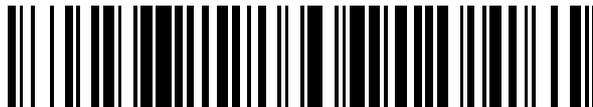


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 961**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C08L 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2013 PCT/US2013/075285**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14099724**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013 E 13817801 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2935339**

54 Título: **Preparación de poli(éteres de alfa-1,3-glucano)**

30 Prioridad:

20.12.2012 US 201261740087 P
20.12.2012 US 201261740106 P
20.12.2012 US 201261740076 P
20.12.2012 US 201261740127 P
20.12.2012 US 201261740119 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2020

73 Titular/es:

E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
Chestnut Run Plaza, 974 Center Road, P.O. Box
2915
Wilmington, DE 19805, US

72 Inventor/es:

PAULLIN, JAYME, L.;
PERTICONE, ANDREA M.;
KASAT, RAHUL, B. y
DENNES, T., JOSEPH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 740 961 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

Preparación de poli(éteres de alfa-1,3-glucano).

Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes Provisionales de EE.UU. núms. 61/740.076; 61/740.087; 61/740.106; 61/740.119 y 61/740.127; cada uno presentado el 20 de diciembre de 2012.

5 **Campo de la invención**

La invención es en el campo de derivados de poli-alfa-1,3-glucano. Específicamente, esta invención pertenece a los poli(éteres de alfa-1,3-glucano) y métodos de su preparación.

Antecedentes

10 Conducidos por un deseo de encontrar nuevos polisacáridos estructurales usando síntesis enzimáticas o ingeniería genética de microorganismos o huéspedes vegetales, los investigadores han descubierto polisacáridos que son biodegradables, y que pueden hacerse de forma económica a partir de materias primas basadas en fuentes renovables. Uno de dichos polisacáridos es poli-alfa-1,3-glucano, un polímero de glucano caracterizado por tener uniones alfa-1,3-glucosídicas. Este polímero se ha aislado poniendo en contacto una disolución acuosa de sacarosa con una enzima glucosiltransferasa aislada de *Streptococcus salivarius* (Simpson et al., Microbiology 141:1451-1460, 15 1995). Las películas preparadas a partir de poli-alfa-1,3-glucano toleran temperaturas de hasta 150°C y proporcionan una ventaja sobre los polímeros obtenidos a partir de polisacáridos beta-1,4-unidos (Ogawa et al., Fiber Differentiation Methods 47:353-362, 1980).

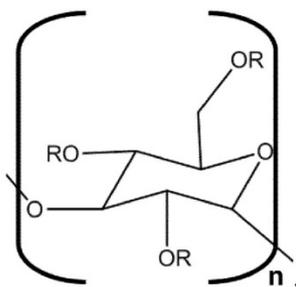
La Patente de EE.UU. 7.000.000 describió la preparación de una fibra de polisacárido que comprende unidades de hexosa, en donde al menos el 50% de las unidades de hexosa en el polímero se unieron por medio de uniones alfa-1,3-glucosídicas usando una enzima gtfJ de *S. salivarius*. Esta enzima utiliza sacarosa como un sustrato en una reacción de polimerización produciendo poli-alfa-1,3-glucano y fructosa como productos finales (Simpson et al., 1995). El polímero descrito formó una disolución cristalina líquida cuando se disolvió por encima de una concentración crítica en un disolvente o en una mezcla que comprende un disolvente. A partir de esta disolución, se hilaron y usaron fibras parecidas al algodón, fuertes, continuas, altamente adecuadas para usar en tejidos.

25 Kiho et al. (Carb. Res. 189:273-270, 1989) describió la extracción alcalina y aislamiento de poli-alfa-1,3-glucano del hongo, *Agrocybe cylindracea*, que se derivó adicionalmente a carboximetilglucano sódico (CMG). Este derivado de éter mostró propiedades anti-tumorales frente al sarcoma. De forma similar, Zhang et al. (Intl. Publ. No. CN1283633) describió la extracción de poli-alfa-1,3-glucano del hongo medicinal, *Ganoderma lucidum*, y su derivatización a CMG.

30 El desarrollo de nuevos derivados de poli(éter de alfa-1,3-glucano) y métodos de preparación de dichos derivados es deseable dada su potencial utilidad en varias aplicaciones.

Compendio de la invención

En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) representado por la estructura:



35 en donde

(i) n es 10 a 4000,

(ii) cada R es independientemente un H o un grupo orgánico, y

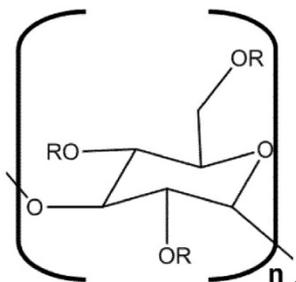
(iii) el compuesto tiene un grado de sustitución de 0,05 a 3,0, y el compuesto contiene dos o más tipos de grupo orgánico.

40 En una segunda realización, los grupos orgánicos se seleccionan de grupos hidroxialquilo, grupo alquilo o grupos carboxialquilo. Los grupos orgánicos pueden seleccionarse de grupos hidroxipropilo, dihidroxipropilo, hidroxietilo, metilo, etilo o grupos carboximetilo, por ejemplo. En una tercera realización, el valor de n es al menos 600, mientras que n es al menos 800 en una cuarta realización.

En una quinta realización, el grado de sustitución del compuesto poli(éter de alfa-1,3-glucano) es de 0,2 a 2,0.

En una sexta realización, la invención se refiere a un método para producir un compuesto poli(éter de alfa-1,3-glucano). Este método comprende poner en contacto poli-alfa-1,3-glucano en una reacción bajo condiciones alcalinas con al menos un agente de eterificación que comprende un grupo orgánico. El grupo orgánico se eterifica al poli-alfa-1,3-glucano en esta etapa de contacto, produciendo por consiguiente un compuesto poli(éter de alfa-1,3-glucano) representado por la estructura:

5



en donde

(i) n es 10 a 4000,

10 (ii) cada R es independientemente un H o el grupo orgánico, y

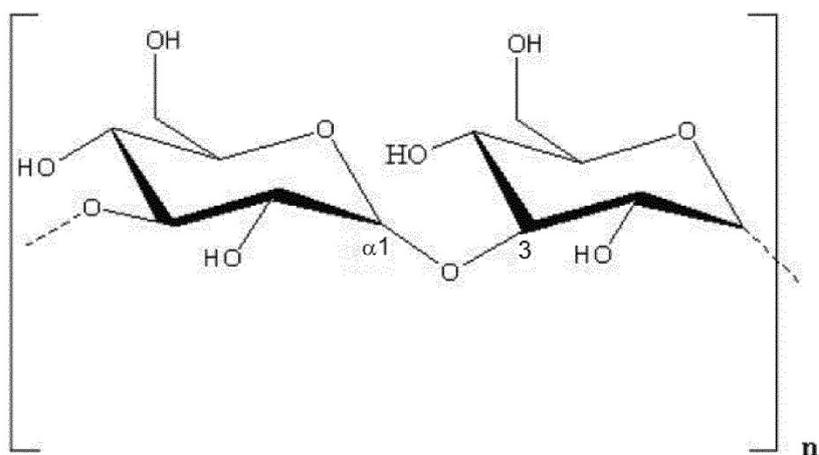
(iii) el compuesto tiene un grado de sustitución de 0,05 a 3,0, y el compuesto contiene dos o más tipos de grupo orgánico. Un poli(éter de alfa-1,3-glucano) producido por este método puede aislarse opcionalmente.

En realizaciones adicionales, los grupos orgánicos preferidos y los valores de "n" en el método son como se anotan anteriormente.

15 **Descripción detallada de la invención**

Como se usa en la presente memoria, el término "invención" o "invención descrita" no pretende ser limitante, sino que se aplica generalmente a cualquiera de las invenciones definidas en las reivindicaciones o descritas en la presente memoria. Estos términos se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

20 Los términos "poli-alfa-1,3-glucano", "polímero alfa-1,3-glucano" y "polímero de glucano" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. El poli-alfa-1,3-glucano es un polímero que comprende unidades monoméricas de glucosa unidas por uniones glucosídicas, en donde al menos aproximadamente el 50% de las uniones glucosídicas son uniones alfa-1,3-glucosídicas. El poli-alfa-1,3-glucano es un tipo de polisacárido. La estructura de poli-alfa-1,3-glucano puede ilustrarse como sigue:



25 El poli-alfa-1,3-glucano que puede usarse para preparar compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria puede prepararse usando métodos químicos. De forma alternativa, puede prepararse extrayéndolo de varios organismos, tales como hongos, que producen poli-alfa-1,3-glucano. Aún de forma alternativa, el poli-alfa-1,3-glucano puede producirse de forma enzimática a partir de sacarosa usando una o más enzimas glucosiltransferasa (gtf) (p.ej., gtfJ), tal como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 7.000.000, y las Publicaciones de Solicitud de Patente de

30 EE.UU. núms. 2013/0244288 y 2013/0244287, por ejemplo.

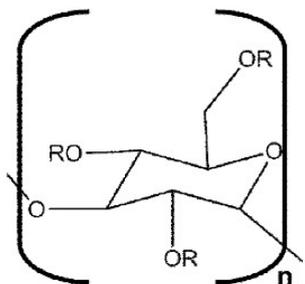
Los términos “enzima glucosiltransferasa”, “enzima gtf”, “catalizador enzimático gtf”, “gtf”, y “glucanosacarasa” se usan de forma intercambiable en la presente memoria. La actividad de una enzima gtf en la presente memoria cataliza la reacción del sustrato de sacarosa para hacer los productos de poli-alfa-1,3-glucano y fructosa. Otros productos (subproductos) de una reacción gtf pueden incluir glucosa (donde la glucosa se hidroliza a partir del complejo intermedio glucosilo-enzima gtf), varios oligosacáridos solubles (DP2-DP7), y leucrosa (donde la glucosa del complejo intermedio glucosilo-enzima gtf está unido a la fructosa). La leucrosa es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa unidas por una unión alfa-1,5. Las formas tipo salvaje de enzimas glucosiltransferasa contienen generalmente (en la dirección N-terminal a C-terminal) un péptido señal, un dominio variable, un dominio catalítico y un dominio de unión al glucano. Una gtf en la presente memoria se clasifica en la familia glucósido hidrolasa 70 (GH70) según la base de datos CAZy (enzimas activas de carbohidrato) (Cantarel et al., Nucleic Acids Res. 37:D233-238, 2009).

El porcentaje de uniones glucosídicas entre las unidades de monómero de glucosa de poli-alfa-1,3-glucano usadas para preparar compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria que son alfa-1,3 es al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% (o cualquier valor entero entre 50% y 100%). En dichas realizaciones, por consiguiente, el poli-alfa-1,3-glucano tiene menos de aproximadamente 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0% (o cualquier valor entero entre 0% y 50%) de uniones glucosídicas que no son alfa-1,3.

El poli-alfa-1,3-glucano usado para producir compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria es preferiblemente lineal/no ramificado. En ciertas realizaciones, el poli-alfa-1,3-glucano no tiene puntos de ramificación o menos de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de puntos de ramificación como un porcentaje de las uniones glucosídicas en el polímero. Ejemplos de puntos de ramificación incluyen puntos de ramificación alfa-1,6, tales como los presentes en el polímero mutante.

Los términos “unión glucosídica” y “enlace glucosídico” se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren al tipo de enlace covalente que une una molécula de carbohidrato (azúcar) a otro grupo tal como otro carbohidrato. El término “unión alfa-1,3-glucosídica” como se usa en la presente memoria se refiere al tipo de enlace covalente que une moléculas de alfa-D-glucosa las unas con las otras a través de carbonos 1 y 3 en anillos alfa-D-glucosa adyacentes. Esta unión se ilustra en la estructura de poli-alfa-1,3-glucano proporcionada anteriormente. En la presente memoria, “alfa-D-glucosa” se denominará como “glucosa”.

Los términos “compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano)”, “poli(éter de alfa-1,3-glucano)” y “derivado de poli(éter de alfa-1,3-glucano)” se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria puede representarse mediante la estructura:



Respecto a la fórmula de esta estructura, n puede ser al menos 6, y cada R puede ser independientemente un átomo de hidrógeno (H) o un grupo orgánico. Un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria tiene un grado de sustitución de 0,05 a 3,0.

Un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) se denomina un “éter” en la presente memoria en virtud a que comprende la subestructura $-C_G-O-C-$, donde “ $-C_G-$ ” representa el carbono 2, 4, o 6 de una unidad monomérica de glucosa de un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano), y donde “ $-C-$ ” está comprendido en el grupo orgánico.

Los compuestos de poli(éter-alfa-1,3-glucano) descritos en la presente memoria son compuestos sintéticos, hechos por el hombre.

Un grupo “grupo orgánico” como se usa en la presente memoria se refiere a una cadena de uno o más carbonos que (i) tiene la fórmula $-C_nH_{2n+1}$ (es decir, un grupo alquilo, que está completamente saturado) o (ii) está prácticamente saturado pero tiene uno o más hidrógenos sustituidos con otro átomo o grupo funcional (es decir, un “grupo alquilo sustituido”). Dicha sustitución puede ser con uno o más grupos hidroxilo, átomos de oxígeno (formando así un grupo aldehído o cetona), grupos carboxilo, u otros grupos alquilo. En otras palabras, en donde R es un grupo orgánico, R puede ser una cadena de uno o más carbonos saturados, o una cadena de carbonos que tiene uno o más hidrógenos sustituidos con un grupo hidroxilo, átomo de oxígeno (formando así un grupo aldehído o cetona), grupo carboxilo o grupo alquilo.

Un grupo "hidroxialquilo" en la presente memoria se refiere a un grupo alquilo sustituido en que uno o más átomos de hidrógeno del grupo alquilo están sustituidos con un grupo hidroxilo. Un grupo "carboxialquilo" en la presente memoria se refiere a un grupo alquilo sustituido en que uno o más átomos de hidrógeno del grupo alquilo están sustituidos con un grupo carboxilo.

- 5 Un "haluro" en la presente memoria se refiere a un compuesto que comprende uno o más átomos halógeno (p.ej., flúor, cloro, bromo, yodo). Un haluro en la presente memoria puede referirse a un compuesto que comprende uno o más grupos haluro tal como fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro. Un grupo haluro puede servir como un grupo reactivo de un agente de eterificación.

- 10 Los términos "reacción", "composición de reacción", y "reacción de eterificación" se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a una reacción que comprende al menos poli-alfa-1,3-glucano y un agente de eterificación. Estos componentes se disuelven y/o se mezclan típicamente en un hidróxido alcalino acuoso. Una reacción se pone en condiciones adecuadas (p.ej., tiempo, temperatura) para que el agente de eterificación eterifique uno o más grupos hidroxilo de las unidades de glucosa de poli-alfa-1,3-glucano con un grupo orgánico, proporcionando así un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano).

- 15 El término "condiciones alcalinas" en la presente memoria se refiere a un pH de disolución o mezcla de al menos 11 o 12. Las condiciones alcalinas pueden prepararse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como disolviendo un hidróxido alcalino en una disolución o mezcla.

- 20 Los términos "agente de eterificación" y "agente de alquilación" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Un agente de eterificación en la presente memoria se refiere a un agente que puede usarse para eterificar uno o más grupos hidroxilo de las unidades de glucosa de poli-alfa-1,3-glucano con un grupo orgánico. Un agente de eterificación comprende por consiguiente un grupo orgánico.

El término "lechada de poli-alfa-1,3-glucano" en la presente memoria se refiere a una mezcla acuosa que comprende los componentes de una reacción enzimática de glucosiltransferasa tal como poli-alfa-1,3-glucano, sacarosa, una o más enzimas glucosiltransferasa, glucosa y fructosa.

- 25 El término "torta húmeda de poli-alfa-1,3-glucano" en la presente memoria se refiere a poli-alfa-1,3-glucano que se ha separado de una lechada y se ha lavado con agua o una disolución acuosa. El poli-alfa-1,3-glucano no se seca cuando se prepara una torta húmeda.

- 30 El término "grado de sustitución" (DoS) como se usa en la presente memoria se refiere al número promedio de grupos hidroxilo sustituidos en cada unidad monomérica (glucosa) de un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano). Como hay tres grupos hidroxilo en cada unidad monomérica en el poli-alfa-1,3-glucano, el grado de sustitución en un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria puede ser no mayor que 3.

- 35 El término "sustitución molar" (M.S.) como se usa en la presente memoria se refiere a los moles de un grupo orgánico por unidad monomérica de un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano). De forma alternativa, M.S. puede referirse a los moles promedio de agente de eterificación usados para reaccionar con cada unidad monomérica en poli-alfa-1,3-glucano (M.S. puede así describir el grado de derivatización de un agente de eterificación). Se anota que el valor de M.S. para poli-alfa-1,3-glucano puede no tener un límite superior. Por ejemplo, cuando un grupo orgánico que contiene un grupo hidroxilo (p.ej., hidroxietilo o hidroxipropilo) se ha eterificado a poli-alfa-1,3-glucano, el grupo hidroxilo del grupo orgánico puede experimentar reacción adicional, acoplado así más del grupo orgánico al poli-alfa-1,3-glucano.

- 40 "Poner en contacto" en la presente memoria puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como disolución, mezcla, agitación u homogeneización, por ejemplo.

- 45 El "peso molecular" del poli-alfa-1,3-glucano y de compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria pueden representarse como peso molecular promedio en número (M_n) o como peso molecular promedio en peso (M_w). De forma alternativa, el peso molecular puede representarse como Daltons, gramos/mol, DP_w (grado de polimerización promedio en peso), o DP_n (grado de polimerización promedio en número). Varios medios se conocen en la técnica para calcular estas medidas de peso molecular, tal como cromatografía líquida a alta presión (HPLC), cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), o cromatografía de permeación en gel (GPC).

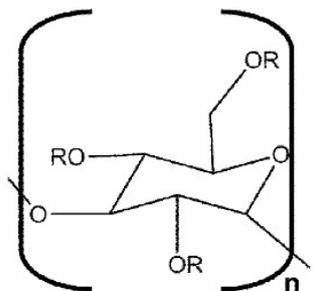
- 50 Los términos "porcentaje en volumen", "porcentaje de volumen", "% en volumen", y "% en v/v" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. El porcentaje en volumen de un soluto en una disolución puede determinarse usando la fórmula: $[(\text{volumen de soluto})/(\text{volumen de disolución})] \times 100\%$.

Los términos "porcentaje en peso", "porcentaje de peso (% en peso)" y "porcentaje en peso-peso (% en p/p)" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. El porcentaje en peso se refiere al porcentaje de un material en una base en masa como está comprendido en una composición, mezcla o disolución.

- 55 Los términos "aumentado", "realzado" y "mejorado" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Estos términos se refieren a una mayor cantidad o actividad tal como una cantidad o actividad ligeramente mayor que la

cantidad o actividad original, o una cantidad o actividad en gran exceso en comparación a la cantidad o actividad original, y que incluye todas las cantidades o actividades entre medias. De forma alternativa, estos términos pueden referirse a, por ejemplo, una cantidad o actividad que es al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175% o 200% (o cualquier número entero entre 1% y 200%) más que la cantidad o actividad para la que la cantidad o actividad aumentada se está comparando.

Las realizaciones de la invención descrita se refieren a una composición que comprende un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) representado por la estructura:



Con respecto a la fórmula de esta estructura, n es 10 a 4000, y cada R puede ser independientemente un H o un grupo orgánico. Además, el compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) tiene un grado de sustitución de 0,05 a 3,0, y el compuesto contiene dos o más tipos de grupo orgánico. De forma significativa, un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente invención puede ser un derivado de alquiléter y/o hidroxialquiléter de poli-alfa-1,3-glucano.

El grado de sustitución (DoS) de un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) descrito en la presente memoria puede ser de forma alternativa de 0,2 a 2,0, y el compuesto contiene dos o más tipos de grupo orgánico. De forma aún alternativa, el DoS puede ser al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3,0. Se entendería por los expertos en la técnica que como un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) descrito en la presente memoria tiene un grado de sustitución entre 0,05 a 3,0, y en virtud de que es un éter, los grupos R del compuesto no pueden ser solo hidrógeno.

El porcentaje de uniones glucosídicas entre las unidades monoméricas de glucosa del compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) que son alfa-1,3 es al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% (o cualquier número entero entre 50% y 100%). En dichas realizaciones, por consiguiente, el compuesto tiene menos de aproximadamente 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0% (o cualquier valor entero entre 0% y 50%) de uniones glucosídicas que no son alfa-1,3.

La estructura de un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) descrito en la presente memoria es preferiblemente lineal/no ramificada. En ciertas realizaciones, el compuesto no tiene puntos de ramificación o menos de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de puntos de ramificación como un porcentaje de las uniones glucosídicas en el polímero. Ejemplos de puntos de ramificación incluyen puntos de ramificación alfa-1,6.

La fórmula de un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en ciertas realizaciones puede tener un valor n de al menos 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900 o 4000 (o cualquier número entero entre 10 y 4000).

El peso molecular de un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) descrito en la presente memoria puede medirse como peso molecular promedio en número (M_n) o como peso molecular promedio en peso (M_w). De forma alternativa, el peso molecular puede medirse en Daltons o gramos/mol. Puede ser también útil referirse al DP_w (grado de polimerización promedio en peso) o DP_n (grado de polimerización promedio en número) del componente polimérico de poli-alfa-1,3-glucano del compuesto.

El M_n o M_w de los compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) descritos en la presente memoria puede ser al menos aproximadamente 1000. De forma alternativa, el M_n o M_w puede ser al menos aproximadamente 1000 a aproximadamente 600000. Aún de forma alternativa, el M_n o M_w puede ser al menos aproximadamente 10000, 25000, 50000, 75000, 100000, 150000, 200000, 250000, 300000, 350000, 400000, 450000, 500000, 550000 o 600000 (o cualquier número entero entre 10000 y 600000), por ejemplo.

Cada grupo R en la fórmula del compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) puede ser independientemente un H o un grupo orgánico. Un grupo orgánico puede ser un grupo alquilo tal como un grupo metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo o decilo, por ejemplo.

De forma alternativa, un grupo orgánico puede ser un grupo alquilo sustituido en que hay una sustitución en uno o más carbonos del grupo alquilo. La(s) sustitución(ones) puede(n) ser uno o más grupos hidroxilo, aldehído, cetona y/o

carboxilo. Por ejemplo, un grupo alquilo sustituido puede ser un grupo hidroxialquilo, grupo dihidroxialquilo o grupo carboxialquilo.

Ejemplos de grupos hidroxialquilo adecuados son grupos hidroximetilo (-CH₂OH), hidroxietilo (p.ej., -CH₂CH₂OH, -CH(OH)CH₃), hidroxipropilo (p.ej., -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH(OH)CH₃, -CH(OH)CH₂CH₃), hidroxibutilo e hidroxipentilo. Otros ejemplos incluyen grupos dihidroxialquilo (dioles) tales como grupos dihidroximetilo, dihidroxietilo (p.ej., -CH(OH)CH₂OH), dihidroxipropilo (p.ej., -CH₂CH(OH)CH₂OH, -CH(OH)CH(OH)CH₃), dihidroxibutilo y dihidroxipentilo.

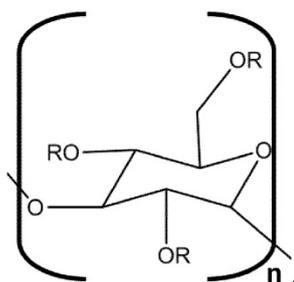
Ejemplos de grupos carboxialquilo adecuados son grupos carboximetilo (-CH₂COOH), carboxietilo (p.ej., -CH₂CH₂COOH, -CH(COOH)CH₃), carboxipropilo (p.ej., -CH₂CH₂CH₂COOH, -CH₂CH(COOH)CH₃, -CH(COOH)CH₂CH₃), carboxibutilo y carboxipentilo.

Aún de forma alternativa, uno o más carbonos de un grupo alquilo pueden tener una(s) sustitución(ones) con otro grupo alquilo. Ejemplos de dichos grupos sustituyentes son grupos metilo, etilo y propilo. Para ilustrar, un grupo R puede ser -CH(CH₃)CH₂CH₃ o -CH₂CH(CH₃)CH₃, por ejemplo, que son ambos grupos propilo que tienen una sustitución metilo.

Como estaría claro a partir de los ejemplos anteriores de varios grupos alquilo sustituidos, una sustitución (p.ej., grupo hidroxilo o carboxilo) en un grupo alquilo en ciertas realizaciones puede unirse al átomo de carbono terminal del grupo alquilo, donde el grupo carbono terminal es contrario al extremo que está en la unión éter al grupo glucosa en la fórmula anterior. Un ejemplo de esta sustitución terminal es el grupo hidroxipropilo -CH₂CH₂CH₂OH. De forma alternativa, una sustitución puede ser un átomo de carbono interno de un grupo alquilo. Un ejemplo de una sustitución interna es el grupo hidroxipropilo -CH₂CH(OH)CH₃. Un grupo alquilo puede tener una o más sustituciones, que pueden ser iguales (p.ej., dos grupos hidroxilo [dihidroxil]) o diferentes (p.ej., un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo).

Los compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) descritos en la presente memoria contienen dos o más tipos diferentes de grupos orgánicos. Ejemplos de dichos compuestos contienen (i) dos grupos alquilo diferentes como grupos R, (ii) un grupo alquilo y un grupo hidroxialquilo como grupos R (alquil-hidroxialquil poli-alfa-1,3-glucano, hablando genéricamente), (iii) un grupo alquilo y un grupo carboxialquilo como grupos R (alquil-carboxialquil poli-alfa-1,3-glucano, hablando genéricamente), (iv) un grupo hidroxialquilo y un grupo carboxialquilo como grupos R (hidroxialquil-carboxialquil poli-alfa-1,3-glucano, hablando genéricamente), (v) dos grupos hidroxialquilo diferentes como grupos R, o (vi) dos grupos carboxialquilo diferentes como grupos R. Ejemplos no limitantes específicos de dichos compuestos incluyen etil-hidroxietil poli-alfa-1,3-glucano (es decir, donde los grupos R son independientemente H, etilo o hidroxietilo), hidroxialquil-metil poli-alfa-1,3-glucano (es decir, donde los grupos R son independientemente H, hidroxialquilo o metilo), carboximetil-hidroxietil poli-alfa-1,3-glucano (es decir, donde los grupos R son independientemente H, carboximetilo o hidroxietilo) y carboximetil-hidroxipropil poli-alfa-1,3-glucano (es decir, donde los grupos R son independientemente H, carboximetilo o hidroxipropilo). Ciertas realizaciones de compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) que contienen dos o más tipos diferentes de grupos orgánicos no tienen un grupo carboxialquilo (p.ej., grupo carboximetilo) como uno de los grupos orgánicos.

La invención descrita también se refiere a un método para producir un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano). Este método comprende: poner en contacto poli-alfa-1,3-glucano en una reacción bajo condiciones alcalinas con al menos un agente de eterificación que comprende un grupo orgánico, en donde el agente de eterificación se eterifica al poli-alfa-1,3-glucano produciendo así un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) representado por la estructura:



en donde

(i) n es 10 a 4000,

(ii) cada R es independientemente un H o el grupo orgánico, y

(iii) el compuesto tiene un grado de sustitución de 0,05 a 3,0, y el compuesto contiene dos o más tipos de grupo orgánico.

Un poli(éter de alfa-1,3-glucano) producido por este método puede aislarse opcionalmente.

El poli-alfa-1,3-glucano se pone en contacto en una reacción bajo condiciones alcalinas con al menos un agente de eterificación que comprende un grupo orgánico. Esta etapa puede realizarse, por ejemplo, preparando primero las condiciones alcalinas poniendo en contacto poli-alfa-1,3-glucano con un disolvente y uno o más hidróxidos alcalinos para proporcionar una disolución o mezcla. Las condiciones alcalinas de la reacción pueden comprender por consiguiente una disolución de hidróxido alcalino. El pH de las condiciones alcalinas puede ser al menos aproximadamente 11,0, 11,2, 11,4, 11,6, 11,8, 12,0, 12,2, 12,4, 12,6, 12,8 o 13,0.

Pueden usarse varios hidróxidos alcalinos, tal como hidróxido sódico, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de litio y/o hidróxido de tetraetilamonio. La concentración de hidróxido alcalino en un preparado con poli-alfa-1,3-glucano y un disolvente puede ser de aproximadamente 1-70% en peso, 5-50% en peso, 10-50% en peso, 10-40% en peso o 10-30% en peso (o cualquier número entero entre 1 y 70% en peso). De forma alternativa, la concentración de hidróxido alcalino tal como hidróxido sódico puede ser al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30% en peso. Un hidróxido alcalino usado para preparar condiciones alcalinas puede estar en una disolución completamente acuosa o una disolución acuosa que comprende uno o más disolventes orgánicos solubles en agua tal como etanol o isopropanol. De forma alternativa, un hidróxido alcalino puede añadirse como un sólido para proporcionar condiciones alcalinas.

Varios disolventes orgánicos que pueden incluirse opcionalmente cuando se prepara la reacción incluyen alcoholes acetona, dioxano, isopropanol y tolueno, por ejemplo; ninguno de estos disolventes disuelve al poli-alfa-1,3-glucano. El tolueno o isopropanol pueden usarse en ciertas realizaciones. Un disolvente orgánico puede añadirse antes o después de la adición de hidróxido alcalino. La concentración de un disolvente orgánico (p.ej., isopropanol o tolueno) en un preparado que comprende poli-alfa-1,3-glucano y un hidróxido alcalino puede ser al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90% en peso (o cualquier número entero entre 10 y 90% en peso).

De forma alternativa, los disolventes que pueden disolver poli-alfa-1,3-glucano pueden usarse cuando se prepara la reacción. Estos disolventes incluyen, aunque no están limitados a, cloruro de litio (LiCl)/N,N-dimetil-acetamida (DMAc), SO₂/dietilamina (DEA)/dimetilsulfóxido (DMSO), LiCl/1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), N,N-dimetilformamida (DMF)/N₂O₄, DMSO/trihidrato de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), N-metilmorfolina-N-óxido (NMMO), disoluciones acuosas de Ni(tren)(OH)₂ [tren¼tris(2-aminoetil)amina] y fundidos de LiClO₄·3H₂O, disoluciones acuosas de NaOH/urea, hidróxido sódico acuoso, hidróxido de potasio acuoso, ácido fórmico y líquidos iónicos.

El poli-alfa-1,3-glucano puede ponerse en contacto con un disolvente y uno o más hidróxidos alcalinos mediante mezcla. Dicha mezcla puede realizarse durante o después de añadir estos componentes los unos con los otros. La mezcla puede realizarse mediante mezcla manual, mezcla usando un mezclador vertical, usando una barra agitadora magnética, o agitando, por ejemplo. En ciertas realizaciones, el poli-alfa-1,3-glucano puede mezclarse primero en agua o una disolución acuosa antes de mezclarse con un disolvente y/o hidróxido alcalino.

Después de poner en contacto el poli-alfa-1,3-glucano, disolvente, y uno o más hidróxidos alcalinos los unos con los otros, la composición resultante puede mantenerse opcionalmente a temperatura ambiente durante hasta 14 días. El término "temperatura ambiente" como se usa en la presente memoria se refiere a una temperatura entre aproximadamente 15-30°C o 20-25°C (o cualquier número entero entre 15 y 30°C). De forma alternativa, la composición puede calentarse con o sin reflujo a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 150°C (o cualquier número entero entre 30 y 150°C) durante hasta aproximadamente 48 horas. La composición en ciertas realizaciones puede calentarse a aproximadamente 55°C durante aproximadamente 30 minutos o 60 minutos. Por consiguiente, una composición obtenida de mezclar un poli-alfa-1,3-glucano, disolvente, y uno o más hidróxidos alcalinos los unos con los otros pueden calentarse a aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60°C durante aproximadamente 30-90 minutos.

Después de poner en contacto poli-alfa-1,3-glucano, disolvente, y uno o más hidróxidos alcalinos los unos con los otros, la composición resultante puede filtrarse opcionalmente (con o sin aplicar una etapa de tratamiento de temperatura). Dicha filtración puede realizarse usando un embudo, centrífuga, filtro de presión o cualquier otro método y/o equipo conocido en la técnica que permita la extracción de líquidos de sólidos. Aunque la filtración eliminaría mucho del hidróxido de alquilo, el poli-alfa-1,3-glucano filtrado permanecería alcalino (es decir, poli-alfa-1,3-glucano mercerizado), proporcionando así condiciones alcalinas.

Un agente de eterificación que comprende un grupo orgánico se pone en contacto con poli-alfa-1,3-glucano en una reacción bajo condiciones alcalinas en un método en la presente memoria de producción de compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano). Por ejemplo, un agente de eterificación puede añadirse a una composición preparada poniendo en contacto poli-alfa-1,3-glucano, disolvente, y uno o más hidróxidos alcalinos con cada uno de los demás como se describe anteriormente. De forma alternativa, un agente de eterificación puede incluirse cuando se preparan las condiciones alcalinas (p.ej., un agente de eterificación puede mezclarse con poli-alfa-1,3-glucano y disolvente antes de la mezcla con hidróxido alcalino).

Un agente de eterificación en la presente memoria se refiere a un agente que puede usarse para eterificar dos o más grupos hidroxilo de las unidades de glucosa de poli-alfa-1,3-glucano con un grupo orgánico como se define

anteriormente. Los ejemplos de dichos grupos orgánicos incluyen grupos alquilo, grupos hidroxialquilo y grupos carboxialquilo.

Dos o más agentes de eterificación pueden usarse en la reacción.

5 Los agentes de eterificación adecuados para preparar un compuesto alquil poli(éter de alfa-1,3-glucano) incluyen, por ejemplo, sulfatos de dialquilo, carbonatos de dialquilo, haluros de alquilo (p.ej., cloruro de alquilo), yodoalcanos, triflatos de alquilo (trifluorometanosulfonatos de alquilo) y fluorosulfonatos de alquilo. Por consiguiente, los ejemplos de agentes de eterificación para producir metil poli(éteres de alfa-1,3-glucano) incluyen sulfato de dimetilo, carbonato de dimetilo, cloruro de metilo, yodometano, triflato de metilo y fluorosulfonato de metilo. Los ejemplos de agentes de eterificación para producir etil poli(éteres de alfa-1,3-glucano) incluyen sulfato de dietilo, carbonato de dietilo, cloruro de etilo, yodoetano, triflato de etilo y fluorosulfonato de etilo. Los ejemplos de agentes de eterificación para producir propil poli(éteres de alfa-1,3-glucano) incluyen sulfato de dipropilo, carbonato de dipropilo, cloruro de propilo, yodopropano, triflato de propilo y fluorosulfonato de propilo. Los ejemplos de agentes de eterificación para producir butil poli(éteres de alfa-1,3-glucano) incluyen sulfato de dibutilo, carbonato de dibutilo, cloruro de butilo, yodobutano y triflato de butilo.

15 Los agentes de eterificación adecuados para preparar un compuesto de hidroxialquil poli(éter de alfa-1,3-glucano) incluyen, por ejemplo, óxidos de alquilenos tales como óxido de etileno, óxido de propileno (p.ej., óxido de 1,2-propileno), óxido de butileno (p.ej., óxido de 1,2-butileno, óxido de 2,3-butileno; óxido de 1,4-butileno), o combinaciones de los mismos. Como ejemplos, el óxido de propileno puede usarse como un agente de eterificación para preparar hidroxipropil poli-alfa-1,3-glucano, y el óxido de etileno puede usarse como un agente de eterificación para preparar hidroxietil poli-alfa-1,3-glucano. De forma alternativa, los haluros de hidroxialquilo (p.ej., cloruro de hidroxialquilo) pueden usarse como agentes de eterificación para preparar hidroxialquil poli-alfa-1,3-glucano. Los ejemplos de haluros de hidroxialquilo incluyen haluro de hidroxietilo, haluro de hidroxipropilo (p.ej., cloruro de 2-hidroxipropilo, cloruro de 3-hidroxipropilo) y haluro de hidroxibutilo. De forma alternativa, pueden usarse clorhidrinas de alquilenos como agentes de eterificación para preparar hidroxialquil poli-alfa-1,3-glucano. Las clorhidrinas de alquilenos que pueden usarse incluyen, aunque no están limitadas a, clorhidrina de etileno, clorhidrina de propileno, clorhidrina de butileno o combinaciones de estas.

Los agentes de eterificación adecuados para preparar un compuesto de dihidroxialquil poli(éter de alfa-1,3-glucano) incluyen haluros de hidroxialquilos (p.ej., cloruro de dihidroxialquilo) tal como haluro de dihidroxietilo, haluro de dihidroxipropilo (p.ej., cloruro de 2,3-dihidroxipropilo [es decir, 3-cloro-1,2-propanodiol]), o haluro de dihidroxibutilo, por ejemplo, cloruro de 2,3-dihidroxipropilo puede usarse para preparar dihidroxipropil poli-alfa-1,3-glucano, por ejemplo.

Los agentes de eterificación adecuados para preparar un compuesto de carboxialquil poli(éter de alfa-1,3-glucano) pueden incluir haloalquilatos (p.ej., cloroalquilato). Ejemplos de haloalquilatos incluyen haloacetato (p.ej., cloroacetato), 3-halopropionato (p.ej., 3-cloropropionato) y 4-halobutirato (p.ej., 4-clorobutirato). Por ejemplo, puede usarse cloroacetato (monocloroacetato) (p.ej., cloroacetato sódico) como un agente de eterificación para preparar carboximetil poli-alfa-1,3-glucano.

40 Cuando se produce un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) con dos o más grupos orgánicos diferentes según la invención, se usan dos o más agentes de eterificación diferentes. Por ejemplo, tanto un óxido de alquilenos como un cloruro de alquilo podrían usarse como agentes de eterificación para producir un alquil-hidroxialquil poli(éter de alfa-1,3-glucano). Cualquiera de los agentes de eterificación descritos en la presente memoria puede combinarse por lo tanto para producir compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) con dos o más grupos orgánicos diferentes. Dichos dos o más agentes de eterificación pueden usarse en la reacción al mismo tiempo, o pueden usarse de forma secuencial en la reacción. Cuando se usan secuencialmente, cualquiera de las etapas de tratamiento de temperatura (p.ej., calentamiento) descritas a continuación pueden usarse opcionalmente entre cada adición. Se puede elegir la introducción secuencial de agentes de eterificación para controlar el DoS deseado de cada grupo orgánico. En general, un agente de eterificación particular podría usarse primero si el grupo orgánico que forma en el producto éter se desea a un mayor DoS en comparación al DoS de otro grupo orgánico a añadir.

La cantidad de agente de eterificación a poner en contacto con poli-alfa-1,3-glucano en una reacción en condiciones alcalinas puede determinarse en base al grado de sustitución necesario en el compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) a producir. La cantidad de grupos de sustitución de éter en cada unidad monomérica en los compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) producidos en la presente memoria puede determinarse usando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). El valor de sustitución molar (MS) para poli-alfa-1,3-glucano no tiene límite superior. En general, un agente de eterificación puede usarse en una cantidad de al menos aproximadamente 0,05 moles por mol de poli-alfa-1,3-glucano. No hay límite superior a la cantidad de agente de eterificación que puede usarse.

55 Las reacciones para producir compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria pueden realizarse opcionalmente en un recipiente a presión tal como un reactor Parr, un autoclave, un tubo agitador o cualquier otro recipiente a presión bien conocido en la técnica. Un tubo agitador se usa para realizar la reacción en ciertas realizaciones.

Una reacción en la presente memoria puede calentarse opcionalmente después de la etapa de poner en contacto poli-alfa-1,3-glucano con el agente de eterificación en condiciones alcalinas. Las temperaturas de reacción y tiempo de aplicación de dichas temperaturas puede variarse dentro de amplios límites. Por ejemplo, una reacción puede opcionalmente mantenerse a temperatura ambiente durante hasta 14 días. De forma alternativa, una reacción puede calentarse, con o sin reflujo, entre aproximadamente 25°C a aproximadamente 200°C (o cualquier número entero entre 25 y 200°C). El tiempo de reacción puede variarse de forma proporcional: más tiempo a una baja temperatura y menos tiempo a una alta temperatura.

Opcionalmente, una reacción en la presente memoria puede mantenerse bajo un gas inerte, con o sin calentamiento. Como se usa en la presente memoria, el término "gas inerte" se refiere a un gas que no experimenta reacciones químicas bajo un conjunto de condiciones dadas, tales como las descritas para preparar una reacción en la presente memoria.

Todos los componentes de las reacciones descritas en la presente memoria pueden mezclarse al mismo tiempo y llevarse a la temperatura de reacción deseada, tras lo cual la temperatura se mantiene con o sin agitación hasta que se forma el compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) deseado. De forma alternativa, los componentes mezclados pueden dejarse a temperatura ambiente como se describe anteriormente.

Después de la eterificación, el pH de una reacción puede neutralizarse. La neutralización de una reacción puede realizarse usando uno o más ácidos. El término "pH neutro" como se usa en la presente memoria, se refiere a un pH que sustancialmente no es ni ácido ni básico (p.ej., un pH de aproximadamente 6-8, o aproximadamente 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 o 8,0). Varios ácidos que pueden usarse para este propósito incluyen, aunque no están limitados a, ácido sulfúrico, acético, clorhídrico, nítrico, cualquier ácido mineral (inorgánico), cualquier ácido orgánico, o cualquier combinación de estos ácidos.

Un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) producido en una reacción en la presente memoria puede lavarse opcionalmente una o más veces con un líquido que no disuelve fácilmente el compuesto. Por ejemplo, el poli(éter de alfa-1,3-glucano) puede lavarse con agua, alcohol, acetona, compuestos aromáticos, o cualquier combinación de estos, dependiendo de la solubilidad del compuesto de éter en ellos (donde la falta de solubilidad es deseable para el lavado). En general, un disolvente que comprende un disolvente orgánico tal como alcohol se prefiere para lavar un poli(éter de alfa-1,3-glucano). Un producto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) puede lavarse una o más veces con una disolución acuosa que contiene metanol o etanol, por ejemplo. Por ejemplo, puede usarse etanol al 70-95% en peso para lavar el producto. Un producto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) puede lavarse con una disolución de metanol:acetona (p.ej., 60:40) en otra realización. Puede usarse agua caliente (aproximadamente 95-100°C) en ciertas realizaciones, tal como para lavar alquil-hidroxiálquil poli(éteres de alfa-1,3-glucano) (p.ej., etil-hidroxietyl poli-alfa-1,3-glucano).

Un poli(éter de alfa-1,3-glucano) producido en la reacción descrita puede aislarse. Esta etapa puede realizarse antes o después de las etapas de neutralización y/o lavado usando un embudo, centrifuga, filtro de presión, o cualquier otro método o equipo conocido en la técnica que permita la eliminación de líquidos a partir de sólidos. Por ejemplo, un embudo Buchner puede usarse para aislar un producto de poli(éter de alfa-1,3-glucano). Un producto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) aislado puede secarse usando cualquier método conocido en la técnica, tal como secado al vacío, secado al aire o secado por congelación.

Cualquiera de las reacciones de eterificación anteriores puede repetirse usando un producto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) como el material de partida para la modificación adicional. Este enfoque puede ser adecuado para aumentar el DoS de un grupo orgánico, y/o añadir uno o más grupos orgánicos diferentes al producto de éter.

La estructura, peso molecular y grado de sustitución de un producto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) pueden confirmarse usando varios análisis fisicoquímicos conocidos en la técnica tal como espectroscopia RMN y cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).

El porcentaje de uniones glucosídicas entre las unidades monoméricas de glucosa de poli-alfa-1,3-glucano usado para preparar compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria que son alfa-1,3 es al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% (o cualquier valor entero entre 50% y 100%). En dichas realizaciones, por consiguiente, el poli-alfa-1,3-glucano tiene menos de aproximadamente 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0% (o cualquier valor entero entre 0% y 50%) de uniones glucosídicas que no son alfa-1,3.

El poli-alfa-1,3-glucano usado para preparar compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria es preferiblemente lineal/no ramificado. En ciertas realizaciones, el poli-alfa-1,3-glucano no tiene puntos de ramificación o menos de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de puntos de ramificación como un porcentaje de las uniones glucosídicas en el polímero. Ejemplos de puntos de ramificación incluyen puntos de ramificación alfa-1,6.

El M_n o M_w del poli-alfa-1,3-glucano usado para preparar compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria puede ser al menos aproximadamente 500 a aproximadamente 300000. Aún de forma alternativa, M_n o M_w

puede ser al menos aproximadamente 10000, 25000, 50000, 75000, 100000, 125000, 150000, 175000, 200000, 225000, 250000, 275000 o 300000 (o cualquier número entero entre 10000 y 300000), por ejemplo.

5 Como se describe anteriormente, el poli-alfa-1,3-glucano usado para preparar compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano) en la presente memoria pueden producirse de forma enzimática a partir de sacarosa usando una o más enzimas glucosiltransferasa (gtf). El producto de poli-alfa-1,3-glucano de esta reacción enzimática puede purificarse antes de usarlo para preparar un éter usando el proceso descrito. De forma alternativa, un producto de poli-alfa-1,3-glucano de una reacción gtf puede usarse con poco o ningún procesado para preparar compuestos de poli(éter de alfa-1,3-glucano).

10 Una lechada de poli-alfa-1,3-glucano puede usarse directamente en cualquiera de los procesos anteriores para producir un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) descrito en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, una "lechada de poli-alfa-1,3-glucano" se refiere a una mezcla que comprende los componentes de una reacción enzimática gtf. Una reacción enzimática gtf puede incluir, además del poli-alfa-1,3-glucano en sí mismo, varios componentes tales como sacarosa, una o más enzimas gtf, glucosa, fructosa, leucrosa, tampón, FermaSure®, oligosacáridos solubles, cebadores de oligosacárido, componentes de extracto de enzima bacteriana, boratos, hidróxido sódico, ácido clorhídrico, lisato celular, proteínas y/o ácidos nucleicos. Mínimamente, los componentes de una reacción enzimática gtf pueden incluir, además del poli-alfa-1,3-glucano en sí mismo, sacarosa, una o más enzimas gtf, glucosa y fructosa, por ejemplo. En otro ejemplo, los componentes de una reacción enzimática gtf pueden incluir, además del poli-alfa-1,3-glucano en sí mismo, sacarosa, una o más enzimas gtf, glucosa, fructosa, leucrosa y oligosacáridos solubles (y opcionalmente componentes de extracto enzimático bacteriano). Sería evidente que el poli-alfa-1,3-glucano, cuando está en una lechada como se describe en la presente memoria, no se ha purificado o lavado. También sería evidente que una lechada representa una reacción enzimática gtf que está completa o para la que se ha producido una cantidad observable de poli-alfa-1,3-glucano, que forma un sólido dado que es insoluble en el medio de reacción acuoso (tiene un pH de 5-7, por ejemplo). Puede prepararse una lechada de poli-alfa-1,3-glucano poniendo en marcha una reacción gtf como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 7.000.000 o Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. núms. 2013/0244288 y 2013/0244287, por ejemplo. Una lechada de poli-alfa-1,3-glucano puede introducirse, por ejemplo, en una reacción para producir un carboxialquil poli-alfa-1,3-glucano tal como carboximetil poli-alfa-1,3-glucano.

De forma alternativa, una torta húmeda de poli-alfa-1,3-glucano puede usarse directamente en cualquiera de los procesos anteriores para producir un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) descrito en la presente memoria. Una "torta húmeda de poli-alfa-1,3-glucano" como se usa en la presente memoria se refiere a poli-alfa-1,3-glucano que se ha separado (p.ej., filtrado) de una lechada y se ha lavado con agua o una disolución acuosa. Una torta húmeda puede lavarse al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo. El poli-alfa-1,3-glucano no se seca cuando se prepara una torta húmeda. Una torta húmeda se denomina como "húmeda" dada la retención de agua por el poli-alfa-1,3-glucano lavado.

35 Una torta húmeda de poli-alfa-1,3-glucano puede prepararse usando cualquier dispositivo conocido en la técnica para separar sólidos de líquidos, tal como un filtro o centrífuga. Por ejemplo, los sólidos de poli-alfa-1,3-glucano en una lechada pueden recogerse en un embudo Buchner usando una criba de malla sobre papel de filtro. La torta húmeda filtrada puede suspenderse de nuevo en agua (p.ej., agua desionizada) y filtrarse una o más veces para quitar los componentes solubles de la lechada tal como sacarosa, fructosa y leucrosa. Como otro ejemplo para preparar una torta húmeda, los sólidos de poli-alfa-1,3-glucano de una lechada pueden recogerse como un granulado por medio de centrifugado, suspenderse de nuevo en agua (p.ej., agua desionizada), y granularse de nuevo y suspenderse de nuevo una o más veces adicionales. Una torta húmeda de poli-alfa-1,3-glucano puede introducirse en una reacción para producir cualquier compuesto de éter en la presente memoria, tal como carboxialquil poli-alfa-1,3-glucano (p.ej., carboximetil poli-alfa-1,3-glucano).

45 Ejemplos

La invención descrita se define adicionalmente en los siguientes ejemplos. Debería entenderse que estos ejemplos, aunque indican ciertos aspectos preferidos de la invención, se dan solo por medio de ilustración. A partir de la discusión anterior y estos ejemplos, un experto en la técnica puede determinar las características esenciales de esta invención, y sin separarse del alcance de la misma, puede hacer diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

Materiales

La acetona, hidróxido sódico, ácido acético e isopropanol fueron de EMD Chemicals (Billerica, MA). El cloruro de metilo, ácido acético, tolueno, sulfato de dimetilo, etanol y óxido de propileno fueron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El metanol y 2-propanol fueron de BDH Chemicals (Poole Dorset, RU).

55 Preparación de poli-alfa-1,3-glucano

El poli-alfa-1,3-glucano se preparó usando una preparación de enzima gtfJ como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2013/0244288.

Método de ^1H Resonancia magnética nuclear (RMN) para determinar la sustitución molar de derivados de poli(éter de alfa-1,3-glucano)

5 Aproximadamente 30 mg del derivado de poli(éter de alfa-1,3-glucano) se pesó en un vial en una balanza analítica. El vial se quitó de la balanza y se añadió 1,0 mL de óxido de deuterio al vial. Se añadió una barra de agitación magnética al vial y la mezcla se agitó hasta suspender el sólido. Después se añadió ácido sulfúrico deuterado (50% en v/v en D_2O), 1,0 mL, al vial y la mezcla se calentó a 90°C durante 1 hora para despolimerizar y solubilizar el polímero. La disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente y después una parte de 0,8 mL de la disolución se transfirió en un tubo de 5 mm de RMN usando una pipeta de vidrio. Se obtuvo un espectro cuantitativo de ^1H RMN usando un espectrómetro de RMN Agilent VNMRs de 400 MHz equipado con una sonda Autoconmutable Quad de 5 mm. El espectro se obtuvo a una frecuencia espectral de 399,945 MHz usando una ventana espectral de 6410,3 Hz, un tiempo de adquisición de 3,744 segundos, una demora entre pulsos de 10 segundos y 64 pulsos. Los datos del dominio de tiempo se transformaron usando multiplicación exponencial de 0,50 Hz.

15 Dos regiones del espectro resultante se integraron para análisis de RMN de hidroxipropil poli-alfa-1,3-glucano: una integral de 1,1 ppm a 1,4 ppm, representativa de los tres protones de metilo de todos los grupos isopropilo presentes; y una integral de 4,7 ppm a 5,6 ppm, representativa de los protones anoméricos de los anillos de glucosa. La integral de la región de isopropilmetilo se dividió por 3 para obtener una medida de los grupos $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ que estaban presentes. La sustitución molar por los grupos $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ se calculó después dividiendo la medida de los grupos $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ por la medida de todos los anillos de glucosa presentes (el valor integral de los protones anoméricos).

20 Dos regiones del espectro resultante se integraron para análisis de RMN de metil poli-alfa-1,3-glucano: una integral de 3,0 ppm a 4,2 ppm fue representativa de los seis protones de glucano más los protones de OCH_3 , y una integral de 4,6 ppm a 5,6 ppm fue representativa de los protones anoméricos de los anillos de glucosa. La integral de esta última región se multiplicó por seis para obtener la integral de los otros protones de glucano. La integral calculada para los seis protones de glucano no anoméricos se restó de la integral de los 3,0 ppm a 4,2 ppm para obtener la contribución integral de los protones OCH_3 . Este valor de integral se dividió por 3,0 para obtener una medida de los grupos OCH_3 que están presentes. El grado de metilación se calculó entonces dividiendo la medida de los grupos OCH_3 por la medida de todos los anillos de glucosa presentes (el valor integral de los protones anoméricos).

30 Respecto al análisis de RMN de carboximetil poli-alfa-1,3-glucano, los desplazamientos químicos de las líneas en el espectro se referenciaron a la señal para los protones alfa anoméricos sin sustitución en el C_2OH . Esta señal sería el tercer grupo de picos desde el borde más a la izquierda del espectro. La señal más a la izquierda en este grupo de picos se ajustó a 5,222 ppm. Cinco regiones del espectro referenciado se integraron: una integral de 5,44 ppm a 4,60 ppm representa todos los protones anoméricos; las integrales de 4,46 ppm a 4,41 ppm y de 4,36 ppm a 4,32 ppm fueron del carboximetilo CH_2 en la posición C_2 adyacente a C_1HOH o bien alfa o beta; la integral de 4,41 ppm a 4,36 ppm es del carboximetilo CH_2 en la posición C_4 ; y la integral de 4,24 ppm a 4,17 ppm fue del carboximetilo CH_2 en la posición C_6 . El grado de carboximetilación en las posiciones 2, 4 y 6 se calculó entonces dividiendo las integrales para los grupos OCH_2COOH por dos y después dividiendo esos resultados mediante la integración para todos los protones anoméricos. Un grado total de sustitución se obtuvo sumando los tres grados individuales de sustitución.

Determinación del grado de polimerización

40 El grado de polimerización (DP) se determinó por cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Para el análisis SEC, se disolvió derivado de poli(éter de alfa-1,3-glucano) seco en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (0,02-0,2 mg/mL). El sistema cromatográfico usado fue un cromatógrafo líquido Alliance™ 2695 de Waters Corporation (Milford, MA) acoplado con tres detectores en línea: un refractómetro diferencial 410 de Waters, un fotómetro de dispersión de luz multi-ángulo Heleos™ 8+ de Wyatt Technologies (Santa Bárbara, CA), y un viscosímetro capilar diferencial ViscoStar™ de Wyatt Technologies. Las columnas usadas para SEC fueron dos columnas poliméricas TSK GMPW_{XL} g3K y g4K G3000PW y G4000PW de Tosoh Haas Bioscience para polímeros acuosos. La fase móvil fue PBS. Las condiciones cromatográficas usadas fueron 30°C en los compartimientos de la columna y el detector, 30°C en los compartimientos de la muestra y el inyector, un caudal de 0,5 mL/min, y volumen de inyección de 100 μL . Los paquetes de software usados para la reducción de datos fueron Astra versión 6 de Wyatt (método de detección triple con calibrado de columna).

Ejemplo 1

50 Preparación de etil-hidroxietil poli-alfa-1,3-glucano

Este ejemplo describe la producción del derivado de éter de glucano, etil-hidroxietil poli-alfa-1,3-glucano.

55 Se añade poli-alfa-1,3-glucano a un tubo agitador, después de lo cual se añade hidróxido sódico (disolución al 1-70%). Después, se añade cloruro de etilo seguido por una mezcla de óxido de etileno/cloruro de etilo para proporcionar una reacción. La reacción se calienta lentamente a $25\text{-}200^\circ\text{C}$ y se deja a esa temperatura durante 1-48 horas antes de neutralizarse con ácido acético. El sólido así formado se recoge por filtración al vacío y se lava con agua caliente, se seca al vacío a $20\text{-}70^\circ\text{C}$, y se analiza por RMN y SEC para determinar el peso molecular y DoS del etil-hidroxietil poli-alfa-1,3-glucano.

Por consiguiente, el derivado de éter de glucano, etil-hidroxietyl poli-alfa-1,3-glucano, se prepara y se aísla.

Ejemplo 2

Preparación de hidroxialquil-metil poli-alfa-1,3-glucano

Este ejemplo describe la producción de derivado de éter de glucano, hidroxialquil-metil poli-alfa-1,3-glucano.

- 5 Se añade poli-alfa-1,3-glucano a un recipiente, después de lo cual se añade hidróxido sódico (disolución al 5-70%). Este preparado se agita durante 0,5-8 horas. Después, se añade cloruro de metilo al recipiente para proporcionar una reacción, que se calienta después a 30-100°C durante hasta 14 días. Un óxido de alquileo (p.ej., óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de butileno, etc.) se añade después a la reacción mientras se controla la temperatura. La reacción se calienta a 25-100°C durante hasta 14 días antes de neutralizarse con ácido. El producto sólido así formado se filtra, se lava y se seca.

De este modo, el derivado de éter de glucano, hidroxialquil-metil poli-alfa-1,3-glucano, se prepara y se aísla. Dependiendo del óxido de alquileo usado después de la etapa de metilación, los ejemplos de este derivado incluyen hidroxietil-metil poli-alfa-1,3-glucano, hidroxipropil-metil poli-alfa-1,3-glucano e hidroxibutil-metil-poli-alfa-1,3-glucano.

Ejemplo 3

- 15 Preparación de carboximetil-hidroxietyl poli-alfa-1,3-glucano

Este ejemplo describe la producción del derivado de éter de glucano, carboximetil-hidroxietyl poli-alfa-1,3-glucano.

- 20 Se añade poli-alfa-1,3-glucano a una alícuota de una sustancia tal como isopropanol o tolueno en un tubo agitador de 400 mL de capacidad, después de lo cual se añade hidróxido sódico (disolución al 1-70%). Este preparado se agita durante hasta 48 horas. Después, se añade ácido monocloroacético para proporcionar una reacción, que se calienta entonces a 25-100°C durante hasta 14 días. Se añade entonces óxido de etileno a la reacción, que se calienta después a 25-100°C durante hasta 14 días antes de neutralizarse con ácido (p.ej., acético, sulfúrico, nítrico, clorhídrico, etc.). El producto sólido así formado se recoge por filtración al vacío, se lava y se seca.

De este modo, el derivado de éter de glucano, carboximetil-hidroxietyl poli-alfa-1,3-glucano, se prepara y se aísla.

Ejemplo 4

- 25 Preparación de carboximetil-hidroxietyl poli-alfa-1,3-glucano sódico

Este ejemplo describe la producción del derivado de éter de glucano, carboximetil-hidroxietyl poli-alfa-1,3-glucano sódico.

- 30 Se añade poli-alfa-1,3-glucano a una alícuota de un alcohol tal como isopropanol en un tubo agitador de 400 mL de capacidad, después de lo cual se añade hidróxido sódico (disolución al 1-70%). El preparado se agita durante hasta 48 horas. Después, se añade monocloroacetato sódico para proporcionar una reacción, que se calienta entonces a 25-100°C durante hasta 14 días. El óxido de etileno se añade entonces a la reacción, que se calienta después a 25-100°C durante hasta 14 días antes de neutralizarse con ácido (p.ej., acético, sulfúrico, nítrico, clorhídrico, etc.). El producto sólido así formado se recoge por filtración al vacío, se lava y se seca.

- 35 De este modo, el derivado de éter de glucano, carboximetil-hidroxietyl poli-alfa-1,3-glucano sódico, se prepara y se aísla.

Ejemplo 5

Preparación de carboximetil-hidroxipropil poli-alfa-1,3-glucano

Este ejemplo describe la producción del derivado de éter de glucano, carboximetil-hidroxipropil poli-alfa-1,3-glucano.

- 40 Se añade poli-alfa-1,3-glucano a una alícuota de una sustancia tal como isopropanol o tolueno en un tubo agitador de 400 mL de capacidad, después de lo cual se añade hidróxido sódico (disolución al 1-70%). Este preparado se agita durante hasta 48 horas. Después, se añade ácido monocloroacético para proporcionar una reacción que se calienta entonces a 25-100°C durante hasta 14 días. Se añade entonces óxido de propileno a la reacción, que se calienta después a 25-100°C durante hasta 14 días antes de neutralizarse con ácido (p.ej., acético, sulfúrico, nítrico, clorhídrico, etc.). El producto sólido así formado se recoge por filtración al vacío, se lava y se seca.

- 45 De este modo, el derivado de éter de glucano, carboximetil-hidroxipropil poli-alfa-1,3-glucano, se prepara y aísla.

Ejemplo 6

Preparación de carboximetil-hidroxipropil poli-alfa-1,3-glucano sódico

ES 2 740 961 T3

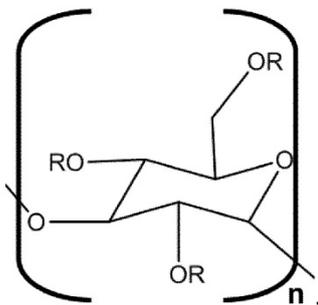
Este ejemplo describe la producción del derivado de éter de glucano, carboximetil-hidroxiopropil poli-alfa-1,3-glucano sódico.

5 Se añade poli-alfa-1,3-glucano a una alícuota de una sustancia tal como isopropanol o tolueno en un tubo agitador de 400 mL de capacidad, después de lo cual se añade hidróxido sódico (disolución al 1-70%). Este preparado se agita durante hasta 48 horas. Después, se añade monocloroacetato sódico para proporcionar una reacción, que se calienta entonces a 25-100°C durante hasta 14 días. Se añade entonces óxido de propileno a la reacción, que se calienta después a 25-100°C durante hasta 14 días antes de neutralizarse con ácido (p.ej., acético, sulfúrico, nítrico, clorhídrico, etc.). El producto sólido así formado se recoge por filtración al vacío, se lava y se seca.

10 De esta forma, el derivado de éter de glucano, carboximetil-hidroxiopropil poli-alfa-1,3-glucano sódico, se prepara y se aísla.

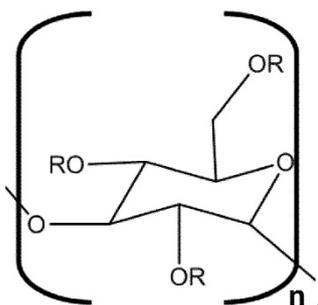
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) representada por la estructura:



en donde

- 5 (i) n es 10 a 4000,
- (ii) cada R es independientemente un H o grupo orgánico, y
- (iii) el compuesto tiene un grado de sustitución de 0,05 a 3,0, y el compuesto contiene dos o más tipos de grupo orgánico.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, en donde dichos dos o más tipos de grupo orgánico se seleccionan de carboxialquilo, hidroxialquilo o alquilo.
3. La composición según la reivindicación 2, en donde dichos dos o más tipos de grupo orgánico se seleccionan de carboximetilo, hidroxipropilo, dihidroxipropilo, hidroxietilo, metilo o etilo.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde n es al menos 600.
5. La composición según la reivindicación 4, en donde n es al menos 800.
- 15 6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el grado de sustitución es de 0,2 a 2,0.
7. Un método de producción de un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano), comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto poli-alfa-1,3-glucano en una reacción bajo condiciones alcalinas con al menos un agente de eterificación que comprende un grupo orgánico, en donde el grupo orgánico se eterifica al poli-alfa-1,3-glucano produciendo de este modo un compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) representado por la estructura:



en donde

- (i) n es 10 a 4000,
- (ii) cada R es independientemente un H o el grupo orgánico, y
- (iii) el compuesto tiene un grado de sustitución de 0,05 a 3,0, y el compuesto contiene dos o más tipos de grupo orgánico; y
- 25 (b) opcionalmente, aislar el compuesto de poli(éter de alfa-1,3-glucano) producido en la etapa (a).
8. El método según la reivindicación 7, en donde dichos dos o más tipos de grupo orgánico se seleccionan de carboxialquilo, hidroxialquilo o alquilo.

9. El método según la reivindicación 8, en donde dichos dos o más tipos de grupo orgánico se seleccionan de carboximetilo, hidroxipropilo, dihidroxipropilo, hidroxietilo, metilo o etilo.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde n es al menos 600.

11. El método según la reivindicación 10, en donde n es al menos 800.