

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 552 218**

(51) Int. Cl.:

C07H 3/06 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2005 E 05706657 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 1736160**

(54) Título: **Oligosacáridos de algina y derivados de los mismos, así como fabricación y uso de los mismos**

(30) Prioridad:

24.03.2004 CN 200410023827

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

26.11.2015

(73) Titular/es:

**OCEAN UNIVERSITY OF CHINA (100.0%)
5, YUSHAN ROAD
QINGDAO, SHANDONG 266003, CN**

(72) Inventor/es:

**GENG, MEIYU;
XIN, XIANLIANG y
SUN, GUANGQIANG**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 552 218 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

Oligosacáridos de algina y derivados de los mismos, así como fabricación y uso de los mismos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un oligosacárido de alginato y derivados del mismo, a la preparación de los mismos, y a los usos de los mismos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) y de la diabetes.

10 Antecedentes

La EA y la diabetes son enfermedades actualmente comunes y que ocurren con frecuencia poniendo en serio peligro la salud de los seres humanos. En particular, su incidencia está aumentando con el crecimiento de la población de personas mayores. Por tanto, la profilaxis y el tratamiento de estas enfermedades son cada vez más críticos.

15 Es muy poco probable que los fármacos preventivos y terapéuticos actuales para la EA revolucionen el tratamiento de la EA debido a su limitación al simple alivio de los síntomas o a sus graves efectos secundarios. Los fármacos usados habitualmente para la diabetes son principalmente la insulina y otros fármacos hipoglucemiantes orales, la mayoría de los cuales presentan desventajas en cuanto a lo incómodo de su uso y a su toxicidad. En particular, no 20 hay fármacos realmente eficaces para la diabetes tipo 2. Se ha descubierto que la incidencia de la EA y la diabetes tipo 2 está relacionada con el depósito de la beta amiloide ($A\beta$) y de la amilina (IAAP), la fibrilogénesis posterior y el aumento de radicales libres oxidativos, lo que da lugar al hecho de que la inhibición de la formación de fibrillas de beta amiloide y amilina se convierta en la perspectiva para la profilaxis y el tratamiento de estas enfermedades.

25 Los alginatos son los componentes principales de las paredes celulares de las algas marrones, que son polisacáridos aniónicos lineales compuestos por ácido β -D-manurónico (ManA) y ácido α -L-gulurónico (GulA), unidos mediante enlaces 1-4 glucosídicos. Los alginatos pertenecen a los polímeros grandes con un peso molecular de varios 10^4 a 10^6 con abundantes fuentes. Los alginatos se han aplicado ampliamente en la producción de alimentos, la ingeniería química y la medicina, etc. Estudios recientes han revelado que el alginato tiene una serie de 30 bioactividades. Sin embargo, su aplicación como fármaco está limitada en cierta medida por su elevado peso molecular. Por tanto, el oligosacárido degradado a partir del alginato mediante diferentes métodos tiene gran valor para la glicoquímica, la glicobiología, la glicoingeniería y el estudio de fármacos basados en sacáridos. Los métodos para degradar el alginato incluyen la degradación enzimática, la degradación física y la degradación química, si bien el requerimiento de enzimas específicas ha limitado la aplicación de la degradación enzimática. La degradación física, 35 que normalmente se combina con otros métodos, no puede proporcionar fácilmente oligosacáridos debido al peso molecular final de aproximadamente 50.000 Da de los productos de la misma. La degradación química usada para los polisacáridos incluye la hidrólisis ácida y la degradación oxidativa. La hidrólisis ácida está limitada por su capacidad para obtener oligosacáridos con un peso molecular de 4000 o inferior cuando se lleva a cabo a temperatura normal y presión normal.

40 El documento CN1341665 proporciona un método de preparación de ácido manurónico con un grado de polimerización simple que incluye las siguientes etapas: disolver alginato sódico en agua, añadir algina liasa para que se produzca la reacción, calentar con un baño de agua hirviendo para desactivar la liasa, centrifugar y retirar las impurezas precipitadas, regular el valor del pH de la solución obtenida, centrifugar y retirar el producto precipitado, 45 usar un licor alcalino para disolverlo y regular el valor del pH, añadir alcohol etílico para producir la precipitación, secar y usar una columna cromatográfica de intercambio iónico para efectuar la separación, usar un eluyente para llevar a cabo la elución. El producto obtenido posee actividad antitumoral y se puede usar para el desarrollo de medicamentos antitumorales.

50 El documento CN1454992 se refiere a un método de preparación de una liasa ficocoloide que incluye las etapas de preparar un medio de cultivo, esterilizar e inocular *Vibrio*, y fermentar con agitación en una incubadora. Tras esterilizar el licor fermentado obtenido, este se filtra usando un filtro Millipore, después el líquido sobrenadante se filtra a presión y se concentra a sequedad, a continuación se puede usar la cromatografía hidrófoba para retirar el ficocoloide combinado con el producto.

55 El documento CN1341665 proporciona un método para la separación de ácido oligomanurónico según el grado de polimerización tratando una mezcla de ácidos oligomanurónicos con diferentes grados de polimerización mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una solución de un compuesto de bicarbonato como eluyente.

60 El documento EP1153933 divulga un ácido poliurónico que tiene un grado medio de polimerización inferior a 20. Describe también un método que comprende las etapas de: (a) proporcionar una solución que contiene un 5 % en peso o más de un ácido poliurónico de alto peso molecular, principalmente en forma de su sal de litio; (b) añadir peróxido de hidrógeno y una sal ferrosa a la solución preparada en la etapa (a) para degradar oxidativamente el ácido poliurónico de alto peso molecular; y (c) aislar un ácido poliurónico que tiene un grado medio de polimerización inferior a 20 obtenido en la etapa (b).

El documento CN 1 408 360 divulga el uso de la alginato oligosa útil contra la demencia inducida por la escopolamina.

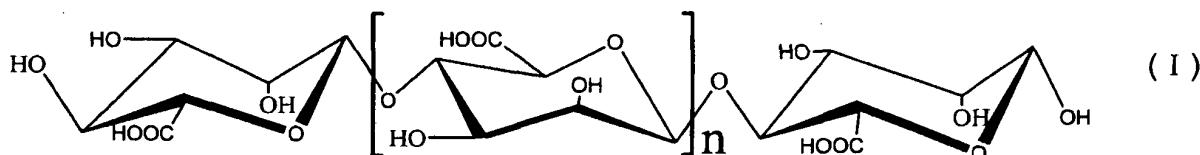
Divulgación de la invención

5 Para resolver los problemas anteriormente descritos, y mediante estudios en profundidad de los inventores, se ha descubierto que se puede obtener un oligosacárido de alginato con un peso molecular de 4.000 o inferior, mediante hidrólisis ácida a alta temperatura y a alta presión, y se pueden preparar derivados del mismo cuyo terminal reducido en la posición 1 es un radical carboxilo, en lo obtenido mediante hidrólisis ácida a alta temperatura y alta presión, y 10 se pueden preparar derivados de los mismos cuyo terminal reducido en la posición 1 es un radical carboxilo, en presencia de oxidantes. La invención se realiza basándose en el principio anterior.

15 La presente invención proporciona un oligosacárido de alginato y derivados del mismo con un peso molecular bajo, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y proporciona un proceso para la preparación de los mismos.

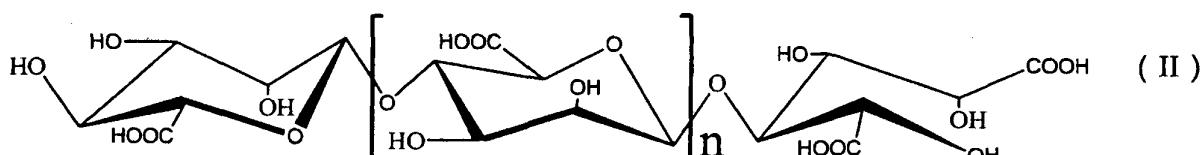
15 La presente invención proporciona también un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la EA y la diabetes que comprende el oligosacárido de alginato de bajo peso molecular mencionado anteriormente, o derivados del mismo, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

20 La presente invención se refiere a un oligosacárido de alginato representado por la fórmula (I) y a derivados del mismo o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dicho oligosacárido está compuesto por ácidos β -D-manurónicos unidos mediante enlaces α -1,4 glucosídicos.



25 en la que n representa 0 o un número entero de 1 a 19.

En la presente invención un ejemplo de dichos derivados del oligosacárido de alginato es un compuesto representado por la fórmula (II), en la que el terminal reducido en la posición 1 es un radical carboxilo,



30 en la que n representa 0 o un número entero de 1 a 19.

35 En dichas fórmulas (I) y (II), n es preferentemente de 2 a 10, y más preferentemente de 4 a 8. La razón de por qué los efectos biológicos del tetrasacárido al dodesacárido (preferentemente del hexasacárido al decasacárido) son mejores sigue sin estar clara, lo que puede estar causado por la responsabilidad de estos oligosacáridos para ser reconocidos y aceptados por las células.

40 Dichos derivados del oligosacárido de alginato incluyen también, por ejemplo, los derivados en los que una parte de los grupos hidroxilo del ácido manurónico están sulfatados.

45 Las sales farmacéuticamente aceptables de dicho oligosacárido de alginato y sus derivados pueden ser, por ejemplo, las sales de sodio, potasio, calcio, magnesio y similares. Las sales de sodio son las preferidas. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar mediante métodos convencionales.

50 La presente invención se refiere también a un proceso para la preparación de dicho oligosacárido de alginato y sus derivados, en el que se hace reaccionar una solución de alginato durante aproximadamente de 2 a 6 h en un autoclave a pH 2-6 y a una temperatura de aproximadamente 100-120 °C; y después se ajusta su pH a aproximadamente 7. El producto de degradación oxidativa se obtiene mediante la adición de un oxidante a la solución del oligosacárido de alginato.

55 En una realización preferida de la invención, se calienta una solución acuosa de un 0,5-5 % de alginato sódico durante 4 h en un autoclave a pH 4 y a una temperatura de 110 °C. Una vez completada la reacción, el reactivo se aspira y se enfriá, y a continuación se ajusta el pH a 7 añadiendo una solución de NaOH. Mientras se agita, el filtrado se vierte lentamente en alcohol industrial que es 4 veces el volumen del filtrado, y se deja reposar durante la noche para permitir la precipitación. El precipitado se separa mediante filtración con succión a sequedad, y se deshidrata mediante lavado con etanol absoluto. Se obtiene una torta de filtrado blanca y se seca en un horno a

60 °C para dar un oligosacárido de alginato bruto. El oligosacárido de alginato bruto se formula en un solución al 10 %, y se precipita con una solución de etanol al 95 %. El precipitado se lava con etanol absoluto, se seca y se formula en una solución al 5 %. La solución se filtra a través de una película de 3 µm para eliminar las impurezas, después se desala en una columna BioGel-P6 (1,6 x 180 cm) con 0,2 mol/l de NH₄HCO₃ como fase móvil y el producto se recoge en múltiples etapas. El eluido se mide mediante el método del sulfato-carbazol. Las fracciones que contienen los sacáridos se recogen, se concentran a presión reducida y se desalan, y se liofilizan para dar oligosacáridos de alginato.

La preparación de los derivados representados por la fórmula (II) es tal como sigue: se añade un oxidante y se hace reaccionar durante de 15 min a 2 h a una temperatura de 100-120 °C tras haber hecho reaccionar la solución de alginato anterior durante aproximadamente de 2 a 6 h en un autoclave a pH 2-6 y a una temperatura de aproximadamente 100-120 °C. En una realización de la invención, se añaden 25 ml de una solución de sulfato de cobre al 5 % a 50 ml de NaOH (ac.) al 10 %, se mezclan inmediatamente y se le añaden inmediatamente 40 ml de una solución de oligosacárido de alginato al 5 %. La mezcla resultante se calienta en un baño de agua hirviendo hasta que ya no se forma precipitado de color rojo ladrillo. La mezcla se centrifuga para eliminar los precipitados. Una parte del sobrenadante se extrae y se añade a NaOH (ac.) al 10 % y una solución de sulfato de cobre al 5 % de acuerdo con la relación anterior para comprobar la formación de precipitados de color rojo ladrillo. En caso negativo, el sobrenadante se añade a alcohol industrial que es 4 veces el volumen del sobrenadante, y se deja reposar durante la noche para permitir la precipitación. El precipitado se separa mediante filtración con succión a sequedad, se deshidrata con etanol absoluto repetidamente y se seca en un horno a 60 °C.

La separación se lleva a cabo del mismo modo que para el oligosacárido de alginato de fórmula (I).

La invención proporciona también una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de dicho oligosacárido de alginato o de los derivados del mismo, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica se puede usar como medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Asimismo, la composición farmacéutica se puede usar como inhibidor de la formación de fibrillas de proteína β-amiloide y como promotor de la disgregación de las fibrillas.

La composición farmacéutica se puede usar también como medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la diabetes.

Asimismo, la composición farmacéutica se puede usar también como inhibidor de la formación de fibrillas de la proteína amiloide de los islotes y como inhibidor del polipéptido amiloide de los islotes. En vista de las dificultades actuales por la falta de medicamentos eficaces para la profilaxis y el tratamiento de la EA y la diabetes, es especialmente importante que el oligosacárido de alginato de la presente invención se use en la fabricación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la EA y la diabetes.

Descripción de las figuras

- La Figura 1 es la curva de elución del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención, separado mediante una columna BioGel-P6 tras la hidrólisis ácida.
 La Figura 2 es el espectro MALDI-TOF del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención.
 La Figura 3 es la curva de elución del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato separado mediante una columna BioGel-P6.
 La Figura 4 es el espectro MALDI-TOF del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato (modo positivo).
 La Figura 5 muestra el efecto del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre la latencia de ratones con EA inducida por la Aβ₁₋₄₀.
 La Figura 6 muestra el efecto del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre el número de errores de ratones con EA inducida por la Aβ₁₋₄₀.
 La Figura 7 muestra los efectos protectores del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre células SH-SY5Y dañadas por la Aβ₂₅₋₃₅.
 La Figura 8 muestra los efectos protectores del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre células SH-SY5Y dañadas por la Aβ₁₋₄₀.
 La Figura 9 muestra los efectos inhibidores del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre la formación de fibrillas de Aβ₁₋₄₀ normal e inducida por la heparina.
 La Figura 10 muestra el efecto desestabilizante del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre las fibrillas de Aβ₁₋₄₀.
 La Figura 11 muestra los efectos del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre la conformación de 250 µg/ml de Aβ₁₋₄₀ disuelto.

La Figura 12 muestra los efectos protectores del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre células NIT dañadas por la IAAP.

5 La Figura 13 muestra el efecto de la mezcla del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre la latencia de ratones con EA inducida por A β_{1-40} ensayada en el laberinto acuático de Morris.

10 La Figura 14 muestra el efecto de la mezcla del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre la distancia nadada por ratones con EA inducida por A β_{1-40} ensayada en el laberinto acuático de Morris.

15 La Figura 15 muestra el efecto de la mezcla del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre el tiempo de la primera llegada a la placa original de ratones con EA inducida por A β_{1-40} ensayado en el laberinto acuático de Morris.

20 La Figura 16 muestra el efecto de la mezcla del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre el número de cruces de la placa original de ratones con EA inducida por A β_{1-40} , ensayados en el laberinto acuático de Morris.

25 La Figura 17 muestra los efectos protectores de la mezcla del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención sobre células NIT dañadas por la IAAP.

Realizaciones

20 1 Preparación del oligosacárido de alginato

Se añade 1 g de polimanuronato de sodio (peso molecular promedio en peso de 8.235 Da), proporcionado por Lantai Pharm. LTD., Universidad Ocean de China) a agua destilada para obtener una solución al 1 %, se ajusta el pH a 4 con HCl, se coloca en un autoclave y se calienta a 110 °C durante 4 h. Despues de enfriar, el pH de la solución se ajusta a 7 con NaOH (ac.). Mientras se agita, el filtrado se vierte lentamente en alcohol industrial que es 4 veces el volumen del filtrado, y se deja reposar durante la noche para permitir la precipitación. El precipitado en alcohol se separa mediante filtración con succión a sequedad, y se deshidrata mediante lavado con etanol absoluto. Se obtiene una torta de filtrado blanca y se seca en un horno a 60 °C para dar un oligosacárido de alginato bruto.

30 2 Preparación del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato

El oligosacárido de alginato bruto se formula en un solución al 10 %, y se precipita con una solución de etanol al 95 %. El precipitado se lava con etanol absoluto, se seca y se formula en una solución al 5 % después del secado. La solución se filtra a través de una película de 3 µm para eliminar las impurezas, después se desala en una columna BioGel-P6 (1,6 x 180 cm) con 0,2 mol/l de NH₄HCO₃ como fase móvil y se recoge en múltiples etapas. El eluído se mide mediante el método del sulfato-carbazol, y los componentes que incluyen azúcares se recogen, se concentran a presión reducida y se desalanan en una columna G-10. El componente del volumen exterior se separa adicionalmente mediante una columna Bio-Gel-P10 (1,6 x 1,80 cm) y se liofiliza para dar una serie de oligosacáridos de alginato (Fig. 1).

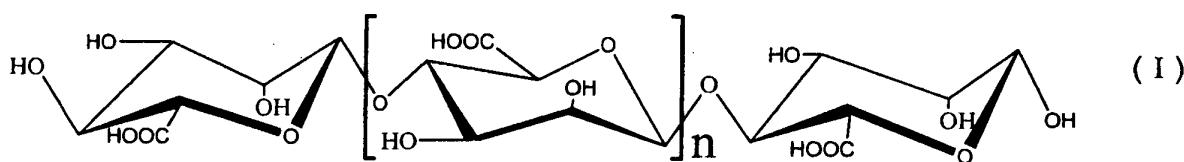
40 3 Identificación de la estructura de los oligosacáridos de alginato

Se formulan 5 g del oligosacárido de alginato preparado anteriormente en una solución al 5 %. Se añaden 25 ml de una solución de sulfato de cobre al 5 % a 50 ml de NaOH (ac.) al 10 %, y se mezclan inmediatamente y se le añaden inmediatamente 40 ml de una solución de oligosacárido de alginato al 5 %. La mezcla resultante se calienta en un baño de agua hirviendo hasta que ya no se forma precipitado de color rojo ladrillo. La mezcla se centrifuga para eliminar los precipitados. Una parte del sobrenadante se extrae y se añade a NaOH (ac.) al 10 % y una solución de sulfato de cobre al 5 % de acuerdo con la relación anterior para comprobar la formación de precipitado de color rojo ladrillo. En caso negativo, el sobrenadante se añade a alcohol industrial que es 4 veces el volumen del sobrenadante, y se deja reposar durante la noche para permitir la precipitación. El precipitado se separa mediante filtración con succión a sequedad, se deshidrata con etanol absoluto repetidamente y seca en un horno a 60 °C. De este modo se obtiene un producto bruto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato.

El producto bruto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato se formula en una solución al 10 %, y se precipita con una solución de etanol al 95 %. El precipitado se lava con etanol absoluto, se seca y se formula en una solución al 5 % después del secado. La solución se filtra a través de una película de 3 µm para eliminar las impurezas, y después se desala en una columna Bio-Gel-P6 (1,6 x 180 cm) con 0,2 mol/l de NH₄HCO₃ como fase móvil y se recoge en múltiples etapas. El eluído se mide mediante el método del sulfato-carbazol, y los componentes que incluyen azúcares se recogen, se concentran a presión reducida y se desalanan en una columna G-10. El componente del volumen exterior se separa adicionalmente mediante una columna Bio-Gel-P10 (1,6 x 1,80 cm) y se liofiliza para dar una serie de productos de degradación oxidativa (Fig. 2).

60 4 Identificación de la actividad protectora del oligosacárido de alginato

Se identifican las estructuras de los oligosacáridos contenidos en la fracción obtenida a partir de la preparación de los oligosacáridos de alginato. Se confirma que los oligosacáridos son oligosacáridos de alginato compuestos por ácido β -D-manurónico unidos por enlaces 1-4 glucosídicos. La fórmula estructural es:



en la que n representa 0 o un número entero de 1 a 19.

- 5 En lo sucesivo en el presente documento, la fracción a aproximadamente 292 ml del eluído (la fracción etiquetada como "6" en la Fig. 1, denominada Componente 6 en lo sucesivo en el presente documento) se toma como ejemplo para ilustrar el análisis de la estructura de los oligosacáridos anteriores.

10 3.1 Espectrograma de absorción ultravioleta

- La fracción de oligosacáridos a aproximadamente 292 ml del eluído se diluye hasta una concentración apropiada, y se escanea a 190-400 nm con un espectrofotómetro de UV-VIS UV-2102. Se descubre que no aparece un pico de absorción específica en la región del ultravioleta, indicando que la estructura no tiene enlaces dobles conjugados. Sin embargo, aparece un pico de absorción no específica a 190-200 nm. Por tanto, durante la desalación del oligosacárido, este se puede detectar en línea en la región del ultravioleta anterior.

15 3.2 Análisis del espectro de infrarrojo

- Se pesan 0,5 mg de la fracción de oligosacáridos anterior. El espectro de infrarrojo se determina con un espectrómetro de infrarrojo inteligente NEXUS-470 con pastillas de KBr. Los picos a 3420,79 cm⁻¹, 3214,64 cm⁻¹, y 2924,61 cm⁻¹ son atribuibles a vibraciones de tensión simétrica del grupo hidroxilo; el pico a 1600,25 cm⁻¹ es atribuible a la vibración de tensión simétrica del grupo carbonilo del carboxilato; el pico a 1406,54 cm⁻¹ es atribuible a la vibración de tijereeo del grupo hidroxilo; el pico a 1146,42 cm⁻¹ es atribuible a la vibración de tensión simétrica del enlace C-O del grupo carboxilo; el pico a 1045,77 cm⁻¹ es atribuible a las vibraciones de tensión asimétrica del éter anhidro; y el pico a 804,02 cm⁻¹ es atribuible a las vibraciones de tensión asimétrica del esqueleto cíclico del ácido manurónico. Esto indica que dicho compuesto tiene un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo y un esqueleto cíclico de ácido manurónico.

30 3.3 Análisis de EM

- El análisis de EM se efectúa con un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF BIFLEX II (Bruker Daltonics Co.). Como puede verse en el espectro (Fig. 2, tabla 1), el pico de m/z 1073,9 es el pico del ion molecular [M-H]⁻¹; el pico de m/z 1096,6 es [M+Na-2H]⁻¹; el pico de m/z 1028,0 es [M-H₂O-CO-H]⁻¹; el pico de m/z 821,2 es [M-ManA-CH₂O-2H₂O-H]⁻¹; m/z 704,3 es [M-2ManA-H₂O-H]⁻¹; m/z 634,4 es [M-2ManA-2(CH₂O)-CO-H]⁻¹; el pico de m/z 536,5 es [M-2H]²⁻; y el pico de m/z 357,4 es [M-3H]³⁻. En el espectro EM-IES de la fracción de oligosacáridos anterior, el pico del ion molecular es m/z 1073,9, indicando que su peso molecular es 1074.

Tabla 1 Análisis del oligosacárido de alginato (Componente 6)

Iones de fragmentos	m/z
[M-H] ⁻¹	1073,9
[M+Na-2H] ⁻¹	1096,6
[M-H ₂ O-CO-H] ⁻¹	1028,0
[M-ManA-CH ₂ O-2H ₂ O-H] ⁻¹	821,1
[M-2ManA-H ₂ O-H] ⁻¹	704,3
[M-2ManA-2(CH ₂ O)-CO-H] ⁻¹	634,4
[M-2H] ²⁻	536,5
[M-3H] ³⁻	357,4

40 3.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear del oligosacárido de alginato

La RMN ¹H y la RMN ¹³C del oligosacárido de alginato representado por la fórmula (I) (n=4) se obtienen mediante un espectrómetro de RMN JNM-ECP600. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

45 Tabla 2 Análisis de RMN ¹H del oligosacárido de alginato (Componente 6)

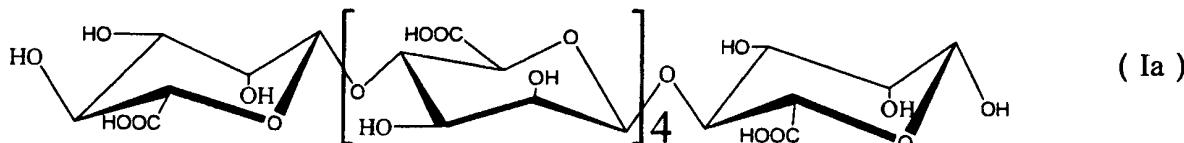
Desplazamiento químico (ppm)				
	H-1	H-2	H-3	H-4
r α	5,21	3,98	4,03	4,04
				4,16

	Desplazamiento químico (ppm)				
r β	4,91	3,99	3,77	3,90	3,77
m α	4,69	4,03	3,75	3,93	3,69
m β	4,64	4,03	3,75	3,65	3,69
n	4,63	3,74	3,63	3,75	4,01

Tabla 3 Análisis de RMN ^{13}C del oligosacárido de alginato (Componente 6)

	Desplazamiento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
r α	93,54	70,06	69,02	78,37	72,60	175,84
r β	93,74	70,42	71,60	78,28	76,08	175,84
m	99,08	70,63	71,43	78,07	75,90	175,41
n	100,15	68,48	72,47	76,27	70,05	175,27

- 5 De acuerdo con los resultados de los análisis anteriores, se confirma que el oligosacárido de alginato de la anterior fracción es el hexasacárido manurónico que tiene la siguiente estructura (Ia):



- 10 3.5 Determinación del contenido de ácido manurónico en el oligosacárido de alginato (espectroscopía RMN ^1H)

La composición del oligosacárido de alginato se determina mediante RMN ^1H de alta resolución para cuantificar la relación de ácido manurónico con respecto al ácido gulurónico (M/G) en el oligosacárido de alginato, de acuerdo con la intensidad de la señal del protón del carbono anomérico. Se pesan de 3 a 5 mg de muestra seca, se disuelven en D_2O a pH neutro y se añaden a 0,3 mg de EDTA. La muestra se determina mediante un espectrómetro de RMN Bruker DPX-300. El espectro se observa a 70 °C, de modo que el pico de D_2O esté lejos de la región de resonancia del protón anomérico. La intensidad relativa de la señal se expresa mediante la integral del área del pico. Los resultados indican que las señales H-1 del radical M aparecen a 4,64 ppm y 4,66 ppm (es decir, las señales H-1 del radical M en las secuencias MM y MG, respectivamente); todas las señales H-1 del radical G aparecen a 5,05 ppm (doble pico). El contenido relativo de M y G en la muestra se puede expresar mediante la intensidad del pico H-1, según la siguiente ecuación:

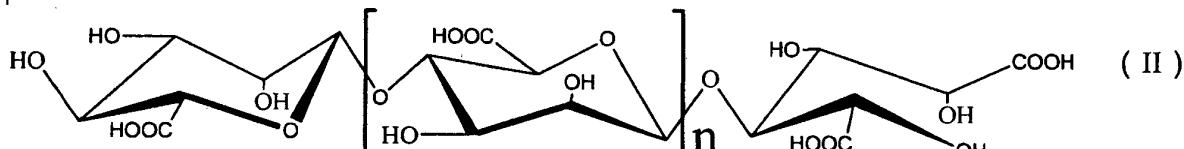
$$M\% = \frac{I_{4,64} + I_{4,66}}{I_{4,64} + I_{4,66} + I_{5,05}} \times 100\%$$

en la que I representa la intensidad del pico, expresada mediante la integral del área del pico.

- 25 El contenido relativo de ácido D-manurónico en la muestra es del 98,07 %, mediante el método anterior, lo que indica que el oligosacárido de alginato está compuesto principalmente por ácido manurónico.

- 30 4 Identificación de la estructura del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato

35 Se identifica la estructura del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato en la fracción obtenida a partir de la preparación del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato. Se confirma que el producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato es un derivado del oligosacárido de alginato compuesto por ácido β -D-manurónico unido por enlaces 1,4 glucosídicos, en el que el terminal reducido en la posición 1 es un radical carboxilo. La fórmula estructural es:



en la que n representa 0 o un número entero de 1 a 19.

- 40 El componente 6 se toma como ejemplo para ilustrar el análisis de la estructura del producto de degradación oxidativa del oligosacárido anterior.

4.1 Espectrograma de absorción ultravioleta

Se diluye una cantidad apropiada del producto de degradación oxidativa hasta una cierta concentración con agua destilada, y se escanea con un espectrofotómetro de UV Shimadzu UV-260 (190 nm-700 nm) a la longitud de onda completa. Se descubre que no hay ningún pico de absorción específica en las regiones ultravioleta y visible.

4.2 Análisis del espectro de infrarrojo

Se determina el espectro de infrarrojo del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato mediante un espectrómetro de infrarrojo inteligente NICOLE NEXUS-470. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Espectro IR del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato

Pico de absorción (cm^{-1})	Tipo de vibración	Grupo	Intensidad
3400,56	uOH	-OH	b
3219,02	uOH	-OH	b
	uOH	-COOH	
2924,65	uOH	-COOH	m
1599,76	uC=O	-COOH	b
1405,95	uC O	-COOH	b
1296,26	δ O H	-OH	m
1037,84	u_{as} (C-O-C)	éter anhidro	m
817,14	u_{as} (anillo de azúcar)	esqueleto cíclico del ácido manurónico	m
669,80	γ OH	-OH	m

4.3 Análisis de RMN ^1H

Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C del producto de degradación oxidativa se obtienen mediante un espectrómetro de RMN Bruker Avance DPX300. Como puede verse en el espectro de RMN ^1H , este está compuesto principalmente por las señales de los seis átomos de hidrógeno del ácido β -D-manurónico. Tras asignar un patrón de acoplamiento a cada señal, se descubre que el producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato está compuesto principalmente por ácido manurónico. Si el terminal reducido en la posición 1 es un grupo aldehído, los desplazamientos químicos de H-1 α y H1 β deberían ser 5,11 ppm y 4,81 ppm, respectivamente. Puesto que el terminal reducido en la posición 1 del oligosacárido de alginato se oxida a un grupo carboxilo a partir del grupo aldehído, el H-1 desaparece y, por tanto, desaparecen las señales a 5,11 ppm y 4,81 ppm. Como puede verse en el espectro de RMN ^{13}C , este está compuesto principalmente por las señales de los seis átomos de carbono del ácido β -D-manurónico. Tras asignar un patrón de acoplamiento a cada señal, se descubre que la molécula del intermedio está compuesta por ácido manurónico. Comparado con el espectro del intermedio, la señal del terminal reducido C-1 del ácido manurónico (94 ppm) desaparece. La señal del terminal reducido C-1 (175,81 ppm) se desplaza hacia campo bajo. La razón es que el terminal reducido en la posición 1 del oligosacárido de alginato se oxida a un grupo carboxilo a partir del grupo aldehído y el desplazamiento químico de C-1 cambia de aproximadamente 94 ppm del grupo aldehído a 175,81 ppm del grupo carboxilo.

4.4 Análisis de EM

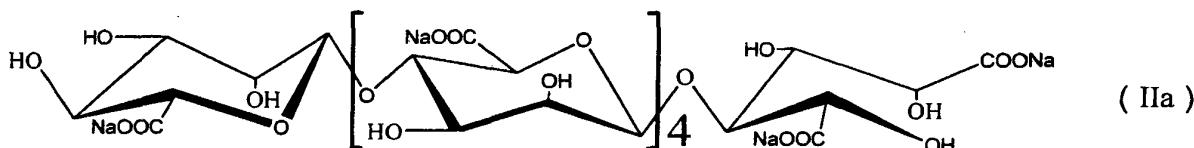
El análisis de EM se efectúa con un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF BIFLEX II (Bruker Daltonics Co.). Los resultados se muestran en la Fig. 4. Como puede verse en la Fig. 4, el pico de m/z 1113,7 es $[\text{M}+\text{Na}]^{+1}$; el pico de m/z 1113,7 es $[\text{M}-\text{O}+\text{Na}]^{+1}$; el pico de m/z 1083,7 es $[\text{M}-\text{CH}_2\text{O}+\text{Na}]^{+1}$; el pico de m/z 1067,6 es $[\text{M}-\text{CH}_2\text{O}-\text{O}+\text{Na}]^{+1}$; el pico de m/z 1053,6 es $[\text{M}-2(\text{CH}_2\text{O})+\text{Na}]^{+1}$; el pico de m/z 979,6 es $[\text{M}-3(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}_2+\text{Na}]^{+1}$; el pico de m/z 921,6 es $[\text{M}-4(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}_2-\text{CO}+\text{Na}]^{+1}$. El análisis de EM del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato se muestra en la tabla 5.

Tabla 5 Análisis EM del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato

Iones de fragmentos	m/z
$[\text{M}+\text{Na}]^{+1}$	1113,7
$[\text{M}-\text{O}+\text{Na}]^{+1}$	1097,7
$[\text{M}-\text{CH}_2\text{O}+\text{Na}]^{+1}$	1083,7
$[\text{M}-\text{O}-\text{CH}_2\text{O}+\text{Na}]^{+1}$	1067,6
$[\text{M}-2(\text{CH}_2\text{O})+\text{Na}]^{+1}$	1053,6
$[\text{M}-3(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}_2+\text{Na}]^{+1}$	979,6
$[\text{M}-4(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}_2-\text{CO}+\text{Na}]^{+1}$	921,6

En el espectro MALDI-TOF del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato, el pico de m/z 1113,7 es $[M+Na]^{+1}$, indicando que el peso molecular del oligosacárido de alginato es 1090,7. El peso molecular aumentó en diecisésis unidades comparado con el del oligosacárido de alginato hidrolizado con ácido ($M = 1075$), esto es, se añade un átomo de oxígeno a la molécula, lo que hace pensar que el oligosacárido de alginato se oxida durante la preparación.

De acuerdo con los resultados de los análisis anteriores, la estructura del producto de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato es la fórmula (IIa):



5 Evaluación del oligosacárido de alginato sobre la enfermedad de Alzheimer (EA)

Se usa el 6-mero separado con la columna Bio-Gel-P6 como ejemplo para mostrar su actividad. Por tanto, el oligosacárido de alginato se denomina el "6-mero" en los siguientes experimentos.

5.1 Efectos del 6-mero sobre ratones con EA inducida por la $A\beta_{1-40}$

Se pesan ratones macho Balb/c (18-22 g, comprados al Centro de Laboratorio de la Universidad de Shandong) y se asignan aleatoriamente a 6 grupos tal como sigue: un grupo de control, un grupo modelo, un grupo tratado con una concentración baja (15 mg/kg) del 6-mero, un grupo tratado con una concentración alta (30 mg/kg) del 6-mero, un grupo tratado con Huperzina-A (HBY con una concentración de 0,2 mg/kg). A los ratones se les administró por vía oral los fármacos correspondientes el día 3 después del agrupamiento. Los fármacos se administraron una vez al día consecutivamente con una dosificación de 0,5 ml/20 g hasta que se completó el experimento. A los ratones de los grupos modelo y de control se les administró simultáneamente una cantidad equivalente de solución salina normal.

El día 8 después de la administración del fármaco, se injectó a los ratones $A\beta_{1-40}$ envejecida, con excepción del grupo del vehículo según el método de referencia (Jhoo JH et al., "β-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex". *Behavioural Brain Research* (2004) 155: 185-196) para inducir el modelo de EA. La solución de $A\beta_{1-40}$ envejecida se inyecta en el ventrículo cerebral derecho. Los resultados de las pruebas de adquisición ensayados con el laberinto acuático de Morris muestran que los ratones tratados con $A\beta$ muestran una latencia de escape mayor ($P < 0,05$, $P < 0,01$), en comparación con la de los grupos modelo y de control, indicando que se han establecido los modelos de EA en ratones (Fig. 6). Sin embargo, el 1^{er} día del ensayo esta latencia de escape mayor se acorta en todos los grupos tratados con fármaco a excepción del grupo tratado con 15 mg/kg de 6-mero. Y la latencia de escape del grupo tratado con 60 mg/kg de 6-mero es estadísticamente significativa en comparación con la del grupo modelo ($P < 0,05$). El 2^o y 3^{er} día del ensayo, la latencia de escape de todos los grupos tratados con fármaco se acorta, en los que la del grupo tratado con 60 mg/kg de 6-mero y la del grupo tratado con la HBY son estadísticamente significativas en comparación con las de los grupos modelo y control ($P < 0,05$).

40 Tabla 6 Efectos del 6-mero sobre la latencia de escape de ratones con EA inducida por la $A\beta_{1-40}$, ensayada en el laberinto acuático de Morris ($\bar{x} \pm SE$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	n	Latencia de escape (s)		
			1 ^{er} día	2 ^o día	3 ^{er} día
Control	-	12	49,40 ± 8,39	54,30 ± 11,39	42,80 ± 10,04
Modelo	-	14	87,20 ± 7,58##	93,46 ± 8,67#	97,31 ± 8,65##
6-mero	15	14	90,07 ± 10,71	83,29 ± 9,53	72,83 ± 12,50
	30	14	77,71 ± 8,69	71,69 ± 10,11	68,45 ± 14,46
	60	13	56,92 ± 9,92*	63,57 ± 10,54*	62,50 ± 13,10*
HBY	0,2	14	76,29 ± 9,74	64,58 ± 10,36*	63,83 ± 10,12*

$p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs control; * $p < 0,05$ vs modelo

45 El 4^o día del ensayo del laberinto acuático de Morris, la placa original se retira y se registra el porcentaje del tiempo que están los ratones en la sección de la placa original en un intervalo de 60 s. Los resultados muestran que los ratones del grupo modelo exhiben un sesgo de la latencia mucho menor que el grupo de control ($P < 0,05$), y el sesgo de la latencia es significativamente elevado tras la administración del 6-mero en comparación con el del grupo modelo ($P < 0,05$) (tabla 7).

Tabla 7 Efectos del 6-mero en la prueba de la sonda en ratones con EA inducida por la A β_{1-40} , ensayada en el laberinto acuático de Morris ($\bar{x} \pm SE$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	n	Sesgo de la latencia (%)
Control	-	12	29,48 ± 5,47
Modelo	-	14	11,83 ± 3,33#
6-mero	15	14	19,67 ± 5,15
	30	14	22,99 ± 5,79
	60	13	28,44 ± 6,08*
HBY	0,2	14	22,18 ± 5,93

P < 0,05 vs control; * P < 0,05 vs modelo

- 5 El día 25 después de la inyección de la A β , los ratones se entrena adicionalmente para la prueba de evitación pasiva de la entrada. En la prueba cada ratón se coloca en el compartimento iluminado del aparato, de espaldas al compartimento oscuro, y la puerta se abre, permitiendo su acceso al compartimento oscuro. Una vez que el ratón entra en el compartimento oscuro, recibe una descarga eléctrica inevitable en los pies (36 V) a través del suelo de rejilla de acero inoxidable. La prueba se efectúa de un modo análogo al cabo de 24 h. Se registran el tiempo de entrada de cada ratón en la cámara oscura (latencia de entrada, máximo de la prueba limitado a 3 min) y el número de entradas al compartimento oscuro (número de errores).

10 Los resultados de la prueba de evitación pasiva de la entrada se muestran en las Figuras 5 y 6. Cada grupo comprende 8 animales. Los datos se presentan como la media ± SE. El símbolo # significa una diferencia significativa en comparación con el grupo de control (P < 0,05). * significa una diferencia significativa en comparación con el grupo modelo (P < 0,05). La latencia de entrada del grupo tratado con la A β_{1-40} se acorta (P < 0,01) y el número de errores aumenta (P < 0,05) en comparación con el grupo de control, indicando el establecimiento con éxito de los ratones con EA. Sin embargo, la latencia de entrada se prolonga significativamente en los grupos tratados con 30 mg/kg y 60 mg/kg de 6-mero y en el grupo tratado con la HBY, y el número de errores se reduce significativamente en los grupos tratados con 6-mero y HBY, indicando que el 6-mero tiene la función de mejorar significativamente las actividades de aprendizaje y memoria en los modelos inducidos por la A β_{1-40} .

Efectos del 6-mero sobre los indicadores bioquímicos del cerebro de ratones con EA inducida por la A β .

25 Despues del ensayo de comportamiento, las ratas se decapitan. El córtex cerebral y el hipocampo se disecan sobre hielo inmediatamente, y se almacenan a -80 °C tras una rápida congelación en nitrógeno líquido durante 1 hora. Se determinan las actividades MDA, SOD, GSH-PX, Na⁺, K⁺-ATPasa, AchE y ChAT en las regiones del cerebro usando los kits respectivos. Los homogeneizados de córtex cerebral e hipocampo se preparan con solución salina con una concentración final del 10 % y del 5 %. Se obtuvieron los sobrenadantes después de una centrifugación a 3600 rpm para ensayar las actividades MDA, CuZn-SOD, GSH-PX, Na⁺K⁺-ATPasa, AchE, y ChAT. La actividad de ChAT se determina mediante el método del marcaje con isótopos. Los otros índices y la cantidad de proteínas totales se ensayan con los kits respectivos suministrados por el Instituto de Bioingeniería Nanjing Jiancheng.

30 (1) Efectos del 6-mero sobre la actividad ChAT de ratones con EA

35 La actividad ChAT en el córtex cerebral disminuye considerablemente tras el tratamiento con la A β , en comparación con el grupo de control (p < 0,05). Sin embargo, esta actividad aumenta tras el tratamiento con el 6-mero y con la HBY, en los que los efectos terapéuticos de 30 mg/kg y 60 mg/kg del 6-mero y la HBY son estadísticamente significativos (tabla 8).

40 Tabla 8 Efectos del 6-mero sobre la actividad ChAT en el córtex cerebral de ratones con EA inducida por la A β_{1-40} (n = 10, $\bar{x} \pm SE$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Actividad ChAT (pmol/ mg prot. /min)
Control	-	92,17 ± 2,95
Modelo	-	77,26 ± 4,9#
6-mero	15	90,94 ± 3,77
	30	99,98 ± 5,07**
	60	94,69 ± 5,83*
HBY	0,2	100,70 ± 5,99**

P < 0,05 vs control; *P < 0,05, **P < 0,01 vs modelo

45

(2) Efectos del 6-mero sobre la actividad SOD de ratones con EA

La actividad SOD en el cerebro disminuye tras el tratamiento con la A β , pero no es estadísticamente significativo en comparación con el grupo de control. Su actividad aumenta significativamente tanto en el córtex cerebral como en el hipocampo tras el tratamiento del 6-mero a una dosificación de 60 mg/kg, lo que indica que el mecanismo del efecto del 6-mero sobre la EA está relacionado con la mejora de la actividad antioxidante (tabla 9).

5 Tabla 9 Efectos del 6-mero en la actividad SOD del córtex cerebral y el hipocampo de ratones con EA inducida por la A β_{1-40} (n = 10, $\bar{x} \pm SE$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Actividad SOD (NU / mg prot.)	
		córtex cerebral	hipocampo
Control	-	53,48 ± 1,56	66,35 ± 4,74
Modelo	-	49,99 ± 2,41	62,24 ± 4,16
6-mero	15	49,35 ± 2,27	69,76 ± 6,12
	30	51,84 ± 2,07	61,72 ± 4,27
	60	57,50 ± 2,51*	79,97 ± 7,34*
HBY	0,2	48,95 ± 2,13*	69,91 ± 6,51*

* P < 0,05 vs modelo

10 (3) Efectos del 6-mero sobre el contenido de MDA en ratones con EA

El contenido de MDA en el córtex cerebral y el hipocampo no tiene una diferencia significativa en comparación con el grupo de control. Su contenido disminuye en el cerebro tras el tratamiento con la HBY y el 6-mero a una dosificación de 30 mg/kg y 60 mg/kg, indicando que ambos tienen la capacidad de mejorar la respuesta a la oxidación y el daño de los radicales libres y proteger el cerebro del daño oxidativo (tabla 10).

15 Tabla 10 Efectos del 6-mero sobre el contenido de MDA en el córtex cerebral y el hipocampo de ratones con EA inducida por la A β_{1-40} (n = 10, $\bar{x} \pm SE$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Contenido de MDA (nmol/ml)	
		córtex cerebral	hipocampo
Control	-	2,61 ± 0,22	4,75 ± 0,66
Modelo	-	2,18 ± 0,23	5,17 ± 0,47
6-mero	15	1,79 ± 0,15	4,28 ± 0,82
	30	1,87 ± 0,18	2,48 ± 0,43**
	60	1,47 ± 0,11**	2,18 ± 0,43**
HBY	0,2	1,61 ± 0,13*	2,26 ± 0,39**

* P < 0,05, **P < 0,01 vs modelo

20 (4) Efectos del 6-mero sobre la actividad GSH-PX en ratones con EA

La actividad GSH-PX en el córtex cerebral y el hipocampo disminuye tras el uso de la A β con una diferencia significativa respecto al grupo de control en el hipocampo (p < 0,05). Su actividad aumenta en el córtex cerebral tras el tratamiento con el 6-mero, en el que la actividad es significativamente diferente tras el tratamiento con el oligosacárido de alginato a una dosificación de 60 mg/kg y con la HBY (p < 0,05). Los resultados se muestran en la tabla 11.

25 Tabla 11 Efectos del 6-mero sobre la actividad GSH-PX en el córtex cerebral y el hipocampo en ratones con EA inducida por la A β_{1-40} (n = 10, $\bar{x} \pm SE$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	GSH-PX (U/mg prot.)	
		córtex cerebral	hipocampo
Control	-	7,81 ± 1,20	5,39 ± 0,67
Modelo	-	6,43 ± 1,56	3,13 ± 0,58 [#]
6-mero	15	8,53 ± 0,86	4,13 ± 0,58
	30	7,12 ± 1,10	4,25 ± 0,54
	60	10,75 ± 1,80*	4,81 ± 0,95
HBY	0,2	8,85 ± 1,33	5,29 ± 0,99*

#P < 0,05 vs control; * P < 0,05 vs modelo

30 (5) Efectos del 6-mero sobre la actividad Na $^+$, K $^+$ -ATPasa en ratones con EA

35 La actividad Na $^+$, K $^+$ -ATPasa en el córtex cerebral y el hipocampo disminuye significativamente tras el tratamiento con la A β en comparación con el grupo de control, indicando que la A β afecta significativamente al metabolismo

energético de las neuronas del cerebro. Sin embargo, su actividad aumenta considerablemente tras el tratamiento con el oligosacárido de alginato a tres diferentes dosificaciones, en el que la actividad aumenta significativamente tras el tratamiento con 60 mg/kg en el hipocampo en comparación con la HBY, indicando que la mejora del nivel del metabolismo energético en el cerebro puede ser uno de los mecanismos del oligosacárido de alginato para proteger las funciones cerebrales y como anti-EA. Los resultados se muestran en la tabla 12.

5 Tabla 12 Efectos del 6-mero sobre la actividad Na^+ , K^+ -ATPasa en el córtex cerebral y el hipocampo en ratones con EA inducida por la $\text{A}\beta_{1-40}$ ($n = 10$, $\bar{x} \pm \text{SE}$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Actividad ATPasa ($\mu\text{mol Pi/mg prot. /hora}$)	
		córtex cerebral	hipocampo
Control	-	$1,06 \pm 0,05$	$2,65 \pm 0,38$
Modelo	-	$0,89 \pm 0,06^*$	$1,62 \pm 0,17^*$
6-mero	15	$1,08 \pm 0,06^*$	$2,10 \pm 0,29$
	30	$1,09 \pm 0,08^*$	$2,07 \pm 0,23$
	60	$1,08 \pm 0,05^*$	$2,52 \pm 0,25^*$
HBY	0,2	$0,91 \pm 0,05$	$2,35 \pm 0,43$

$P < 0,05$ vs control; * $P < 0,05$ vs modelo

10 5.2 Efectos protectores del 6-mero sobre las neuronas dañadas por la $\text{A}\beta$ *in vitro*

15 Se cultivan neuronas primarias de córtex cerebral de ratas como método de referencia (Banker GA, et al., "Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture" *Brain Res*, 1977, 126: 397-425). Se usan en este experimento células cultivadas durante 1 semana. Es decir, el 8º día las células se pretratan con una serie de concentraciones de 6-mero (concentración final de 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h, seguido de la adición de $\text{A}\beta_{25-35}$ envejecida (disuelta previamente en agua destilada con una concentración de 1 mg/ml , mantenida después a 37 °C durante 7 días para obtener $\text{A}\beta_{25-35}$ envejecida, y almacenada a -20 °C hasta su uso) con una concentración final de 30 μM . Despues de 24 h a 37 °C, se añaden 10 μl de MTT con una concentración de 5 mg/ml . Despues de 4 h a 37 °C, el sobrenadante se retira y se añaden 150 μl de DMSO. Despues se registra la absorbancia a 570 nm (630 nm como referencia) con un lector de ELISA (Rainbow, TECAN, Austria).

20 Se descubre que despues de incubar las neuronas primarias con $\text{A}\beta_{25-35}$ envejecida 30 μM , la reducción del MMT disminuye considerablemente y la tasa de supervivencia de las células se reduce significativamente hasta $54,5 \pm 8,9\%$ ($P < 0,001$) tras el tratamiento con $\text{A}\beta_{25-35}$ envejecida. El 6-mero a dosificaciones de 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ podría aumentar considerablemente las células supervivientes dañadas por la $\text{A}\beta_{25-35}$ de un modo dependiente de la dosis (la tasa de supervivencia es del $72,0 \pm 11,2\%$, $77,1 \pm 8,1\%$ y $82,3 \pm 11,6\%$ respectivamente).

25 El 6-mero tiene efectos protectores similares sobre la línea de células neuronales SH-SY5Y como en las neuronas primarias. Las SH-SY5Y dañadas por la $\text{A}\beta_{25-35}$ envejecida 30 μM (Fig. 7) y la $\text{A}\beta_{1-40}$ 2 μM (Fig. 8) durante 48 h podrían inducir una serie de cambios, por ejemplo, un daño a las células, una reducción del número de células, la aparición de algunas células redondeadas y células en suspensión. Asimismo, la tasa de supervivencia de las células se reduce al $73,3 \pm 9,4\%$ y al $64,1 \pm 2,5$, respectivamente. Sin embargo, el oligosacárido de alginato a una dosificación de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ podría inhibir significativamente la neurotoxicidad de la $\text{A}\beta$, por ejemplo, la aparición de células en suspensión se reduce y la tasa de supervivencia aumenta.

30 Los experimentos anteriores revelan que el 6-mero podría acortar la latencia de escape e incrementar el número de cruces de la placa original y acortar el tiempo de llegada a la placa original en ratones con EA inducida por la $\text{A}\beta_{1-40}$, lo que implica su actividad de mejora del comportamiento en ratones tratados con la $\text{A}\beta$. Este resultado *in vivo*, así 35 como los efectos protectores *in vitro* sobre neuronas primarias y líneas de células neuronales, sugieren que el 6-mero tiene actividad anti-EA.

40 6 Estudio del mecanismo de acción del 6-mero sobre la EA

45 6.1 Efectos del 6-mero sobre la apoptosis de la línea celular SH-SY5Y inducida por la $\text{A}\beta_{25-35}$

50 Se incuban células SH-SY5Y en placas de 6 pocillos a una densidad de 2×10^5 células por pocillo. Un día después de disponerlas en las placas, las células se pretratan con concentraciones variables (0, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) de 6-mero durante 24 h, seguido de la adición de $\text{A}\beta_{25-35}$ envejecida 30 μM (comprada a Sigma Co.). Al cabo de 48 h a 37 °C, las células se digieren, se recogen, se lavan, se centrifugan a 1200 rpm y se incuban con 200 ml de una mezcla de 5 mg/ml de yoduro de propidio (Hyclone Co.) y 100 U/ml de RNasa (Hyclone Co.). A continuación, las células se miden mediante citometría de flujo (BD Co., EE.UU.), con 8000 células por muestra.

55 Se descubre que las células SH-SY5Y estimuladas con la $\text{A}\beta_{25-35}$ envejecida 30 μM durante 48 h muestran un $24,8 \pm 1,9\%$ de células hipodiploides. Sin embargo, el pretratamiento con 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de 6-mero durante 24 h suprime

significativamente la apoptosis inducida por la A β_{25-35} envejecida, y los porcentajes observados de células hipodiploides son del 10,2 ± 1,3 % y 5,1 ± 0,7 %, respectivamente.

Además, se descubre que el 6-mero detiene también significativamente la cascada apoptótica invirtiendo la sobrecarga de ion calcio intracelular y la acumulación de ROS, y regulando a la alza la expresión de la Bcl-2 y regulando a la baja la expresión de la P53 y la Caspasa-3 inducida por la A β . Todos estos factores contribuyen al potencial terapéutico del 6-mero en el tratamiento de la EA.

6.2 Mecanismo molecular del 6-mero sobre la toxicidad anti-neuronal de la A β

10 (1) Efectos del 6-mero sobre la formación de fibrillas de A β_{1-40}

Se incuba A β_{1-40} fresca sola o con el 6-mero (concentración final de 10, 50, y 100 μ g/ml, respectivamente) a 37 °C durante 24 h. Tras la incubación, se añade Th-T y se controla la intensidad de la fluorescencia a Em = 450 nm y Ex = 480 nm.

15 Los resultados muestran que el 6-mero (a una dosificación de 10, 50, y 100 μ g/ml) puede inhibir la acumulación de la A β_{1-40} , siendo el efecto inhibidor de 100 μ g/ml de 6-mero el más obvio. La intensidad de la fluorescencia es de 10,46 ± 0,94, 9,18 ± 1,32 y 7,81 ± 1,38 ($p < 0,05$, 0,05 y 0,001, respectivamente), respectivamente. Se estudian los mismos efectos del 6-mero sobre la formación de fibrillas de A β_{1-40} con un TEM (Fig. 9), indicando que el 6-mero puede inhibir significativamente la formación de fibrillas de A β_{1-40} . Asimismo, se descubre que el 6-mero muestra un efecto inhibidor significativo sobre la formación de fibrillas de A β_{1-40} facilitadas por la heparina usando un TEM. En la Fig. 9 A muestra el resultado de la incubación con A β_{1-40} sola durante 24 h; B muestra el resultado de la incubación con una mezcla de A β_{1-40} y heparina durante 24 h; C muestra el resultado de la incubación con una mezcla de A β_{1-40} y 6-mero durante 24 h; D muestra el resultado de la incubación con una mezcla de A β_{1-40} , heparina y 6-mero durante 24 h; E muestra el resultado de la incubación con A β_{1-40} sola durante 48 h; F muestra el resultado de la incubación con una mezcla de A β_{1-40} y heparina durante 48 h; G muestra el resultado de la incubación con una mezcla de A β_{1-40} y 6-mero durante 48 h; y H muestra el resultado de la incubación con una mezcla de A β_{1-40} , heparina y 6-mero durante 48 h.

30 (2) Efectos desestabilizantes del 6-mero sobre las fibrillas de A β_{1-40}

Se envejece 1 mg/ml de A β_{1-40} disuelta en agua destilada a 37 °C durante 7 días, tras lo cual se expone al 6-mero durante 3 días. Se efectúa una tinción de la muestra con acetato de uranio y el TEM (JEM 1200EX) revela que la A β_{1-40} sola lleva a la formación de fibras retorcidas y largas después de un envejecimiento de 7 días (Fig. 10A). En presencia de heparina durante 24 h adicionales, las fibras retorcidas y largas se hacen mucho más densas y largas en comparación con aquellas formadas en ausencia de heparina (Fig. 10B). En particular, en presencia del 6-mero durante 3 días adicionales, las fibras de A β largas y agregadas se convierten en pequeñas fibras cortas e irregulares (Fig. 10C). Estos descubrimientos sugieren que el 6-mero es capaz de revertir las fibrillas de A β preformadas, destacando la acción desestabilizante del 6-mero sobre las fibrillas de A β preformadas y, por tanto, su intervención potencialmente terapéutica.

(3) Efectos desestabilizantes del 6-mero sobre la conformación de la A β_{1-40}

45 Los espectros de DC (J-500A, JASCO, Japón) de la A β_{1-40} monomérica (250 μ g/ml en TBS (Tris 100 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4)) incubada a 37 °C durante 12 h se caracterizan principalmente mediante una estructura secundaria de láminas β (Fig. 11A). La exposición simultánea de la A β_{1-40} monomérica al 6-mero (100 μ g/ml) durante 12 h evita la formación de láminas β (Fig. 11C). Sin embargo, la heparina acelera significativamente la transición conformacional a la estructura de láminas β (Fig. 11B).

50 (4) Interacción entre el 6-mero y la A β

55 Se usa la técnica de SPR (BIAcore X, Uppsala, Suecia) para caracterizar la interacción del 6-mero y la A β . Se hace fluir la A β_{1-40} con diferentes grados de envejecimiento (envejecida durante 0, 0,5, 1, 2, 4, y 6 d a 37 °C) en solución amortiguadora HBS EP (HEPES 0,01 M, 150 mmol/l de NaCl, 3,4 mmol/l de EDTA-Na₂, 0,005 % v/v de Tween-20, pH 7,4) con cinco concentraciones a través del chip sensor con el 6-mero inmovilizado. La velocidad de flujo es 5 μ l/min, y el volumen de inyección es 10 μ l. Se registra el sensograma de unión y el chip sensor se regenera con NaCl 2 M.

60 Se descubre que todos los diferentes grados de la A β_{1-40} envejecida se pueden unir al 6-mero. La afinidad de unión es más débil para la A β_{1-40} fresca y el 6-mero con un valor de la K_D de 6,85E-07 M. La afinidad de unión aumenta con el grado de envejecimiento (los valores de la K_D son 1,07E-07, 9,06E-08, 5,43E-08, 2,15E-08, 1,45E-08 M, respectivamente) y llega a ser esencialmente estable después de un envejecimiento de 2 días.

65 Estudios adicionales revelan que el 6-mero se une a toda la longitud de la A β a través de His13~Lys16, y se une a la A β_{25-35} a través de Ser26~Lys28. La unión del 6-mero con la A β fresca podría contribuir a su efecto inhibidor sobre la

fibrilogenesis de la A_β. La unión del 6-mero con la A_β envejecida podría contribuir a la desestabilización de las fibrillas de A_β.

Los estudios anteriores revelan que los mecanismos moleculares se atribuyen al hecho de que el 6-mero por un lado impide el proceso de fibrilogenesis global y, por otro, desensambla en particular las fibrillas de A_β. Estos resultados indican que el 6-mero, actuando como un antagonista de la cascada entera de la A_β, es un candidato preventivo y terapéutico potencial para la EA, lo que proporciona la prueba del principio para una nueva estrategia del tratamiento de la EA.

10 7 Estudio del 6-mero sobre modelos de diabetes

7.1 Efectos protectores del 6-mero sobre células beta pancreáticas dañadas por la amilina *in vitro*

15 Se cultiva una línea de células beta pancreáticas humanas NIT con medio DMEM que contiene FBS al 10 %. Las células se incuban en placas de 96 pocillos con una densidad de 1×10^4 células/pocillo. Un día después de disponerlas en las placas, las células se pretratan con concentraciones variables de 6-mero (concentración final de 0, 10, 50, 100 µg/ml) durante 24 h mediante la adición de amilina envejecida con una concentración final de 30 µM. Al cabo de 48 h a 37 °C, se mide la supervivencia de las células mediante el método MTT.

20 25 Los resultados muestran que el 6-mero podría aumentar la supervivencia de las células dañadas por la amilina de un modo dependiente de la dosis (Fig. 12). Cada grupo comprende 6 animales. Los datos se presentan como la media ± SE. ## significa una diferencia estadística en comparación con el grupo de control ($P < 0,01$). * y * significa una diferencia estadística en comparación con el grupo tratado con la IAPP ($p < 0,05$ y $p < 0,01$). Los datos sugieren que el 6-mero tiene efectos protectores sobre las células beta pancreáticas dañadas por la amilina.

25 30 35 7.2 Efectos del 6-mero sobre ratones con diabetes inducida por la estreptozotocina (STZ) *in vivo*

Se dividen aleatoriamente sesenta ratones NIH machos (con un peso de 18-22 g) en el grupo de control, el grupo modelo, los grupos tratados con 50, 150, y 450 mg/kg del 6-mero y los grupos tratados con 5 mg/kg de dimetilbiguanida. El día 1 se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal 150 mg/kg de STZ, a excepción del grupo de control. A continuación, se les administra a los ratones los fármacos correspondientes de modo consecutivo durante 10 días y el día 11 se les extirpa los glóbulos oculares para extraer sangre. La sangre se extrae para medir la concentración de glucosa. La concentración en cada grupo tratado con el 6-mero es significativamente menor que la del grupo modelo, indicando que el 6-mero tiene efectos terapéuticos sobre ratones con diabetes inducida por la STZ (tabla 13).

Tabla 13 Efectos del 6-mero sobre la concentración de glucosa en sangre de ratones con diabetes inducida por la STZ ($\bar{x} \pm SD$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de ratones	Concentración de glucosa en sangre (mg/dl)
Control	-	10	150,6 ± 36,8
Modelo	-	10	312,4 ± 89,2##
6-mero	50	10	219,4 ± 67,8*
	150	10	179,6 ± 69,8**
	450	10	162,5 ± 3**
Dimetilbiguanida	5	10	201,6 ± 58,9**

$P < 0,05$ vs control; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs modelo

40 45 50 55 Se efectúan los mismos experimentos con del 2-mero al 22-mero solos o con mezclas de los mismos, o los productos de degradación oxidativa de los mismos. Los resultados son similares a los del 6-mero, indicando su potencial actividad sobre la EA y la diabetes. Las figuras 13 a 16 muestran los resultados de la mezcla de productos de degradación oxidativa del oligosacárido de alginato sobre el comportamiento de ratones con EA inducida por la A_{β₁₋₄₀} inyectada en el cerebro. Cada grupo comprende 8 animales. Los datos se presentan como la media ± SE. Los símbolos # y ## significan una diferencia estadística en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$, $p < 0,01$), y * y ** significan una diferencia estadística en comparación con el grupo modelo ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Los datos revelan que la mezcla de productos de degradación oxidativa de los oligosacáridos puede mejorar significativamente la capacidad de aprendizaje y memoria en ratones con EA. La Figura 17 muestra los resultados protectores de la mezcla de productos de degradación oxidativa de los oligosacáridos de alginato sobre la línea de células beta pancreáticas NIT dañadas por la IAAp (amilina). Cada grupo comprende 6 animales. Los datos se presentan como la media ± SD. El símbolo ## significa una diferencia estadística en comparación con el grupo de control ($p < 0,01$), y * y ** significan una diferencia estadística en comparación con el grupo modelo ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Los datos revelan que la mezcla de productos de degradación oxidativa de los oligosacáridos de alginato tiene un significativo efecto preventivo y terapéutico sobre la diabetes.

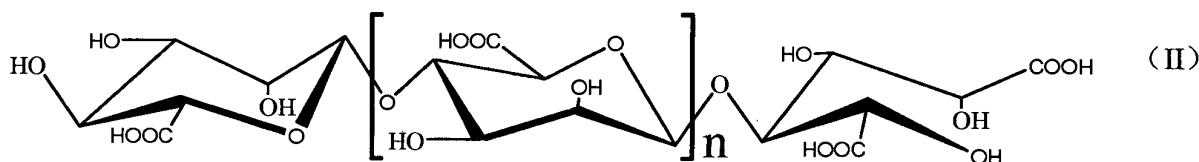
8. Análisis estadístico

Los datos se analizan estadísticamente usando el programa Statview, expresados como la media ± SE y se comparan mediante análisis de la varianza (ANOVA).

- 5 Basándose en los resultados anteriores, se puede preparar una composición farmacéutica que contenga una cantidad eficaz de los oligosacáridos de alginato y vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha composición farmacéutica incluye un inhibidor de la formación de fibrillas de la proteína β -amiloide y un inhibidor de la formación de fibrillas de la proteína amiloide de los islotes. El oligosacárido de alginato de acuerdo con la presente invención tiene un gran valor en la preparación de fármacos para la profilaxis y el tratamiento de la EA y la diabetes.
- 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Derivados del oligosacárido de alginato de acuerdo con la siguiente fórmula (II), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que el oligosacárido de alginato está compuesto por ácido β -D-manurónico unido mediante enlaces α -1,4 glucosídicos:



10 en la que n representa 0 o un número entero de 1 a 19.

- 10 2. Los derivados de alginato o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados por que n es de 2 a 12.

- 15 3. Los derivados de alginato o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados por que n es de 4 a 8.

4. Un proceso para la preparación de los derivados del oligosacárido de alginato o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el proceso las siguientes etapas:

- 20 5. se hace reaccionar una solución acuosa de alginato durante aproximadamente de 2 a 6 h en un autoclave a pH 2-6 y a una temperatura de aproximadamente 100-120 °C;
se ajusta el pH a aproximadamente 7 después de detener la reacción; y
se añade un oxidante, y se hace reaccionar durante de 15 min a 2 h a una temperatura de 100-120 °C.

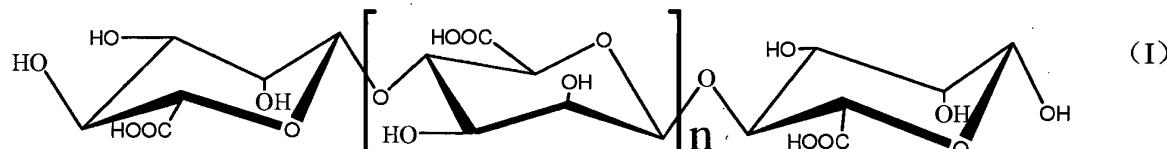
- 25 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que dicho alginato es alginato sódico y se hace reaccionar durante 4 h en las condiciones de pH 4 y 110 °C.

- 30 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que dicho oxidante es hidróxido de cobre y se hace reaccionar durante 30 min a una temperatura de 100 °C.

- 35 8. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de los derivados del oligosacárido de alginato, o de sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 40 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada por que la composición es una cualquiera de las seleccionadas del grupo que consiste en un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, un inhibidor de la formación de fibrillas de la proteína β -amiloide, un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la diabetes, un inhibidor de la formación de fibrillas de la proteína amiloide de los islotes, y un promotor de la disgregación de las fibrillas.

- 45 10. El oligosacárido de alginato de fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el oligosacárido de alginato está compuesto por ácido β -D-manurónico unido mediante enlaces α -1,4 glucosídicos:



- 50 11. en la que n representa 0 o un número entero de 1 a 19,
para su uso en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, como inhibidor de la formación de fibrillas de la proteína β -amiloide, para la profilaxis y el tratamiento de la diabetes, como inhibidor de la formación de fibrillas de la proteína amiloide de los islotes, y como promotor de la disgregación de las fibrillas.

ES 2 552 218 T3

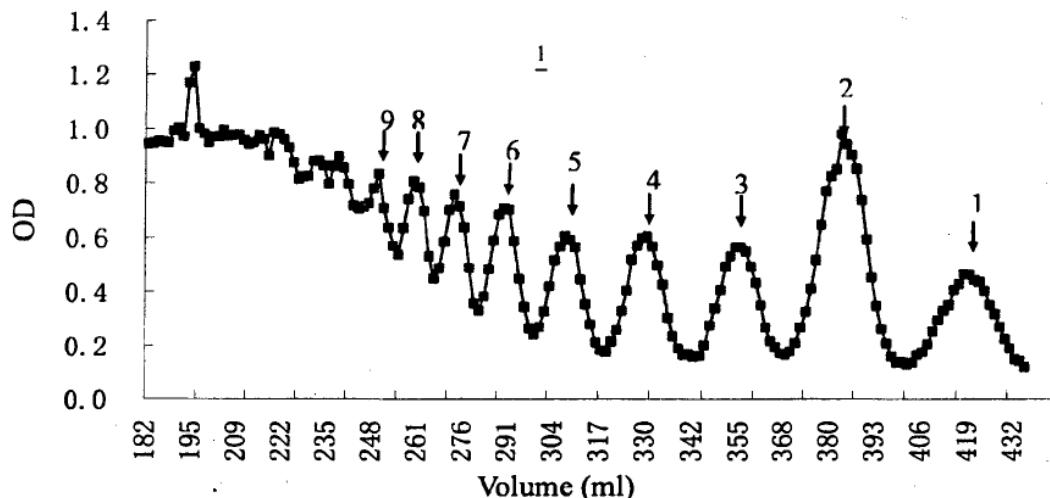


Fig.1

ESI-MS Spectrum, 6Q, 2003, 11, 12

Line#1 R.Time:10.630(Scan#315) Negative
 MassPeaks:338 BasePeak:536.4(44444)
 RunMode:Averaged 10.505-11.043(351-349)
 BG Mode:Averaged 2.551-2.991(80-100)

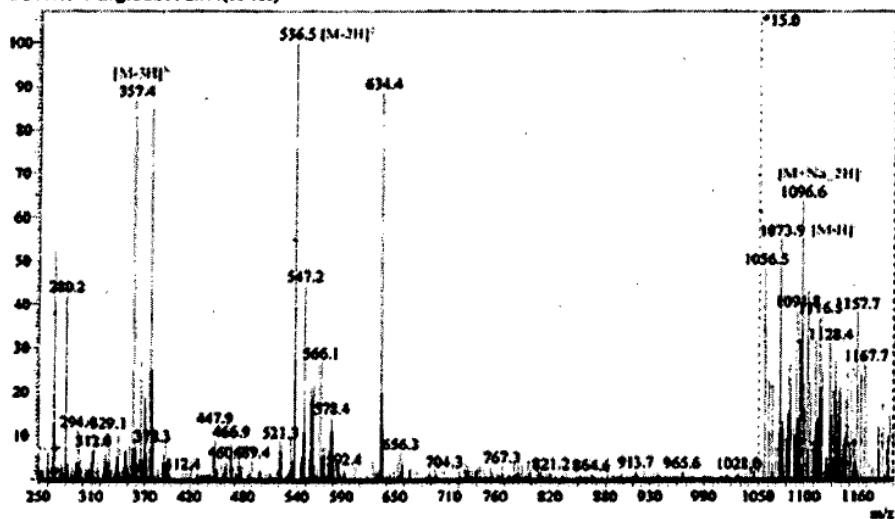


Fig.2

ES 2 552 218 T3

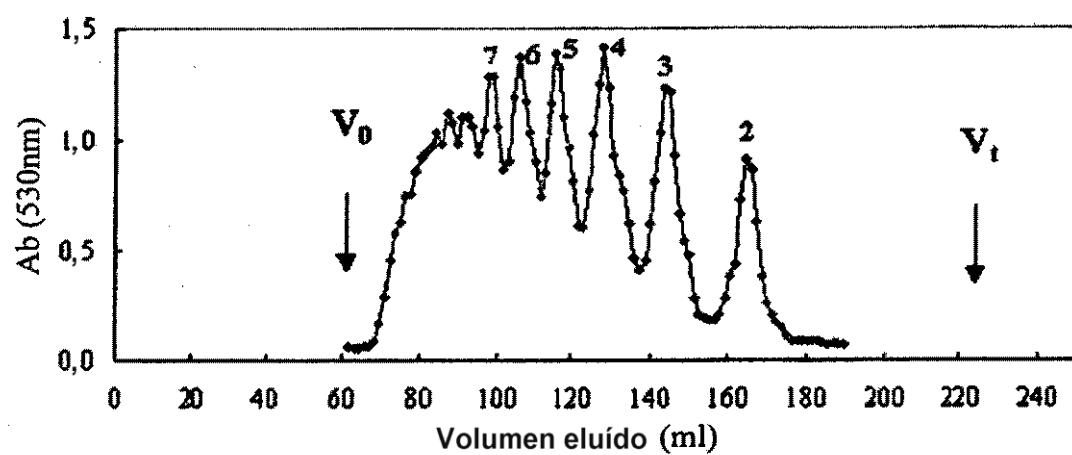


Fig.3

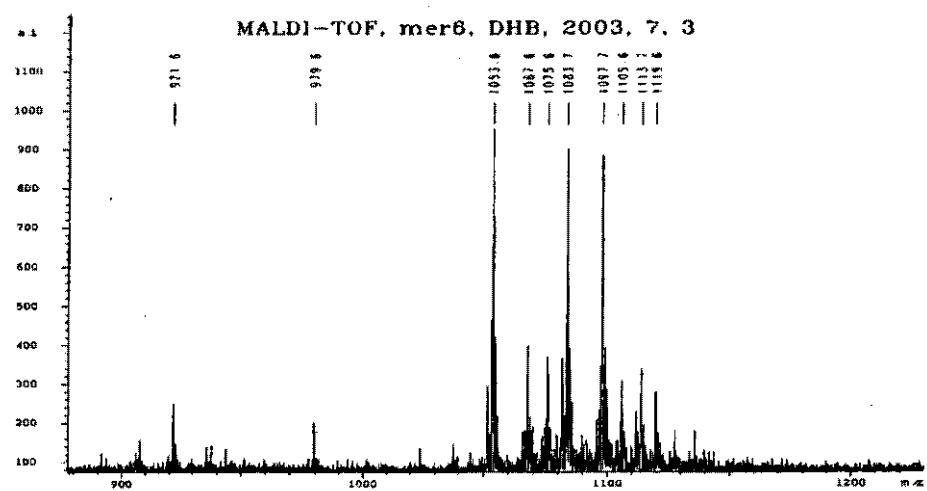


Fig. 4

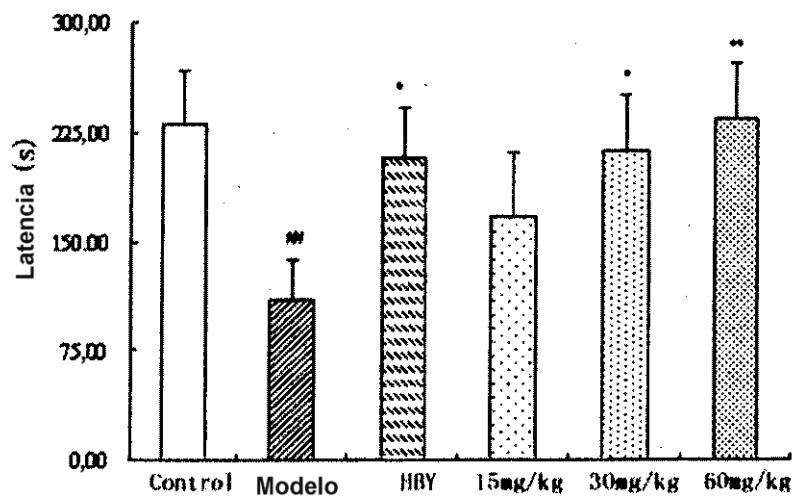


Fig. 5

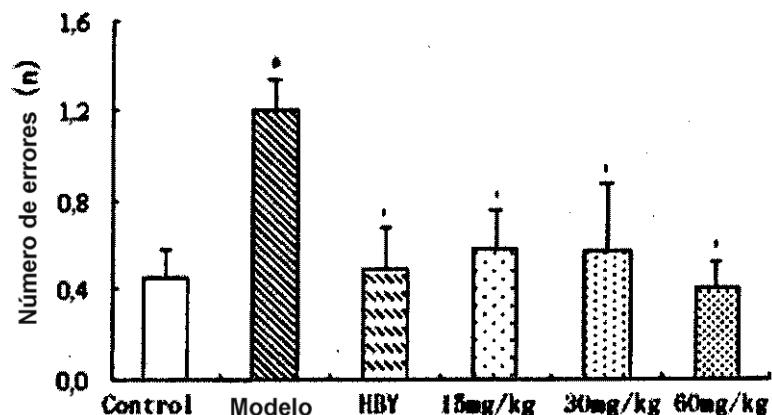


Fig. 6

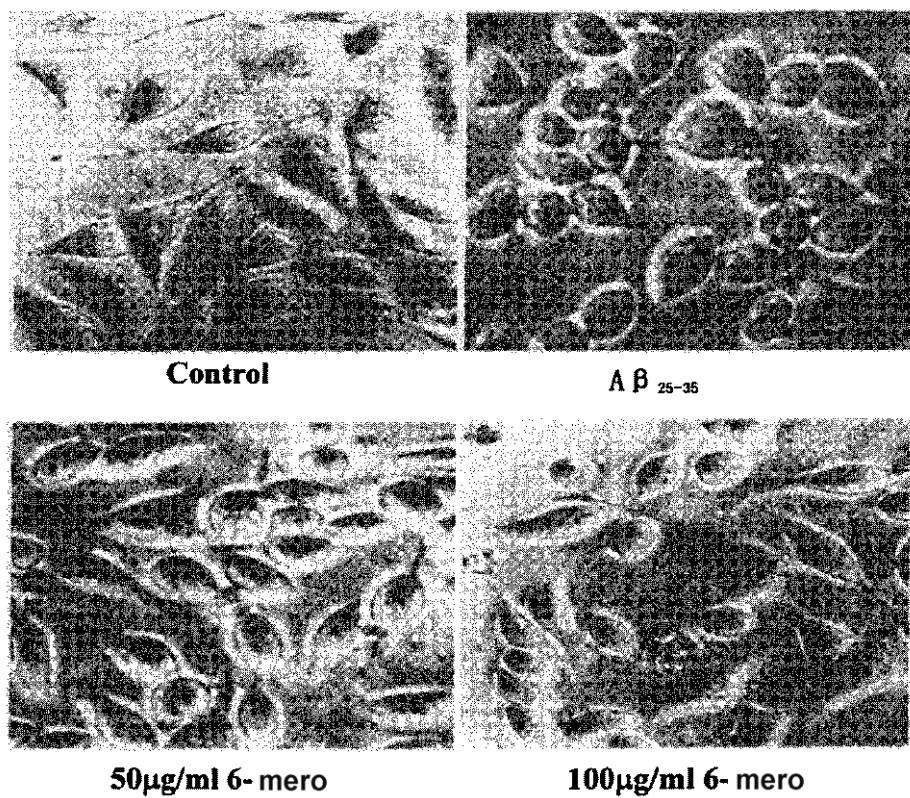


Fig.7

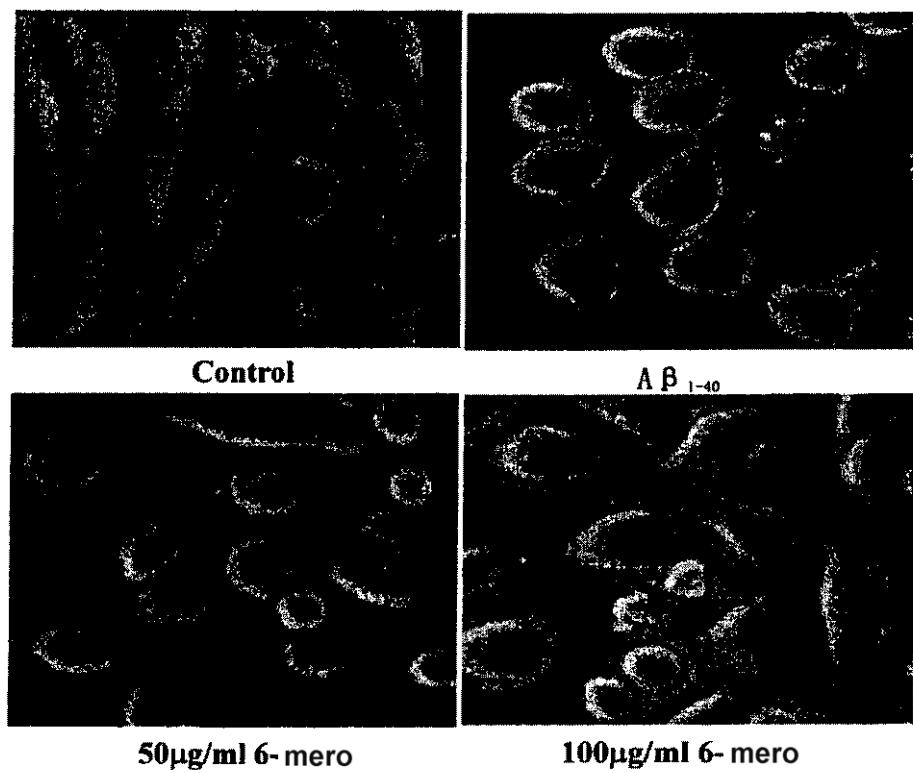


Fig. 8

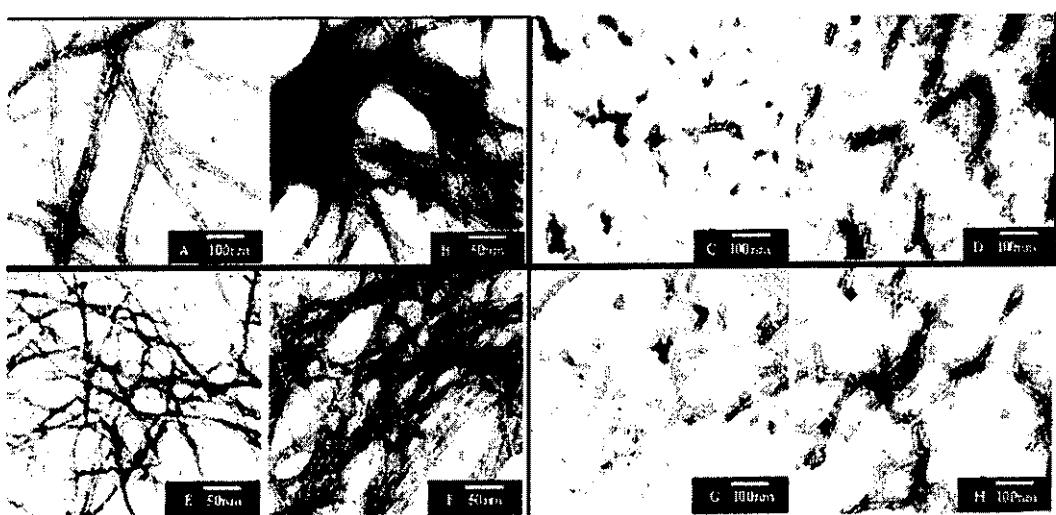


Fig. 9

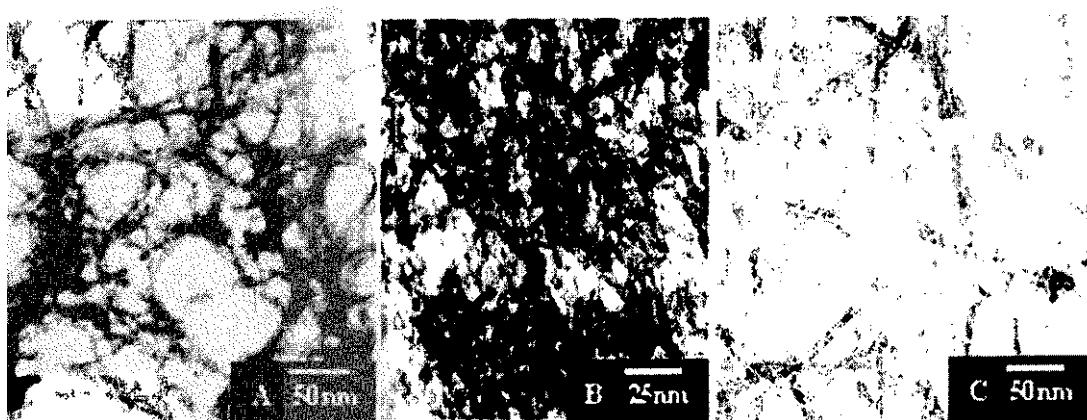


Fig. 10

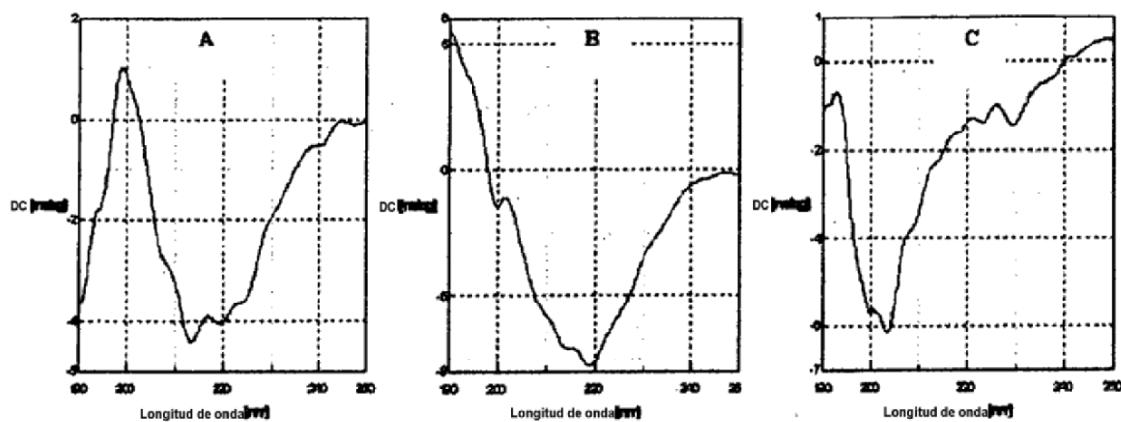


Fig. 11

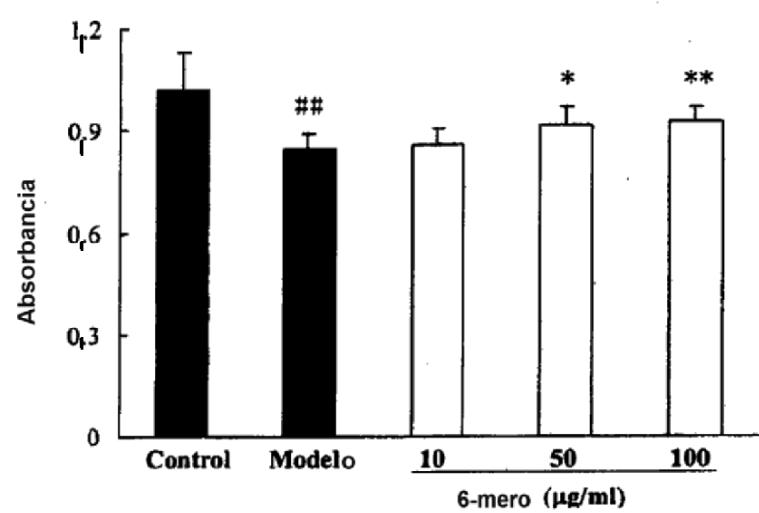


Fig.12

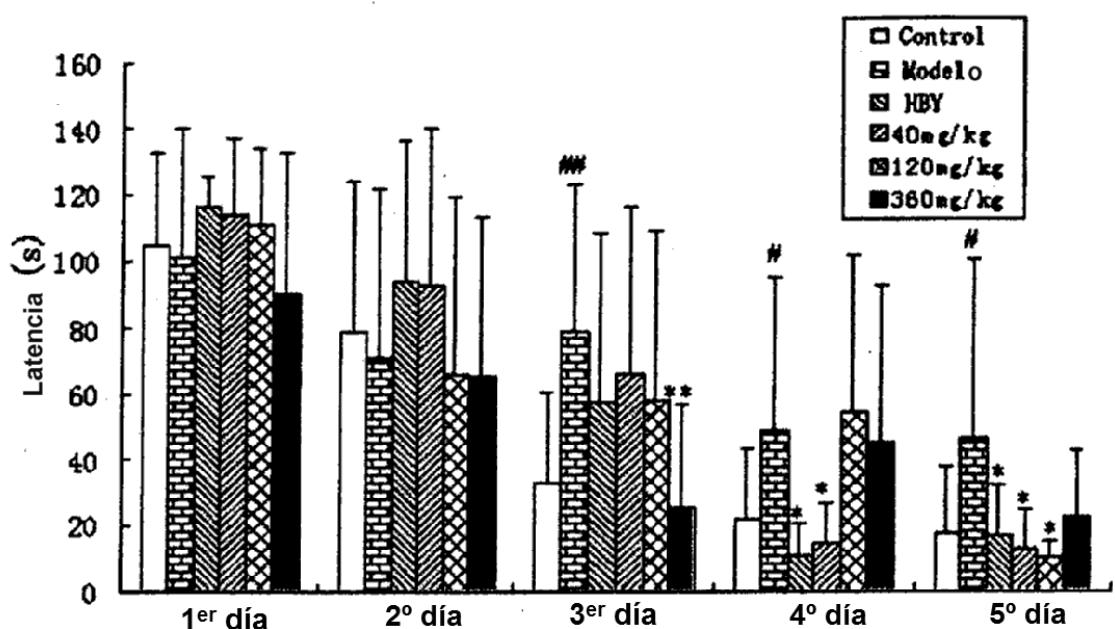


Fig. 13

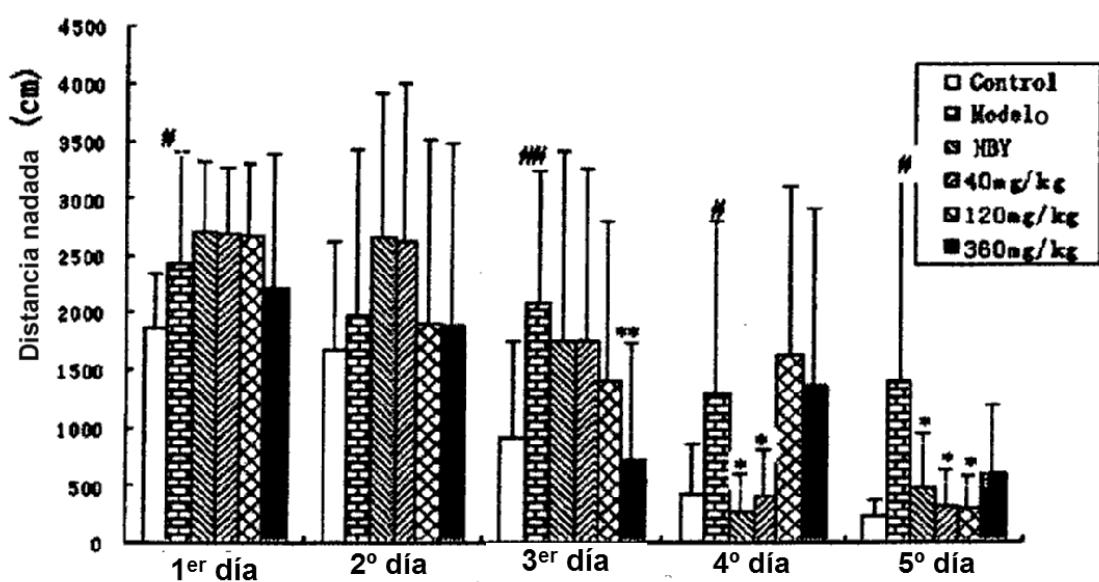


Fig. 14

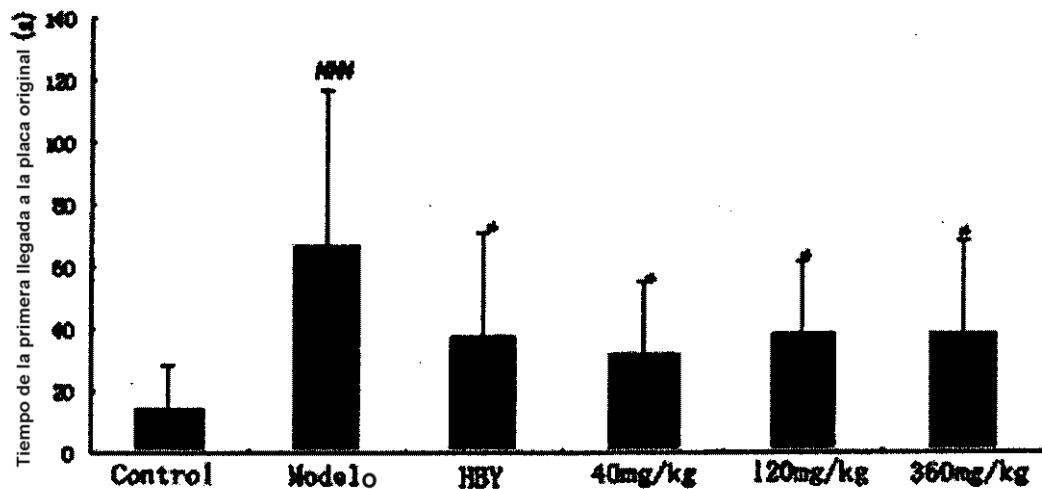


Fig. 15

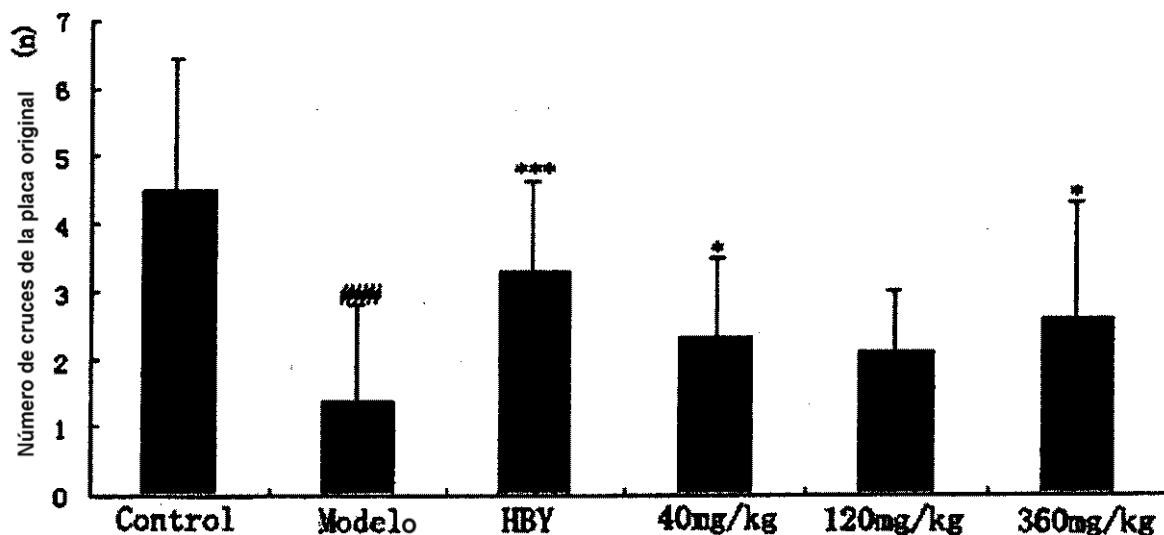


Fig. 16

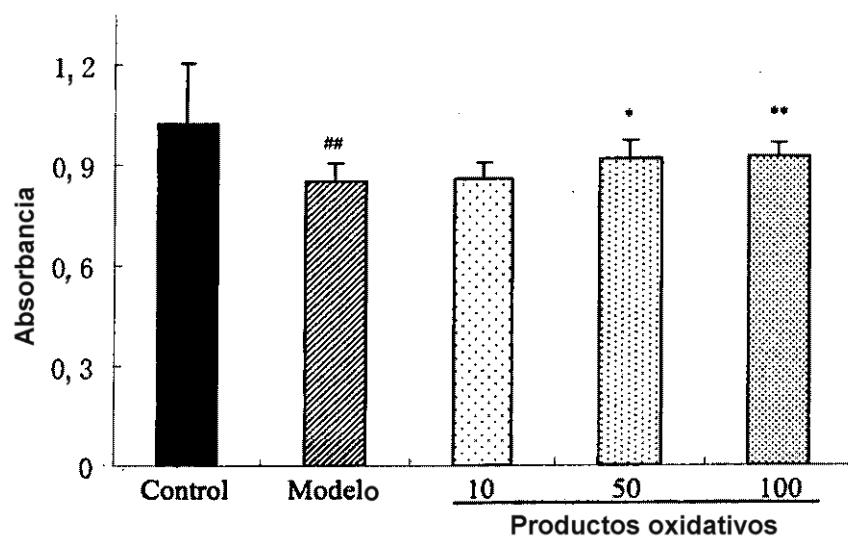


Fig. 17