende entre 1 y 18 carbonos, eventualmente ramificada y/o insaturada que contiene uno o varios heteroátomos, tales como O, N o/y S, y comprendiendo al menos un grupo funcional carboxilo, -CO₂H.

En un modo de realización, n está comprendido entre 0,05 y 0,5.

En un modo de realización el polisacárido está constituido mayormente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,6).

5 En un modo de realización, el polisacárido constituido principalmente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,6) es el dextrano.

En un modo de realización el polisacárido está constituido mayormente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,4).

10 En un modo de realización, el polisacárido constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,4) es escogido entre el grupo constituido por el pululano, el alginato, el hialuronano, el xilano, el galacturonano o una celulosa soluble en el agua.

En un modo de realización, el polisacárido es un pululano.

En un modo de realización, el polisacárido es un alginato.

En un modo de realización, el polisacárido es un hialuronano.

15 En un modo de realización, el polisacárido es un xilano.

En un modo de realización, el polisacárido es un galacturonano.

En un modo de realización, el polisacárido es una celulosa soluble en el agua.

En un modo de realización el polisacárido está constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,3).

20 En un modo de realización, el polisacárido constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,3) es un curdlano.

En un modo de realización el polisacárido está constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,2).

25 En un modo de realización, el polisacárido constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,2) es una inulina.

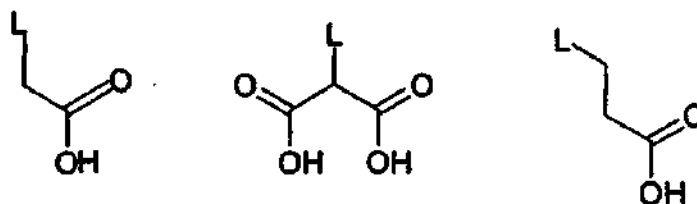
En un modo de realización el polisacárido está constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,4) y (1,3)

En un modo de realización, el polisacárido constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,4) y (1,3) es un glucano.

30 En un modo de realización el polisacárido está constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,4), y (1,3) y (1,2).

En un modo de realización el polisacárido constituido mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,4), y (1,3) y (1,2) es el manano.

35 En un modo de realización, el polisacárido según la invención se caracteriza porque el grupo Q es escogido entre los grupos siguientes:



En un modo de realización, i está comprendido entre 0,1 y 2.

En un modo de realización, i está comprendido entre 0,2 y 1,5.

5 En un modo de realización, el agrupamiento R según la invención se caracteriza porque él es escogido entre los aminoácidos.

En un modo de realización, los aminoácidos son escogidos entre los alfa aminoácidos.

En un modo de realización, los alfa aminoácidos son escogidos entre los alfa aminoácidos naturales.

10 En un modo de realización, los alfa aminoácidos naturales son escogidos entre la leucina, la alanina, la isoleucina, la glicina, la fenilalanina, el triptófano, la valina.

En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es escogido entre los alcoholes grasos.

En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es escogido entre los alcoholes constituidos por una cadena de alquilo insaturada o saturada, ramificada o no ramificada, que contiene de 4 a 18 carbonos.

15 En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es escogido entre los alcoholes constituidos por una cadena de alquilo insaturada o saturada, ramificada o no ramificada, que contienen de 6 a 18 carbonos.

20 En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es escogido entre los alcoholes constituidos por una cadena de alquilo insaturada o saturada, ramificada o no ramificada, que contienen de 8 a 16 carbonos.

En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es el octanol.

En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es el 2-etilbutanol.

En un modo de realización, el alcohol graso es escogido entre el miristilo, el cetilo, el estearilo, el cetearilo, el butilo, el oleilo, la lanolina.

25 En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es escogido entre los derivados del colesterol.

En un modo de realización, el derivado del colesterol es el colesterol.

En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es escogido entre los derivados del mentol.

30 En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es el mentol bajo su forma racémica.

En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es el isómero D del mentol.

En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es el isómero L del mentol.

En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es escogido entre los tocoferoles.

En un modo de realización, el tocoferol es el alfa tocoferol.

En un modo de realización, el alfa tocoferol es el racémico del alfa tocoferol.

En un modo de realización, el tocoferol es el isómero D del alfa tocoferol.

En un modo de realización, el tocoferol es el isómero L del alfa tocoferol.

5 En un modo de realización, el alcohol hidrófobo es escogido entre los alcoholes portadores de grupo arilo.

En un modo de realización, el alcohol portador de grupo arilo es escogido entre el alcohol bencílico, el alcohol fenetílico.

10 El polisacárido puede tener un grado de polimerización m comprendido entre 10 y 10000.

En un modo de realización, él tiene un grado de polimerización m comprendido entre 10 y 1000.

En otro modo de realización, él tiene un grado de polimerización m comprendido entre 10 y 500.

15 La invención se refiere igualmente a la síntesis de los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos en parte sustituidos según la invención.

20 Dicha síntesis comprende una etapa de obtención de un compuesto intermedio aminado Ah-G-R-NH₂ o de una sal de amonio Ah-G-R-NH₃⁺ cuyo contraión es un anión escogido entre todos halogenuros, los sulfatos, los sulfonatos, los carboxilatos, y una etapa de injerto de este compuesto intermedio aminado sobre una función carboxilo de un polisacárido, R, G y Ah respondiendo a las definiciones dadas anteriormente.

25 En un modo de realización una etapa de funcionalización del polisacárido por al menos 15 grupos funcionales carboxilos para 100 unidades de sacarídicos se efectúa por injerto de compuestos de fórmula Q-L', L' siendo una función anhídrido, halogenuro, ácido carboxílico, tioácido o isocianato sobre al menos 15 funciones alcohol para 100 unidades sacarídicas del polisacárido, Q y L respondiendo a las definiciones dadas anteriormente.

30 En un modo de realización, el compuesto intermedio aminado de fórmula Ah-G-R-NH₂ o Ah-G-R-NH₃⁺ se obtiene por reacción de un compuesto de fórmula G'-R-NH₂, siendo G' una función ácido carboxílico, isocianato, tioácido, o alcohol con la función alcohol del alcohol hidrófobo, respondiendo R, G y Ah a las definiciones dadas anteriormente.

Si fuera necesario en esta etapa de obtención del compuesto intermedio aminado, se utilizan las técnicas de protección, desprotección bien conocidas por el experto en la materia en síntesis peptídica.

35 Preferentemente, la etapa de injerto del compuesto intermedio aminado sobre una función ácida del polisacárido se realiza en medio orgánico.

La invención se refiere igualmente a la utilización de los polisacáridos funcionalizados según la invención para la preparación de composiciones farmacéuticas tales como las que se han descrito anteriormente.

40 La invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica que contiene el uno de los polisacáridos según la invención tal como se ha descrito anteriormente y al menos un principio activo.

La invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica según la invención tal como se ha descrito anteriormente caracterizada porque el principio activo es escogido entre el grupo constituido por las proteínas, las glicoproteínas, los péptidos y las moléculas terapéuticas no peptídicas.

5 Se entiende por principio activo un producto bajo forma de entidad química única o bajo forma de una combinación que posee una actividad fisiológica. Dicho principio activo puede ser exógeno es decir que él es proporcionado por la composición según la invención. Él puede ser igualmente endógeno, por ejemplo los factores de crecimiento que se van a segregar en una herida durante la primera fase de cicatrización y que podrán ser retenidos sobre dicha herida
10 por la composición según la invención.

Según las patologías previstas ella está destinada a un tratamiento local o sistémico.

En el caso de las liberaciones local y sistémica, los modos de administración previstos son por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, transdérmica, intramuscular, oral, nasal, vaginal, ocular, bucal y pulmonar.

15 Las composiciones farmacéuticas según la invención se presentan ya sea bajo forma líquida, en solución acuosa, ya sea bajo forma de polvo, de implante o bien de película. Ellas contienen además los excipientes farmacéuticos clásicos bien conocidos por el experto en la materia.

20 En función de las patologías y de los modos de administración las composiciones farmacéuticas podrán contener ventajosamente, además, los excipientes que permiten formularlas bajo forma de gel, de esponja, de solución inyectable, de solución bebible y de lyoc.

25 La invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica según la invención tal como se ha descrito anteriormente, caracterizada porque ella es administrable bajo forma de endoprótesis vascular (stent), de película o de «revestimiento» de biomateriales implantables, de implante.

Ejemplo 1 : Síntesis de dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el leucinato de colesterol

El leucinato de colesterol, sal del ácido paratoluenosulfónico se obtiene según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

30 8 g (ya sean 148 mmol de funciones hidroxilos) de dextrano de masa molar media en peso de aproximadamente 40 kg/mol (Fluka) se solubilizan en el agua a 42 g/l. A esta solución se añaden 15 ml de NaOH 10 N (148 mmol de NaOH). La mezcla se lleva a 35 °C después se añaden 23 g (198 mmol) de cloroacetato de sodio. La temperatura del medio de reacción se
35 lleva de 60 °C a 0,5 °C/min después de mantenerlo a 60 °C durante 100 minutos. El medio de reacción se diluye con 200 ml de agua, se neutraliza con el ácido acético y se purifica por ultrafiltración sobre membrana de PES de 5 kD frente a 6 volúmenes de agua. La solución final se analiza por extracto seco para determinar la concentración en polímero; después se analiza por dosificación ácido/base en el agua/cetona a 50 / 50 (V/V) para determinar el grado de sustitución en metilcarboxilatos.

40 Según el extracto seco : [polímero] = 31,5 mg/g

Según la dosificación ácido/base : el grado de sustitución de las funciones hidroxilos por las funciones metilcarboxilatos es de 1,04 por motivo sacarídico.

45 La solución de dextranometilcarboxilato de sodio se pasa sobre una resina de Purolite (aniónica) para obtener el ácido dextranometilcarboxílico que a continuación se liofiliza durante 18 horas.

8 g de ácido dextranometilcarboxílico (37 mmol de función de ácido metilcarboxílico) se solubilizan en la DMF a 45 g/l después se enfría a 0 °C. Se ponen 0,73 g de leucinato de colesterol, sal de ácido paratoluenosulfónico (1 mmol) en suspensión en la DMF a 100 g/l. A continuación se añaden 0,11 g de trietilamina (1 mmol) a esta suspensión. Una vez que la solución de polímero está a 0 °C, se añaden a continuación 0,109 g (1 mmol) de NMM y 0,117 g (1 mmol) de EtOCOCl. Después de 10 min de reacción, se añade la suspensión de leucinato de colesterol. A continuación el medio se mantiene a 4 °C durante 15 minutos. El medio se calienta a continuación a 30 °C. Una vez a 30 °C, el medio se vierte a continuación en una solución de 3,76 g de NMM (37 mmol) a 5 g/l bajo agitación viva. La solución se ultrafiltra sobre membrana de PES de 10 kD frente a 10 volúmenes de solución de NaCl al 0,9 % con 5 volúmenes de agua. La concentración de la solución de polímero se determina por extracto seco. Una fracción de solución se liofiliza y analiza por RMN en D₂O para determinar el índice de funciones ácidas convertidas en amida de leucinato de colesterol.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 12,9 mg/g

Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el leucinato de colesterol por unidad de sacárido es de 0,03.

Ejemplo 2 : Síntesis de dextranosuccinato de sodio modificado por el leucinato de colesterol

El leucinato de colesterol, sal del ácido paratoluenosulfónico se obtiene según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

El dextranosuccinato de sodio se obtiene a partir del dextrano 40 según el método descrito en el artículo de Sanchez-Chaves *et al.* (Sanchez-Chaves, Manuel *et al.*, Polymer 1998, 39 (13), 2751-2757). El índice de funciones ácidas por unidad glicosídica (i) es de 1,46 según la RMN ¹H en D₂O/NaOD.

La solución de dextranosuccinato de sodio se pasa sobre una resina de Purolite (aniónica) para obtener el ácido dextranosuccínico que a continuación se liofiliza durante 18 horas.

7,1 g de ácido dextranosuccínico (23 mmol) se solubilizan en la DMF a 44 g/l. La solución se enfría a 0 °C. Se ponen 0,77 g de leucinato de colesterol, sal de ácido paratoluenosulfónico (1 mmol) en suspensión en la DMF a 100 g/l. A continuación se añaden 0,12 g de trietilamina (TEA) (1 mmol) a esta suspensión. Una vez que la solución de polímero está a 0 °C, se añaden a continuación 0,116 g (1 mmol) de NMM y 0,124 g (1 mmol) de EtOCOCl. Después de 10 min de reacción, se añade la suspensión de leucinato de colesterol. A continuación el medio se mantiene a 4 °C durante 15 minutos. El medio se calienta a continuación a 30 °C. Una vez a 30 °C, el medio se vierte entonces en una solución de 3,39 g de NMM (33 mmol) a 5 g/l bajo agitación viva. La solución se ultrafiltra sobre membrana de PES de 10 kD frente a 10 volúmenes de solución de NaCl al 0,9 % con 5 volúmenes de agua. La concentración de la solución de polímero se determina por extracto seco. Una fracción de la solución se liofiliza y analiza por RMN ¹H en D₂O para determinar el índice de funciones ácidas convertidas en amida de leucinato de colesterol.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 17,5 mg/g

Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el leucinato de colesterol por unidad de sacárido es de 0,05.

Ejemplo 3 : Síntesis de pululanosuccínocarboxilato de sodio modificado por el

leucinato de colesterol

El leucinato de colesterol, sal del ácido paratoluenosulfónico se obtiene según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

5 10 g de pululano de masa molar media en peso de aproximadamente 100 kg/mol (Fluka) se solubilizan en el DMSO a una concentración de 400 mg/g a 60 °C. Esta solución se equilibra a 40 °C según dos soluciones de DMF que contienen 9,27 g de anhídrido succínico (371 g/l) y 9,37 g de NMM (375 g/l) se añaden a la solución de pululano. El tiempo de reacción es de 240 min a partir de la adición de la solución de NMM. La solución obtenida de este modo se diluye en 1 l de agua y se ultrafiltra sobre membrana de PES de 10 kD frente a una solución de cloruro sódico al 0,9 % después frente al agua bidestilada. La concentración de pululanosuccínico-carboxilato de sodio en la solución final se determina por extracto seco y el producto seco se analiza por RMN ¹H en D₂O/NaOD para determinar el índice de funciones hidroxilos convertidas en éster succínico por unidad de sacárido.

Según el extracto seco : [pululanosuccínico-carboxilato] = 15,8 mg/g

15 Según la RMN ¹H : la fracción molar de los alcoholes portadores de un succinate de sodio por unidad de sacárido es de 1,35.

La solución de pululanosuccínico-carboxilato de sodio se acidifica sobre una resina de Purolite (aniónica) después se liofiliza a continuación durante 18 horas.

20 5 g de ácido pululanosuccínico se solubilizan en la DMF a 51 g/l. La solución se enfría a 0 °C. A continuación se añaden 0,08 g de NMM y 0,08 g de EtOCOCI. Después de 10 min de reacción, se añade una suspensión que contiene 0,51 g de leucinato de colesterol, sal de ácido paratoluenosulfónico (APTS) y 0,08 g de TEA en 5,1 ml de DMF. El tiempo de injerto es de 20 min después de la introducción del derivado de colesterol. El medio se calienta a continuación a 30 °C después se vierte en una solución acuosa de NMM (2,09 g a 5 mg/ml). La solución obtenida se diluye añadiendo 100 ml de agua después de diafiltración sobre membrana de PES de 10 kD frente a una solución de cloruro sódico al 0,9 % después frente al agua bidestilada. La concentración de pululanosuccínico-carboxilato de sodio modificado por el leucinato de colesterol en la solución final se determina por extracto seco y el producto seco se analiza por RMN ¹H en D₂O/NaOD para determinar el índice de funciones ácidas convertidas en amida de leucinato de colesterol.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 2,9 mg/g

Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el leucinato de colesterol por unidad sacarídica es de 0,04.

35 **Ejemplo 4 : Síntesis de pululanosuccínico-carboxilato de sodio modificado por el alaninato de alcohol cetílico**

El alaninato de alcohol cetílico se obtiene según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

40 Una solución de pululanosuccínico-carboxilato de sodio obtenida como se ha descrito en el ejemplo 3 se acidifica sobre una resina de Purolite (aniónica) después se liofiliza a continuación durante 18 horas.

45 5 g de ácido pululanosuccínico se solubilizan en la DMF a 51 g/l. La solución se enfría a 0 °C. A continuación se añaden 0,32 g de NMM (3,2 mmol) y 0,32 g de EtOCOCI (3,2 mmol). Después de 10 min de reacción, se añade una suspensión que contiene 1,55 g de alaninato de alcohol cetílico, sal de ácido paratoluenosulfónico (3,2 mmol) y 0,32 g de TEA (3,2 mmol) en 20,4 ml de DMF. El tiempo de injerto es de 20 min después de la introducción del derivado de

alcohol cetílico. El medio se calienta a continuación a 30 °C después se vierte en una solución acuosa de NMM (8,36 g a 5 mg/ml). La solución obtenida se diluye añadiendo 100 ml de agua después se diafiltra sobre membrana de PES de 10 kD frente a una solución de cloruro de sodio al 0,9 % después frente al agua bidestilada. La concentración de pululanossuccinocarboxilato de sodio modificada por el alaninato de alcohol cetílico en la solución final se determina por extracto seco y el producto seco se analiza por RMN ¹H en D₂O/NaOD para determinar el índice de funciones ácidas convertidas en amida de alaninato de alcohol cetílico.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 5,2 mg/g

10 Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el alaninato de alcohol cetílico por unidad de sacárido es de 0,18.

Ejemplo 5 : Síntesis de dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el alaninato de dodecanol

15 El alaninato de dodecanol, sal de ácido paratoluenosulfónico es obtenido según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

Una solución de dextranometilcarboxilato de sodio obtenido como se ha descrito en el ejemplo 1 se pasa sobre una resina de Purolite (aniónica) para obtener el ácido dextranometilcarboxílico que a continuación se liofiliza durante 18 horas.

20 5 g de ácido dextranometilcarboxílico (23,2 mmol de función de ácido metilcarboxílico) son solubilizados en la DMF a 45 g/l después se enfría a 0 °C. 1,99 g de alaninato de dodecanol, sal de ácido paratoluenosulfónico (4,6 mmol) es puesto en suspensión en la DMF a 100 g/l. A continuación se añaden 0,47 g de trietilamina (4,6 mmol) a esta suspensión. Una vez que la solución de polímero está a 0 °C, entonces se añaden 2,35 g (23,2 mmol) de NMM y 2,52 g (23,2 mmol) de EtOCOCl. Después de 10 min de reacción, se añade la suspensión de alaninato de dodecanol. A continuación el medio se mantiene a 4 °C durante 15 minutos. El medio se calienta a continuación a 30 °C. Una vez a 30 °C, se añade una solución de imidazol (3,2 g en 9,3 ml de agua) en el medio de reacción. La solución de polímeros se ultrafiltra sobre membrana de PES 10 kD frente a 10 volúmenes de solución de NaCl al 0,9 % y además 5 volúmenes de agua. La concentración de la solución de polímero se determina por extracto seco. Una fracción de solución se liofiliza y analiza por RMN ¹H en D₂O para determinar el índice de funciones ácidas modificadas por el alaninato de dodecanol.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 22 mg/g

Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el alaninato de dodecanol por unidad sacarídica es de 0,19.

35 **Ejemplo 6: Síntesis de dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el glicinato de L-mentol**

El glicinato de L-mentol, sal de ácido paratoluenosulfónico es obtenido según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

40 El aceite obtenido que contiene las impurezas, la sal de amina es neutralizada por una adición estequiométrica de sosa, y extraída con el diisopropilo de éter. La fase orgánica es acidificada entonces con una solución de HCl en el éter etílico y la sal de HCl del derivado mentolado extraído con el agua. Después de la liofilización, se obtiene el glicinato de L-mentol, sal del ácido clorhídrico.

45 Una solución de dextranometilcarboxilato de sodio obtenida como se ha descrito en el ejemplo 1 se pasa sobre una resina de Purolite (aniónica) para obtener el ácido

dextranometilcarboxílico que entonces se liofiliza durante 18 horas.

12 g de ácido dextranometilcarboxílico (59,22 mmol en función de ácido metilcarboxílico) se solubilizan en la DMF a 60 g/l después se enfría a 0 °C. 1,32 g de glicinato de L-mentol, sal del ácido clorhídrico (5,29 mmol) se ponen en suspensión en la DMF a 100 g/l. A continuación se añaden 0,54 g de trietilamina (5,29 mmol) a esta suspensión. Una vez que la solución de polímero está a 0 °C, se añaden a continuación una solución de NMM (6,59 g, 65,1 mmol) en la DMF (530 g/l) y 7,07 g (65,1 mmol) de EtOCOCl. Después de 10 minutos de reacción, se añade la suspensión de glicinato de L-mentol. A continuación el medio se mantiene a 10 °C durante 45 minutos. El medio se calienta a continuación a 50 °C. Una solución de imidazol (14,7 g en 22 ml de agua) y 65 ml de agua se añaden en el medio de reacción. La solución de polímero se ultrafiltra sobre membrana de PES 10 kD frente a 6 volúmenes de solución de NaCl al 0,9 %, 4 volúmenes de Sosa 0,01 N, 7 volúmenes de solución de NaCl al 0,9 % con 3 volúmenes de agua. La concentración de la solución de polímero se determina por extracto seco. Una fracción de solución es liofilizada y analizada por RMN ¹H en D₂O para determinar el índice de funciones ácidas convertidas en amida de glicinato de L-mentol.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 25,7 mg/g

Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el glicinato de L-mentol por unidad sacarídica es de 0,09.

20 **Ejemplo 7 : Síntesis de dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el alaninato de (±)α-tocoferol**

El alaninato de (±)α-tocoferol, sal del ácido clorhídrico se obtiene según el procedimiento descrito en J. Pharm. Sci. 1995, 84 (1), 96-100.

25 Por un procedimiento similar al que se ha descrito en el ejemplo 6, es obtenido un dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el alaninato de (±)α-tocoferol.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 28,1 mg/g

Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el alaninato de (±)α-tocoferol por unidad sacarídica es de 0,04.

30 **Ejemplo 8: Síntesis de dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el glicinato de octanol**

El glicinato de octanol, sal de ácido paratoluenosulfónico es obtenido según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

Por un procedimiento similar al que se ha descrito en el ejemplo 6, se obtiene un dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el glicinato de octanol.

35 Según el extracto seco : [polímero modificado] = 34,1 mg/g

Según con la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el glicinato de octanol por unidad sacarídica es de 0,27.

Ejemplo 9: Síntesis de dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el fenilalaninato de octanol

40 El fenilalaninato de octanol, sal de ácido paratoluenosulfónico es obtenido según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

Por un procedimiento similar al que se ha descrito en el ejemplo 6, es obtenido un

dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el fenilalaninato de octanol.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 30,2 mg/g

Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el fenilalaninato de octanol por unidad sacarídica es de 0,09.

5 Ejemplo 10: Síntesis de dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el fenilalaninato de alcohol bencílico

Por un procedimiento similar al que se ha descrito en el ejemplo 6, se obtiene un dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el fenilalaninato de alcohol bencílico utilizando el fenilalaninato de alcohol bencílico, sal del ácido clorhídrico (Bachem).

10 Según el extracto seco : [polímero modificado] = 47,7 mg/g

Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el feniloalaninato de alcohol bencílico por unidad sacarídica es de 0,41.

Ejemplo 11 : Síntesis de dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el fenilalaninato de isohexanol.

15 El fenilalaninato de isohexanol, sal del ácido paratolueno sulfónico se obtiene según el procedimiento descrito en la patente (Kenji, M *et al.*, patente de Estados Unidos US4826818).

Por un procedimiento similar al que se ha descrito en el ejemplo 6, se obtiene un dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el fenilalaninato de isohexanol.

Según el extracto seco : [polímero modificado] = 29,8 mg/g

20 Según la RMN ¹H : la fracción molar de los ácidos modificados por el fenilalaninato de isohexanol por unidad sacarídica es de 0,18.

Ejemplo 12 : Solubilización de un liofilizado de BMP-2.

25 Se ha desarrollado un ensayo de solubilización de un liofilizado de Proteína Morfogenética Ósea 2 (BMP-2) con el fin de poner en evidencia el poder de solubilización de diferentes polímeros a pH fisiológico. La BMP-2 se solubiliza en un tampón que contiene la sacarosa (Sigma), la glicina (Sigma), el ácido glutámico (Sigma), el cloruro de sodio (Riedel-de-Haën), el polisorbato 80 (Fluka). El pH de esta solución se ajusta a pH 4,5 por adición de sosa después de que la solución esté liofilizada. 283,2 mg de liofilizado contienen aproximadamente 12 mg de BMP-2.

30 Los polímeros según la invención se ponen en práctica en este ensayo. A título comparativo, un polímero descrito en la solicitud de patente FR0702316 se pone igualmente en práctica en este ensayo, el dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el fenilalaninato de etilo.

35 El ensayo consiste en introducir alrededor de exactamente 4 mg de liofilizado que contiene 0,168 mg de BMP-2. A continuación, el liofilizado se recupera con 210 µl de una solución acuosa para alcanzar una concentración final de BMP-2 de 0,8 mg/ml a pH fisiológico, siendo la concentración final de polímero de 5 mg/ml.

El aspecto visual de la solución se indica después de 5 minutos de agitación a velocidad reducida sobre rodillo.

40 Los resultados para diferentes soluciones se agrupan en la tabla siguiente:

Solución	Aspecto visual	pH
Agua	nítido	4,3
Ejemplo 9	nítido	7,4
Ejemplo 8	nítido	7,5
Ejemplo 5	nítido	7,4
Contra-ejemplo FR0702316	turbio	7,5

La adición de agua conduce a una solución nítida de BMP-2 pero a un pH ácido.

5 Este ensayo permite poner en evidencia la mejora de la solubilización de la BMP-2 a un pH fisiológico por los polímeros según la invención. Por el contrario, el dextranometilcarboxilato de sodio modificado por el fenilalaninato de etilo no permite obtener una solución nítida de BMP-2.

REIVINDICACIONES

1. Polisacárido que contiene los grupos funcionales carboxilos en los que uno al menos está sustituido por un derivado de alcohol hidrófobo, denominado Ah:

5 • estando dicho alcohol (Ah) injertado o unido al polisacárido aniónico por un brazo de acoplamiento R, estando dicho brazo de acoplamiento unido al polisacárido aniónico por una función F resultando dicha función F del acoplamiento entre la función amina del brazo de unión R y una función carboxilo del polisacárido aniónico, y estando dicho brazo de acoplamiento unido al alcohol hidrófobo por una función G resultante del acoplamiento entre una función carboxilo, isocianato, tioácido o alcohol del brazo de acoplamiento y una función del alcohol hidrófobo, estando las funciones carboxilos del polisacárido aniónico no sustituidas bajo forma de carboxilato de catión.

- F siendo una función amida,

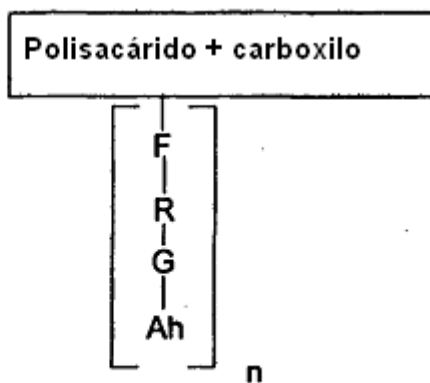
- G siendo ya sea una función éster, tioéster, carbonato, carbamato,

15 - R siendo una cadena que contiene entre 1 y 18 carbonos, eventualmente ramificada y/o insaturada, conteniendo eventualmente uno o varios heteroátomos, y teniendo al menos una función ácida,

• siendo Ah un resto de un alcohol hidrófobo, producto del acoplamiento entre la función hidroxilo del alcohol hidrófobo y al menos una función electrófila portada por el agrupamiento R.

20 conteniendo dicho polisacárido los grupos funcionales carboxilos estando el anfífilo en un pH neutro.

2. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** él es escogido entre los polisacáridos que contienen los grupos funcionales carboxilos en los que uno al menos está sustituido por un derivado de alcohol hidrófobo, de fórmula general I:



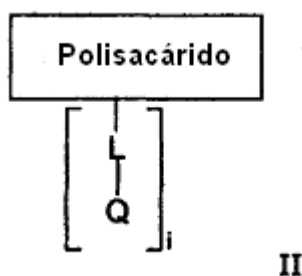
Fórmula I

- en la que, n representa la fracción molar de las funciones carboxilos del polisacárido sustituidas por F-R-G-Ah y está comprendida entre 0,01 y 0,7,

30 -F, R, G y Ah respondiendo a las definiciones dadas anteriormente, y cuando una de las funciones carboxilos del polisacárido no están sustituidas por F-R-G-Ah, entonces la o las funciones carboxilos del polisacárido son los carboxilatos de catión.

3. Polisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el polisacárido aniónico es naturalmente portador de funciones ácidas y es escogido entre el grupo constituido por el alginato, el hialuronano, el galacturonano.

5 4. Polisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el polisacárido aniónico es un polisacárido aniónico sintético obtenido a partir de un polisacárido natural aniónico o no aniónico (neutro) sobre el cual ha sido injertada al menos una función ácida de fórmula general II.



10 -siendo escogido el polisacárido natural entre el grupo de los polisacáridos constituidos mayoritariamente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,6) y/o (1,4) y/o (1,3) y/o (1,2),

15 -siendo L un enlace resultante del acoplamiento entre el brazo de unión Q y una función -OH del polisacárido neutro o aniónico, siendo ya sea una función éster, tionoéster, carbonato, carbamato o bien éter,

-siendo Q una cadena que contiene entre 1 y 18 carbonos, eventualmente ramificada y/o insaturada que contiene uno o varios heteroátomos, y poseyendo al menos una función ácida, CO₂H.

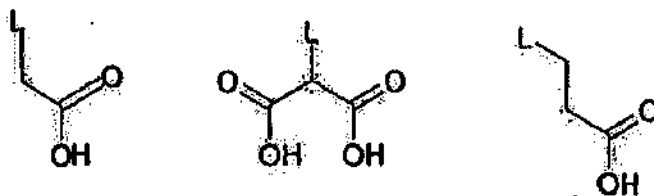
20 5. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** el polisacárido está constituido mayormente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,6).

25 6. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el polisacárido que está constituido mayormente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,6) es el dextrano.

30 7. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** el polisacárido está constituido mayormente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,4).

35 8. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** el polisacárido constituido mayormente por monómeros glicosídicos unidos por las uniones glicosídicas de tipo (1,4) es escogido entre el grupo constituido por el pululano, el alginato, el hialuronano, el xilano, el galacturonano o una celulosa soluble en el agua.

9. Polisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, **caracterizado porque** el grupo Q es escogido entre los grupos siguientes:



5

10. Polisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el agrupamiento R es escogido entre los aminoácidos.

11. Polisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** el agrupamiento R es escogido entre los alfa aminoácidos.

10

12. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** los alfa aminoácidos son escogidos entre los alfa aminoácidos naturales.

13. Polisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el alcohol hidrófobo es escogido entre los alcoholes grasos.

15

14. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** el alcohol hidrófobo es escogido entre los alcoholes constituidos por una cadena de alquilo insaturada o saturada que contiene de 4 a 18 carbonos.

20

15. Polisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** el alcohol graso es escogido entre el miristilo, el cetilo, el estearilo, el cetearilo, el butilo, el oleílo, la lanolina.

16. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** el alcohol hidrófobo es el colesterol.

25

17. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** el alcohol hidrófobo es el mentol.

30

18. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** el alcohol hidrófobo es escogido entre los tocoferoles.

19. Polisacárido de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** el alcohol hidrófobo es escogido entre los alcoholes portadores de grupo arilo.
- 5 20. Utilización de un polisacárido funcionalizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la preparación de composiciones farmacéuticas.
21. Composición farmacéutica que contiene un polisacárido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y al menos un principio activo.
- 10 22. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 21, **caracterizada porque** el principio activo es escogido entre el grupo constituido por las proteínas, las glicoproteínas, los péptidos y las moléculas terapéuticas no peptídicas.

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

5 En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPO no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

Documentos de patente indicados en la descripción

- 10
- WO 2008038111 A1 [0008]
 - US 4826818 A, Kenji, M [0080] [0088] [0094] [0102] [0107] [0112] [0122] [0126] [0133]
 - FR 0702316 [0138] [0141]

Bibliografía no especificada en la descripción

- PELLETIER, S. et al. *Carbohydr. Polym.*, 2000, vol. 43, 343-349 [0005]
- DELLACHERIE, EDITH et al. *Langmuir*, 2001, vol. 17, 1384-1391 [0005]
- NICHIFOR, MARIETA et al. *Eur. Polym. J.*, 1999, vol. 35, 2125-2129 [0006]
- *Biomacromolecules*, 2007, vol. 8, 2366-2373 [0007]
- HEINZE, THOMAS et al. *Adv Polym Sci*, 2006, vol. 205, 199-291 [0008]
- SANCHEZ-CHAVES, MANUEL et al. *Polymer*, 1998, vol. 39 (13), 2751-2757 [0089]
- *J. Pharm. Sci.*, 1995, vol. 84 (1), 96-100 [0118]