

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 837**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 31/726 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2017 PCT/CZ2017/050026**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2018 WO18001394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2017 E 17746370 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3475310**

54 Título: **Derivados insaturados de polisacáridos, método de preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

27.06.2016 CZ 20160375

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

29.10.2020

73 Titular/es:

**CONTIPRO A.S. (100.0%)
Dolní Dobrouc 401
561 02 Dolní Dobrouc, CZ**

72 Inventor/es:

**BUFFA, RADOVAN;
BOBULA, TOMAS;
SEDOVA, PETRA;
BASARABOVA, IVANA;
PROHAZKOVA, PAVLINA;
VAGNEROVA, HANA;
DOLECKOVA, IVA;
MORAVCIKOVA, SONA y
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 790 837 T3

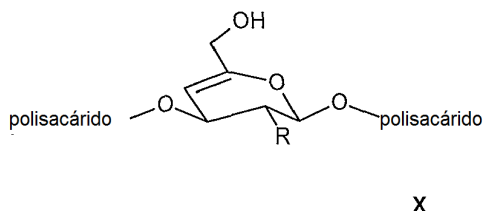
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Derivados insaturados de polisacáridos, método de preparación y uso de los mismos

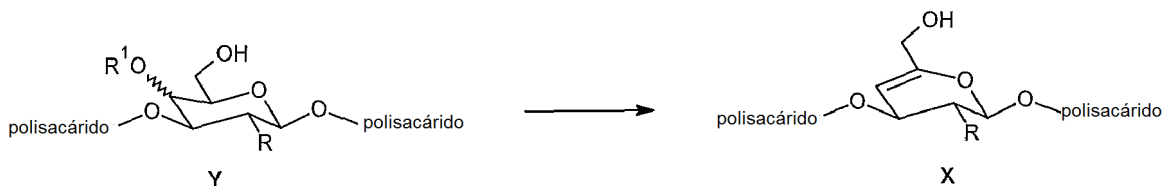
Campo de la invención

5 La invención se refiere a derivados de polisacáridos que comprenden, en su estructura, un heterociclo que tiene un doble enlace en las posiciones 4 y 5 según la fórmula estructural **X**,



donde R representa -NH-CO-CH₃ o -OH.

10 Además, la invención se refiere a la preparación de los derivados de la fórmula **X** a partir de un polisacárido de partida que comprende el fragmento estructural **Y**, donde la modificación en sí misma puede simplificarse en el siguiente esquema:



15 donde R representa -NH-CO-CH₃ o -OH, y R¹ representa -SO₂-ONa, -SO₂-OH o -H, mientras que la configuración absoluta en el carbono 4 puede ser R o S.

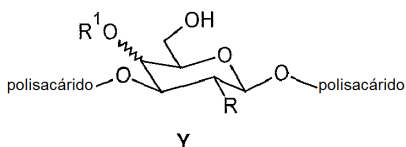
Además, la invención se refiere al uso de estos derivados insaturados que, en contraste con los polisacáridos nativos, muestran propiedades antioxidantes mejoradas, y algunos de ellos inhiben selectivamente la proliferación de células cancerosas.

Antecedentes de la invención

20 **Polisacáridos de fórmula general. Y**

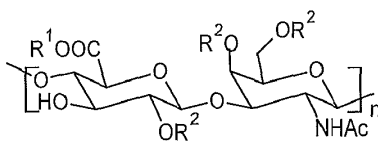
Los polisacáridos tienen una amplia gama de funciones en los organismos, como la construcción, el almacenamiento o la función reguladora. Los polisacáridos de la fórmula general **Y** También pertenecen a los polímeros que ocurren naturalmente en los organismos.

25



donde R representa CH₃-CO-NH- u -OH, y R¹ representa -SO₂-ONa, -SO₂-OH o -H. Esto comprende, por ejemplo, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, carragenano, sulfato de queratán o ácido hialurónico.

30 Sulfato de condroitina es un glicosaminoglicano lineal, sulfatado y cargado negativamente compuesto de unidades monoméricas repetitivas de N-acetil-D-galactosamina y ácido D-glucurónico, unidos entre sí por enlaces O-glucosídicos β(1→3) y β(1→4) (véase más abajo la fórmula estructural del sulfato de condroitina),



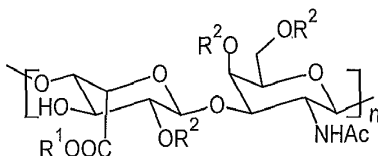
donde

R¹ es -H o -Na,

R² es -H, -SO₂-ONa o -SO₂-OH.

- 5 Sulfato de condroitina se deriva de los tejidos conectivos animales donde se une a las proteínas y, por lo tanto, forma parte de los proteoglicanos. La sulfatación de la condroitina se realiza por medio de sulfotransferasas en varias posiciones y por varios tipos. El patrón único de sulfatación en posiciones particulares en la cadena polimérica codifica la actividad biológica específica del sulfato de condroitina. El sulfato de condroitina es un importante bloque estructural del cartílago en las articulaciones, proporcionándoles resistencia a la compresión y renovando el equilibrio de la composición del fluido lubricante de las articulaciones (Baeurle S. A. a kol. Polímero 50, 1805, 2009).

Sulfato de dermatán es un glicosaminoglicano lineal, sulfatado y cargado negativamente compuesto de unidades monoméricas repetitivas de *N*-acetil-D-galactosamina y ácido L-idurónico, unidos entre sí por enlaces *O*-glucosídicos β(1→3) y β(1→4) (véase más abajo la fórmula estructural del dermatán sulfato),



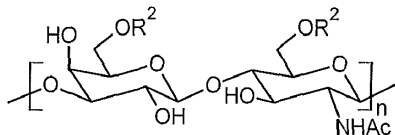
15 donde

R¹ es -H o -Na,

R² es -H, -SO₂-OH o -SO₂-ONa.

- 20 El sulfato de dermatán difiere del sulfato de condroitina por la presencia de ácido L-idurónico, que es el epímero C-5 del ácido D-glucurónico. La configuración inversa del ácido idurónico confiere una mayor flexibilidad a las cadenas de sulfato de dermatán y garantiza su interacción específica de glicosaminoglicanos y proteínas en el área circundante. Estas interacciones contribuyen a la regulación de varios procesos celulares, como la migración, la proliferación, la diferenciación o la angiogénesis. La conversión de sulfato de condroitina en sulfato de dermatán se garantiza mediante tres enzimas, denominadas, dermatán sulfato epimerasa 1 (DS-epi1), dermatán sulfato epimerasa 2 (DS-epi2) y el dermatán 4-*O*-sulfotransferasa (D4ST1) (Thelin M. y col. FEBS Journal 280, 2431, 2013).

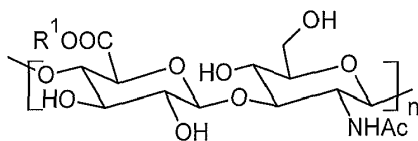
- 25 Sulfato de Keratan pertenece al grupo de polisacáridos sulfatados lineales que comprenden D-galactosa, *N*-acetilglucosamina y galactosa-6-sulfato unidos con enlaces β (1 → 3) y β (1 → 4), que tienen la estructura y enlaces similares al sulfato de condroitina. Se puede encontrar en la córnea, los cartílagos, los huesos y el tejido conectivo (véase más abajo la fórmula estructural del sulfato de queratán),



30 donde R² es -H, -SO₂-OH o -SO₂-ONa.

- 35 Los carragenanos pertenecen al grupo de los polisacáridos sulfatados lineales que se obtienen mediante la extracción de algas del mar rojo. La galactosa y su derivado 3,6-anhidro son sus unidades estructurales básicas, unidas entre sí por enlaces *O*-glucosídicos β(1→3) y β(1→4). Existen tres grupos principales de carragenanos que difieren en el grado de sulfatación y solubilidad en agua. Kappa-carragenano tiene un grupo sulfato en dímero y forma geles rígidos en ambiente acuoso. El Iota-carragenano contiene dos sulfatos y forma geles blandos, mientras que el lambda-carragenano que tiene tres sulfatos no presenta propiedades gelificantes.

Ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfatado compuesto por dos unidades repetitivas de ácido D-glucurónico y *N*-acetil-D-glucosamina.



donde

R¹ es H o Na

5 El peso molecular del ácido hialurónico nativo está en el intervalo de $5 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. Este polisacárido muy hidrofílico es parte de los tejidos conectivos, la piel, el líquido sinovial de las articulaciones; desempeña un papel importante en muchos procesos biológicos, como la organización de los proteoglicanos, la hidratación y diferenciación celular. Como este polímero se produce naturalmente en el cuerpo y, por lo tanto, es biodegradable, es útil como un sustrato en el campo de la ingeniería de tejidos o como portador de sustancias biológicamente activas.

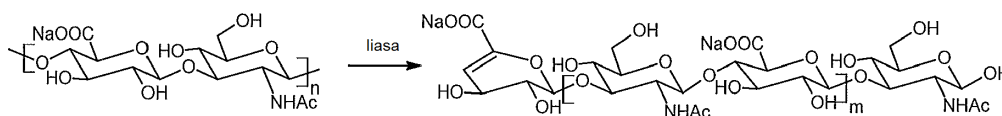
Polisacáridos que contienen enlaces múltiples

10 Los polisacáridos que tienen un enlace múltiple $-C=C-$ que forma parte del ciclo de sacárido y no está situado al final de la cadena, son muy raros. Como ejemplo de polisacáridos comunes, se describen derivados de celulosa 5,6-insaturados, conocidos como celulosos (Vigo T. L. et al. *Polymers for Advanced Technologies*, 10, 6, 311-320, 1999) o sus análogos 2,3-insaturados. El método de la preparación de derivados 5,6-insaturados se basa en la reacción de eliminación del grupo saliente en la posición 6 y el hidrógeno en la posición 5 bajo condiciones básicas para producir enol éter (el enlace múltiple $-C=C-$ se conjuga con oxígeno heterocíclico). La preparación de derivados 2,3-insaturados de celulosa, amilosa o xilano (D. Horton y col. *Carbohydrate Research*, 40, 2, 345-352, 1975) requiere, además de la presencia de grupos salientes, un agente reductor, normalmente zinc, para producir un alqueno estándar (sin la conjugación de enlaces múltiples y oxígeno).

Utilización de polisacáridos que contienen enlaces múltiples.

20 Las aplicaciones están dirigidas principalmente a la modificación del enlace múltiple $-C=C-$ que no es una parte directa del ciclo del sacárido. Estos métodos se basan en unir una nueva sustancia al esqueleto del polímero, donde la estructura se cambia de manera importante, es decir, se pierde el carácter nativo del polisacárido. En tales casos, el enlace múltiple se usa normalmente en la polimerización (Bellini D. WO96/37519, adición (Khetan S. et al. *Soft Matter*, 5, 1601-1606, 2009) o reacciones de cicloadición (Nimmo Ch. M. y col. *Biomacromolecules*, 12, 824-830, 2011; Bobula, T. y col. *Carbohydrate. Polymers*, 125, 153-160, 2015) Estos métodos pueden conducir a la reticulación efectiva de polisacáridos (Collins M. N. y col. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1262-1279, 2013; Hacker M. C. y col., *Inter. J. of Mol. Sc.*, 16, 27677-706, 2015), y la unión selectiva de sustancias activas al polímero (Mero A. y col. *Polymers*, 6, 346-369, 2014) El enlace múltiple del grupo metacrilato también se usa muy comúnmente para realizar una reacción de polimerización (Granstrom M. a kol. EP2899214).

30 Solo hay unos pocos métodos para introducir el enlace múltiple $-C=C-$ directamente en el ciclo de sacárido en una cadena de polímero. Uno de ellos es una escisión enzimática de polímeros por liasa, donde el doble enlace se forma en el extremo no reductor del polímero (Kelly S. J. a kol. *Glycobiology*, 11, 4, 294-304, 2001), que es, en este caso, ácido hialurónico (ver el esquema a continuación).



35 Significa que la aparición de esta modificación depende en gran medida del peso molecular; por ejemplo, para el peso molecular de $4 \cdot 10^4$ g.mol⁻¹ solo se modifica uno de los cien disacáridos, si el peso molecular es $4 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹, se modifica uno de los mil disacáridos. Por lo tanto, es obvio que, a excepción de los oligómeros de polisacáridos, este tipo de modificación es menor y en realidad no hay diferencia entre el polímero de alto peso molecular inicial y el resultante.

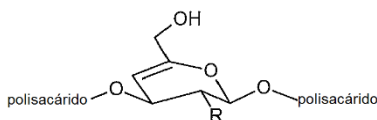
40 El segundo método permite incorporar el doble enlace en la estructura del polisacárido en las posiciones 4 y 5 a lo largo de toda la longitud de la cadena, por lo que los polímeros que tienen un peso molecular más alto pueden modificarse eficientemente (Buffa R. et al. WO2014/023272, Bobula T. y col. *Carbohydrate Polymers*, 136, 1002-1009, 2016) Sin embargo, en este método, se forma un enlace múltiple $-C=C-$, y este enlace se conjuga directamente con un grupo aldehído aceptor de electrones fuerte. Esta modificación cambia significativamente las propiedades químicas del polisacárido, porque permite la unión covalente de una amplia gama de nucleófilos, normalmente aminas. El hecho mencionado anteriormente también implica que el polímero modificado de esta manera tiene una característica

electrófila significativamente más alta y, por lo tanto, difiere químicamente del polímero nativo. También se puede considerar como un antioxidante menos activo en comparación con el polímero no modificado.

La solución descrita en esta invención puede eliminar estos inconvenientes; no hay un grupo electrófilo reactivo en el polímero modificado, en comparación con el polímero no modificado. Por el contrario, el doble enlace conjugado con oxígeno heterocíclico puede considerarse como un grupo que tiene propiedades nucleófilas (antioxidantes).

Sumario de la invención

El objeto de la invención son los derivados de polisacáridos que comprenden, en su estructura, el heterociclo que tiene el doble enlace en las posiciones 4 y 5 de acuerdo según estructural **X**,

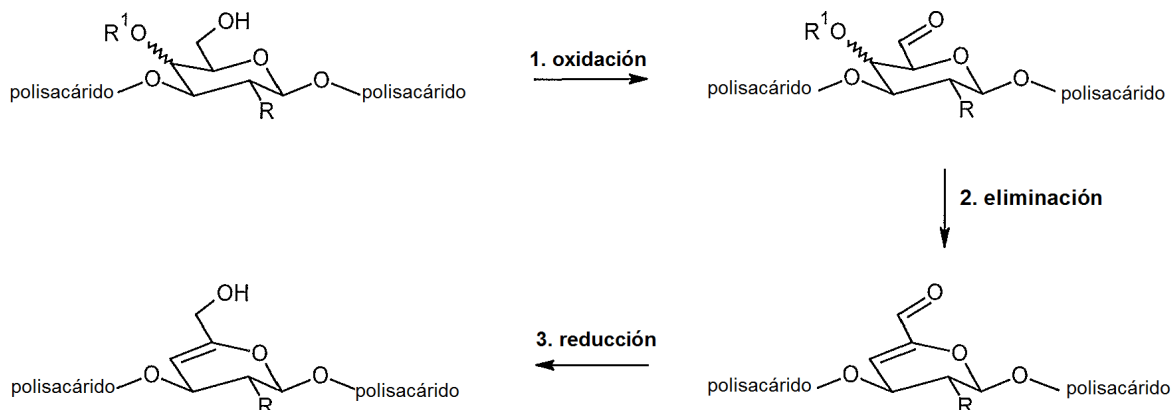


X

10 donde R es -NH-CO-CH₃ o -OH.

El peso molecular de los derivados está en el intervalo de 5.10³ a 5.10⁵ g.mol⁻¹, y los polisacáridos de partida para la preparación de los derivados según la invención se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende sulfato de condroitina, carragenano, sulfato de dermatán, ácido hialurónico o sulfato de queratán.

Además, la invención se refiere al método de preparación, basado en tres etapas (ver el esquema a continuación):



15 donde R es -NH-CO-CH₃ o -OH, y R¹ es -SO₂-ONa, -SO₂-OH o -H

1. Oxidación: introducción de un grupo aldehído en la posición 6 del ciclo de sacárido. Oxidación del grupo hidroxilo primario en la posición 6 a un aldehído. La reacción se puede realizar, por ejemplo, mediante un sistema de oxidación de TEMPO/NaClO del radical 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxilo en agua. Esta etapa se realiza preferiblemente en agua a la temperatura de 0 a 10 °C, con NaClO en una cantidad molar de 0,03 a 0,8 eq. y cantidad molar de TEMPO en el intervalo de 0,005 a 0,2 eq. con respecto a la unidad repetitiva del polisacárido. El polisacárido de partida puede tener un peso molecular en el intervalo de 5.10³ a 5.10⁵ g.mol⁻¹ y se usa preferiblemente una solución acuosa del 0,1 al 8% en peso de polisacárido. Finalmente, se puede añadir etanol, tiosulfato de sodio, etc. a la mezcla de reacción para finalizar la reacción y eliminar los residuos del agente sin reaccionar (hipoclorito). Alternativamente, la oxidación se puede realizar por medio del sistema 1,1,1-triacetoxi-1,1-dihidro-1,2-benziodoxol-3 (1H) -ona (DMP) a la temperatura de 10 °C a 50 °C en DMSO, donde la cantidad de DMP está en el intervalo de 0,05 a 2 eq. con respecto a la unidad repetitiva del polisacárido.

2. Eliminación

2a. si R¹ = -H, se realiza la eliminación de agua (deshidratación).

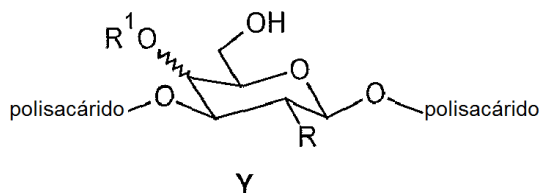
30 Se puede realizar preferiblemente en medios acuosos-orgánicos, donde el disolvente orgánico es miscible en agua y la relación en volumen de disolvente/agua está en el intervalo de 3/1 a 1/2. Preferiblemente, la base tal como piridina, trietilamina o N,N-diisopropiletilamina, o una base inorgánica, p. ej. Ca (OH)₂, se puede usar en esta etapa. La cantidad de la base en la reacción es de 0,01 a 20 eq., preferiblemente de 5 a 10 eq., en base a la unidad repetitiva del polisacárido. Como disolventes orgánicos, se pueden usar disolventes polares apróticos miscibles en agua, preferiblemente DMSO o sulfolano. La oxidación se realiza durante 0,1 a 12 horas, preferiblemente de 1 a 4 horas;

la segunda etapa de la reacción se realiza durante 12 a 150 horas, preferiblemente 20 a 40 horas, a la temperatura de 30 a 80 °C, preferiblemente 50 a 60 °C.

5 2b. si $R^1 = -SO_2-ONa$ o SO_2-OH , se realiza la eliminación de $NaO-SO_2-ONa$ o $HO-SO_2-ONa$ respectivamente. Si el grupo $-OR^1$ en la posición 4 en el ciclo está en la posición antiperiplanar con respecto al hidrógeno en la posición 5, la eliminación continúa espontáneamente sin la necesidad de añadir bases y sin la necesidad de aumentar la temperatura de reacción. La duración de la reacción de las etapas 1 + 2b es de 0,1 a 12 h, preferiblemente de 1 a 4 h. Si el grupo $-OR^1$ en la posición 4 del ciclo de sacárido no está en la posición antiperiplanar con respecto al hidrógeno en la posición 5, el método descrito en la parte 2a también se puede usar para una eliminación efectiva.

10 3. Reducción - el grupo aldehído se reduce selectivamente con borohidruros, preferiblemente con $NaBH_4$, para formar un alcohol primario $-CH_2-OH$ mientras se mantiene el enlace múltiple en la posición 4 y 5 del ciclo de sacárido. Aunque una persona experta en la técnica esperaría una reducción del enlace $-C=C-$ además de la reducción del grupo aldehído $-CHO$ (o diol geminal $-CH(OH)_2$), sorprendentemente, la reducción del doble enlace $-C=C-$ no ocurre en el método según la invención. La cantidad del agente reductor puede variar de 0,1 a 10 equivalentes, den base a la unidad repetitiva del polisacárido, preferiblemente de 0,3 a 2 equivalentes. La reacción se puede realizar en agua a la temperatura de 5 - 40 °C, pH 5 - 10, preferiblemente a la temperatura de 15 - 25 °C y pH 6 - 8 durante 1 - 15 24 h. La concentración de la solución de aldehído de partida es preferiblemente del 0,1 al 8% en peso.

Los hechos mencionados anteriormente implican que el método de preparación de derivados de polisacáridos según esta invención requiere que el polisacárido de partida incluya la estructura **Y**



20 que comprende ciclo de sacárido unido en (1 → 3), grupo $-CH_2-OH$ primario en la posición 6, y un grupo $-OH$, $-SO_2-OH$ o $-SO_2-ONa$ en la posición 4. El grupo en la posición 2 no es crucial para el desempeño exitoso de la modificación dada; para la mayoría de los polisacáridos R es $-OH$ o $NH-CO-CH_3$.

25 Además, la invención se refiere al uso de derivados de polisacáridos de fórmula general **X**. Como se mencionó anteriormente, la solución descrita en esta invención ofrece nuevos tipos de derivados de polisacáridos que tienen una nucleofilicidad mejorada (propiedades antioxidantes) y al mismo tiempo solo un cambio menor de la estructura primaria de polisacárido causada por la eliminación de hidrógeno de la posición 5 y los grupos $-OH$, $-O-SO_2-OH$ o $-O-SO_2-ONa$ desde la posición 4. Las propiedades antioxidantes de estos nuevos derivados se demostraron mediante determinación estándar con radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, donde se observaron que existen diferencias significativas entre los derivados insaturados de polisacárido preparados según la invención y análogos saturados (no modificados). Es por eso que los derivados según invención se pueden usar, por ejemplo, para la preparación de 30 materiales con un efecto antioxidante.

35 Además, se encontró que si el ácido hialurónico es el polisacárido, el derivado insaturado se puede usar para la preparación de un material con un efecto anticancerígeno. Las propiedades biológicas de los derivados preparados se ensayaron en varias líneas celulares de carcinoma, y en todos los casos se observó una viabilidad reducida, mientras que el crecimiento de fibroblastos estándar no se suprimió dentro del intervalo completo de las concentraciones ensayadas.

El término "polisacárido" se refiere a un polisacárido que contiene una unidad estructural **Y**, tal como p. ej. ácido hialurónico, carragenano, sulfato de dermatán, sulfato de queratán o sulfato de condroitina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que son seguras y eficaces para el uso *in vivo* y tener una actividad biológica deseada. Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden preferiblemente iones de metales alcalinos o iones de metales alcalinotérreos, más preferiblemente Na^+ , K^+ , Mg^+ o Li^+ .

La realización de la solución descrita en esta invención no es tecnológicamente complicada y no requiere el uso de productos químicos caros, disolventes o procedimientos de aislamiento.

45

Descripción detallada de los dibujos

Fig. 1 - Efecto de Δ HA preparado según el Ejemplo 25 sobre la viabilidad celular. El esquema muestra el desarrollo de la inhibición del crecimiento de las células cancerosas MDA-MB-231 - adenocarcinoma de mama, A-549 - adenocarcinoma de pulmón, HEP-G2 - carcinoma hepatocelular, en comparación con la inhibición de NHDF - fibroblastos dérmicos humanos primarios.

El procedimiento se describe en el Ejemplo 27.

Fig. 2 - propiedades antioxidantes de los materiales Δ HA y Δ CS en comparación con los polisacáridos no modificados HA, CS y con el estándar - Trolox - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

HA - ácido hialurónico

10 Δ HA - ácido hialurónico deshidratado en las posiciones 4 y 5 (Ejemplo 22)

CS - sulfato de condroitina

Δ CS - sulfato de condroitina deshidratado en las posiciones 4 y 5 (Ejemplo 2)

ensayado por medio de 2,2-difenil-1-picrylhidrazyl (DTTH) por el procedimiento descrito en el Ejemplo 23

Prueba estadística de significancia t - * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001

Realizaciones preferidas de la invención

15 DS = grado de sustitución = 100%* = (cantidad molar de la unidad de sacárido modificado) / (cantidad molar de la unidad de polisacárido repetitiva)

El término equivalente (eq.) como se usa en el presente documento se refiere a la unidad repetitiva de un polisacárido particular, si no se indica lo contrario. El porcentaje se especifica como porcentaje en peso si no se indica lo contrario.

20 El peso molecular de los polisacáridos de partida es el peso molecular promedio en peso determinado por el método SEC/MALLS.

Ejemplo 1**Oxidación y eliminación de sulfato de condroitina (CS) = Preparación de aldehído CS α,β -insaturado**

25 Se añadió gradualmente una solución de hipoclorito de sodio (0,8 eq., 11% de cloro activo) en una solución acuosa de CS al 2% (200 mg, Mw = 4.10⁴ g.mol⁻¹) se enfrió a 5 °C y contenía dodecahidrato de hidrógeno fosfato disódico (2,2 eq.), bromuro de sodio (0,8 eq.) y 4-AcNH-TEMPO (0,01 eq.). La mezcla se agitó durante 2 horas a la temperatura de 5 °C. Después se añadió etanol (10 eq.) a la reacción, y la reacción se agitó durante otra hora a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó mediante RMN.

DS = 23% (determinado por RMN)

Ejemplo 2**30 Reducción del aldehído α,β -insaturado de CS = Preparación de Δ CS**

Se preparó una solución de aldehído α,β -insaturado de CS al 2% p/v (200 mg, 0,5 mmol) en agua destilada, la solución se enfrió a 5 °C y después se añadieron 2 equivalentes de borohidruro de sodio. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a 5 °C. El producto se aisló por precipitación con isopropanol y se analizó mediante RMN.

DS = 25% (determinado por RMN), Mw = 2.10⁴ g.mol⁻¹ (determinado por SEC/MALLS)

35 Análisis espectral de Δ CS: RMN ¹H (500 MHz, D₂O, δ ppm): 2.02 y 2.04 (3H; Ac-NH-; bs); 4.03 (2H; H6; bs); 4.22 (1H; H2; bs); 4.26 (1H; H3; bs); 5.06 (1H; H1; bs); 5.18 (1H; H4; bs); RMN ¹H-¹H COSY (D₂O); picos cruzados; \ delta ppm: 4.22-5.06; 4.26-5.18; RMN ¹H-¹³C HSQC (D₂O); picos cruzados; \ delta ppm: 4.03-61.0; 4.22-50.5; 4.26-73.4; 5.06-98.3; 5.18-98.9; NMR DOSY (D₂O); log D ((2.02 y 2.04; Ac-NH-); (4.03; H6); (4.22; H2); (4.26; H3); (5.06; H4); (5.18; H1)) ~ -10.4 m²s⁻¹; log D (4.72; H₂O) ~ -8; 6 m²s⁻¹; IR (KBr; cm⁻¹): 1660 (v -C = C- st);

40 Ejemplo 3**Oxidación y eliminación de dermatán sulfato (DeS) = Preparación de aldehído DeS α,β -insaturado**

Se añadió gradualmente una solución acuosa de hipoclorito de sodio (0,8 eq., 11% de cloro activo) a una solución acuosa de DeS al 2% (200 mg, 0,42 mmol) enfriada a 5 °C y que contenía dodecahidrato de fosfato de hidrógeno disódico (2,2 eq.), bromuro de sodio (0,8 eq.) y 4-AcNH-TEMPO (0,01 eq.), la mezcla se agitó durante 2 horas a 5 °C.

Después se añadió etanol (10 eq.) a la reacción, y la reacción se agitó durante otra hora a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó mediante RMN.

DS = 20% (determinado por RMN)

Ejemplo 4

5 Reducción del aldehído α,β -insaturado de dermatán sulfato = Preparación de Δ DeS

Se preparó una solución de aldehído α,β -insaturado de DeS al 2% p/v (200 mg, 0,5 mmol) en agua destilada. La solución se enfrió a 5 °C y después se añadió borohidruro de sodio (2 equivalentes por disacárido de DeS). La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a 5 °C. El producto se aisló por precipitación con isopropanol y se analizó mediante RMN.

10 DS = 23% (determinado por RMN)

Análisis de espectros de Δ DeS: RMN ^1H (500 MHz, D_2O , δ ppm): 2.01 (3H, Ac-NH-, bs), 5.05 (1H, H1, bs), 5.17 (1H, H1, bs).

Ejemplo 5

Oxidación y eliminación de carragenano (KA) = Preparación de aldehído α,β -insaturado de KA

15 Se añadió gradualmente una solución acuosa de hipoclorito de sodio (0,8 eq., 11% de cloro activo) a una solución acuosa de KA al 1% (200 mg, 0,31 mmol) enfriada a 10 °C, que contenía dodecahidrato de fosfato de hidrógeno y sodio (2,2 eq.), bromuro de sodio (0,8 eq.) y 4-AcNH-TEMPO (0,01 eq.). La mezcla se agitó durante 2 horas a 10 °C. Después se añadió etanol (10 eq.) a la reacción, y la reacción se agitó durante otra hora a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó mediante RMN.

20 DS = 10% (determinado por RMN)

Ejemplo 6

Reducción de aldehído α,β -insaturado de carragenano = Preparación de Δ KA

25 Se preparó una solución de aldehído α,β -insaturado de KA al 2% p/v (200 mg, 0,5 mmol) en agua destilada. La solución se enfrió a 5 °C y después se añadió borohidruro de sodio (2 equivalentes por disacárido de KA). La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a 5 °C. El producto se aisló por precipitación con isopropanol y se analizó mediante RMN.

DS = 13% (determinado por RMN)

RMN ^1H (500 MHz, D_2O , δ ppm): 5.07 (1H, H1, bs), 5.18 (1H, H1, bs),

Ejemplo 7

30 Oxidación de queratán sulfato (KS) = Preparación de KS-aldehído

Se añadió gradualmente una solución acuosa de NaClO (0,3 eq.), bajo nitrógeno, en una solución acuosa de KS al 1% (1 g, $2 \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) que contiene NaCl al 1%, KBr al 1%, TEMPO (0,01 eq.) y NaHCO_3 (20 eq.). La mezcla se agitó durante 24h a 0 °C, luego se añadieron 0,1 g de tiosulfato de sodio y la mezcla se agitó durante 10 minutos más. La solución resultante se diluyó con agua destilada al 0,2% y se dializó contra la mezcla de 5 litros (NaCl al 0,1%, NaHCO_3 al 0,1%) 3 veces (una vez al día), y contra agua destilada, 5 litros 7 veces (2 veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

35 DS 3% (determinado por RMN)

Ejemplo 8

Eliminación de KS-aldehído = Preparación del aldehído α,β -insaturado de KS

40 Se añadieron 6,7 ml de DMSO y base de DIPEA (5 eq.) a una solución de KS-aldehído al 3% (0,1 g, grado de oxidación de DS = 3%, ejemplo 7) en agua. La mezcla se agitó durante 72 horas a la temperatura de 60 °C. Después, la solución resultante se precipitó mediante una mezcla de isopropanol/hexano y la parte sólida se secó al vacío.

DS 2% (determinado por RMN),

^1H RMN (D_2O) δ 9,22 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{O}$), 6.32 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{O}$)

Ejemplo 9**Reducción de aldehído α,β -insaturado de KS = Preparación de Δ KS**

5 Se añadió borohidruro de sodio (2 eq.) a una solución de aldehído α,β -insaturado de KS al 2% (200 mg, Ejemplo 8) en agua destilada. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a 5 °C, después se precipitó con isopropanol y se analizó por RMN.

DS = 2% (determinado por RMN)

^1H RMN (D_2O) 5.05 (1H, H1, bs), 5.17 (1H, H4, bs)

Ejemplo 10**Oxidación de ácido hialurónico (HA) = Preparación de HA-aldehído**

10 Se añadió gradualmente una solución acuosa de NaClO (0,5 eq.), bajo nitrógeno, en una solución acuosa de HA al 1% (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) que contiene NaCl al 1%, KBr al 1%, TEMPO (0,01 eq.) y NaHCO_3 (20 eq.). La mezcla se agitó durante 12h a 0 °C, después se añadieron 0,5 ml de etanol y la mezcla se agitó durante otra hora. La solución resultante se diluyó con agua destilada al 0,2% y se dializó contra la mezcla de 5 litros (NaCl al 0,1%, NaHCO_3 al 0,1%), 3 veces (una vez al día), y contra agua destilada, 5 litros 7 veces (2 veces al día). Después, la solución resultante se evaporó y analizó.

15 DS 10% (determinado por RMN)

Ejemplo 11**Oxidación de HA = Preparación de HA-aldehído**

20 Se añadió gradualmente una solución acuosa de NaClO (0,5 eq.), bajo nitrógeno, en una solución acuosa de HA al 1% (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) que contiene NaCl al 1%, KBr al 1%, N-acetilamino-TEMPO (0,01 eq.) y NaHCO_3 (20 eq.). La mezcla se agitó durante 12h a 10 °C, luego se añadieron 0,1 ml de etanol y la mezcla se agitó durante otra hora. La solución resultante se diluyó con agua destilada al 0,2% y se dializó contra la mezcla de 5 litros (NaCl al 0,1%, NaHCO_3 al 0,1%), 3 veces (una vez al día), y contra agua destilada, 5 litros 7 veces (2 veces al día). Después, la solución resultante se evaporó y analizó.

DS 9% (determinado por RMN)

Ejemplo 12**Oxidación de HA = Preparación de HA-aldehído**

30 Se añadió gradualmente una solución acuosa de NaClO (0,3 eq.), bajo nitrógeno, en una solución acuosa de HA al 1% (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) que contiene NaCl al 1%, KBr al 1%, TEMPO (0,2 eq.) y NaHCO_3 (20 eq.). La mezcla se agitó durante 48h a 5 °C, después se añadieron 0,1 ml de etanol y la mezcla se agitó durante otra hora. La solución resultante se diluyó con agua destilada al 0,2% y se dializó contra la mezcla de 5 litros (NaCl 0,1%, NaHCO_3 al 0,1%), 3 veces (una vez al día), y contra agua destilada, 5 litros 7 veces (2 veces al día). Después, la solución resultante se evaporó y analizó.

DS 5% (determinado por RMN)

Ejemplo 13**Oxidación de ácido hialurónico (HA) = Preparación de HA-aldehído**

40 Se añadió gradualmente una solución acuosa de NaClO (0,7 eq.), bajo nitrógeno, en una solución acuosa de HA al 1% (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) que contiene NaCl al 1%, KBr al 1%, TEMPO (0,01 eq.) y NaHCO_3 (20 eq.). La mezcla se agitó durante 0,5h a 0 °C, después se añadieron 0,1 ml de etanol y la mezcla se agitó durante otra 1 hora. La solución resultante se diluyó con agua destilada al 0,2% y se dializó contra la mezcla de 5 litros (NaCl al 0,1%, NaHCO_3 al 0,1%), 3 veces (una vez al día), y contra agua destilada, 5 litros 7 veces (2 veces al día). Después, la solución resultante se evaporó y analizó.

DS 9% (determinado por RMN)

Ejemplo 14**Oxidación de ácido hialurónico (HA) = Preparación de HA-aldehído**

45 Se añadió gradualmente una solución acuosa de NaClO (0,5 eq.), bajo nitrógeno, a una solución acuosa de HA al 1% (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) que contiene NaCl al 1%, KBr al 1%, TEMPO (0,01 eq.) y NaHCO_3 (20 eq.). La mezcla se agitó

durante 12h a 0°C, después se añadieron 0,1 ml de etanol y la mezcla se agitó durante otra 1 hora. La solución resultante se diluyó con agua destilada al 0,2% y se dializó contra la mezcla de 5 litros (NaCl al 0,1%, NaHCO₃ al 0,1%), 3 veces (una vez al día), y contra agua destilada, 5 litros 7 veces (2 veces al día). Después, la solución resultante se evaporó y analizó.

5 DS 10% (determinado por RMN)

Ejemplo 15

Oxidación de ácido hialurónico (HA) = Preparación de HA-aldehído

10 Se añadieron 1,2 eq. de 1,1,1-triacetoxi-1,1-dihidro-1,2-benziodoxol-3 (1H) -ona (Dess-Martin Periodinan) a una solución de forma ácida de hialuronano al 1% (1 g, 1 · 10⁵ g·mol⁻¹) en DMSO no acuoso, y la mezcla se agitó durante 5h a 20 °C. La solución resultante se diluyó después con agua destilada al 0,2% y se dializó contra la mezcla de 5 litros (NaCl al 0,1%, NaHCO₃ al 0,1%), 3 veces (una vez al día), y contra agua destilada, 5 litros 7 veces (2 veces al día). Después, la solución resultante se evaporó y analizó.

DS 40% (determinado por RMN)

Ejemplo 16

15 **Eliminación de HA-aldehído = Preparación del aldehído α,β-insaturado de HA**

Se añadieron 6,7 ml de DMSO y base de DIPEA (5 eq.) a una solución de HA-aldehído al 3% (0,1 g, grado de oxidación DS = 40%, Ejemplo 15) en agua. La mezcla se agitó durante 72 horas a 60 °C. La solución resultante después se precipitó con una mezcla de isopropanol/hexano y la parte sólida se secó al vacío.

DS 20% (determinado por RMN),

¹H RMN (D₂O) \ delta 9,24 (s, 1H, -CH=O), 6.32 (m, 1H, -CH=C-CH=O)
UV-Vis (D₂O) 252 nm, π-π * transición α, aldehído β-insaturado

20 **Ejemplo 17**

Eliminación de HA-aldehído = Preparación del aldehído α,β-insaturado de HA

Se añadieron 6,7 ml de DMSO y base de trietilamina (20 eq.) a una solución de HA-aldehído al 3% (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 10) en agua. La mezcla se agitó durante 150 horas a 30 °C. La solución resultante se precipitó después con una mezcla de isopropanol/hexano y la parte sólida se secó al vacío.

25 DS 5% (determinado por RMN)

Ejemplo 18

Eliminación de HA-aldehído = Preparación del aldehído α,β-insaturado de HA

30 Se añadieron 6,7 ml de DMSO y base de piridina (0,01 eq.) a una solución de HA-aldehído al 3% (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 10) en agua. La mezcla se agitó durante 12 horas a 80 °C. La solución resultante se precipitó después con una mezcla de isopropanol/hexano y la parte sólida se secó al vacío.

DS 3% (determinado por RMN)

Ejemplo 19

Eliminación de HA-aldehído = Preparación del aldehído α,β-insaturado de HA

35 Se añadieron 1,7 ml de DMSO y base de piridina (10 eq.) a una solución de HA-aldehído al 3% (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 10) en agua. La mezcla se agitó durante 48 horas a 60 °C. La solución resultante se precipitó después con una mezcla de isopropanol/hexano y la parte sólida se secó al vacío.

DS 4% (determinado por RMN)

Ejemplo 20

Eliminación de HA-aldehído = Preparación del aldehído α,β-insaturado de HA

40 Se añadieron 10 ml de DMSO y base de DIPEA (5 eq.) a una solución de HA-aldehído al 3% (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 10) en agua. La mezcla se agitó durante 48 horas a 60 °C. La solución resultante se precipitó después con una mezcla de isopropanol/hexano y la parte sólida se secó al vacío.

DS 5% (determinado por RMN)

Ejemplo 21**Eliminación de HA-aldehído = Preparación del aldehído α,β -insaturado de HA**

5 Se añadieron 6,7 ml de sulfonano y base de DIPEA (5 eq.) a una solución de HA-aldehído al 3% (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 10) en agua. La mezcla se agitó durante 72 horas a 50 °C. La solución resultante se precipitó después con una mezcla de isopropanol/hexano y la porción sólida se secó al vacío.

DS 5% (determinado por RMN)

Ejemplo 22**Reducción del aldehído α,β -insaturado de HA = Preparación de Δ HA**

10 Se añadió borohidruro de sodio (10 eq.) a una solución de aldehído α,β -insaturado de HA al 2% (200 mg, Ejemplo 16) en agua destilada, a 5 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 5 °C, después se precipitó con isopropanol y se analizó por RMN.

DS 20% (determinado por RMN)

^1H RMN (D_2O) 5.06 (1H, H1, bs), 5.17 (1H, H1, bs)

Ejemplo 23**Reducción del aldehído α,β -insaturado de HA = Preparación de Δ HA**

15 Se añadió borohidruro de sodio (0,1 eq.) en una solución de aldehído α,β -insaturado de HA al 2% (200 mg, Ejemplo 17) en agua destilada, a 5 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 20h a 5 °C, después se precipitó con isopropanol y se analizó por RMN.

DS = 4% (determinado por RMN)

Ejemplo 24

20 **Reducción del aldehído α,β -insaturado de HA = Preparación de Δ HA**

Se añadió borohidruro de sodio (1 eq.) a una solución de aldehído α,β -insaturado de HA al 2% (200 mg, Ejemplo 17) en agua destilada, a 40 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 40 °C, después se precipitó con isopropanol y se analizó por RMN.

DS = 5% (determinado por RMN)

25 **Ejemplo 25**

Reducción de aldehído α,β -insaturado de HA = Preparación de Δ HA

Se añadió borohidruro de sodio (2 eq.) en una solución de aldehído α,β -insaturado de HA al 2% (200 mg, Ejemplo 17) en agua destilada, a 20 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 4 ha 20 °C, después se precipitó con isopropanol y se analizó por RMN.

30 DS = 5% (determinado por RMN)

Ejemplo 26**Determinación de la actividad de oxidación (Figura 2)**

35 La actividad antioxidante de los polisacáridos de Δ HA preparados según el Ejemplo 22 y Δ CS preparado según el Ejemplo 2, se determinó por medio de un radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Esta determinación se realizó según la descripción en (Brand-Williams W. et al., LWT - Food Science and Technology, 28, 1, 25-30, 1995), con una modificación menor. Brevemente, se añadieron 100 μl de solución DPPH al 0,01% en metanol a 100 μl de la sustancia ensayada disuelta en 50 mM de Tris pH 7,1. La disminución de la absorbancia se midió después de 15 minutos a 515 nm. Se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) como control positivo. Los datos se midieron en tres experimentos independientes. Se usó el ensayo T para la evaluación de la significancia estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Figura 2).

40

Ejemplo 27**Ensayo de citotoxicidad de los derivados preparados según el Ejemplo 25 (Figura 1)**

Se comparó un efecto de citotoxicidad del derivado de HA para células no cancerosas: fibroblastos dérmicos humanos primarios y para líneas celulares de carcinoma de mama (MDA-MB-231), líneas celulares de carcinoma de pulmón (A-549) y líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HEP-G2). Para el propósito de los experimentos, las células se cultivaron bajo condiciones estándar (37 °C, 5% de CO₂) en un medio adecuado (10% de FBS - suero bovino fetal).

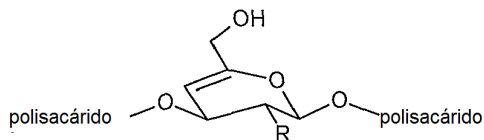
5 Después de lograr una confluencia del 80%, las células se pasaron, se contaron mediante un contador automático CASY TT, Roche, y se colocaron en paneles de 96 pocillos a una densidad de 5,000 células por pocillo en 200 µl de medio. Después de 24 horas, el medio se reemplazó con las soluciones de las sustancias ensayadas de concentraciones de 1.000; 500; 100; y 10 µg/ml de medio al 10%. La viabilidad celular se midió 24, 48 y 72 horas después del tratamiento mediante el ensayo MTT - se añadieron 20 µL de solución MTT (5 mg/ml) en cada pocillo,

10 seguido de una incubación durante 2,5 horas y lisis celular con solubilización. solución (IPA: DMSO 1:1 s 10% Triton X-100 y 9,9% HCl al 37%) durante 30 minutos. Después se midió la absorbancia mediante el lector de microplacas VERSAmax a 570 nm y 690 nm (corrección de fondo). La viabilidad de las células tratadas se evaluó por correlación con el control no tratado que corresponde a cero en la Figura 1. Los valores por encima de cero se refieren a una activación celular (sin efecto citotóxico de los derivados) y los valores por debajo de cero indican una viabilidad celular

15 reducida, es decir, el efecto citotóxico de los derivados. En el caso de NHDF, es obvio, en la Figura 1, que el derivado ensayo no tuvo efecto citotóxico. En el caso de las líneas de carcinoma (MDA-MB-231, A-549, HEP-G2) se observó un efecto citotóxico de los derivados. Basado en los resultados de las pruebas presentadas, se puede deducir un posible efecto anticancerígeno del derivado (Figura 1).

REIVINDICACIONES

1. Derivados insaturados de polisacáridos que comprenden, en su estructura, al menos un heterociclo que tiene un doble enlace en las posiciones 4 y 5 según la fórmula estructural X,

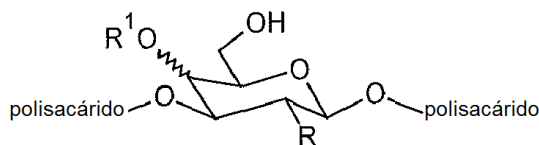


X

5 donde R representa -NH-CO-CH₃ o -OH.

2. Derivados de polisacáridos según la reivindicación 1 caracterizado por que su peso molecular está en el intervalo de $5 \cdot 10^3$ a $5 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ y que los polisacáridos se seleccionan del grupo que comprende sulfato de condroitina, carragenano, sulfato de dermatán, ácido hialurónico o sulfato de queratán.

10 3. Un método de preparación de los derivados de polisacáridos definidos en la reivindicación 1 o 2. caracterizado por que el polisacárido de partida, que comprende el fragmento Y



Y

donde R es -NH-CO-CH₃ o -OH, y R¹ es -SO₂-ONa, -SO₂-OH o -H, en la primera etapa se oxida a un aldehído en la posición 6, en la segunda etapa se elimina en las posiciones 4 y 5 del ciclo para formar un doble enlace, y en la tercera etapa el grupo aldehído se reduce selectivamente.

15 4. El método de preparación según la reivindicación 3 caracterizado por que el polisacárido de partida es condroitín sulfato, carragenano, dermatán sulfato, ácido hialurónico o queratán sulfato.

5. El método de preparación según las reivindicaciones 3 o 4. caracterizado por que en la primera etapa, la oxidación en la posición C-6 se produce mediante el sistema R³-TEMPO/NaClO, donde R³ es hidrógeno o grupo N-acetilo, en agua a la temperatura de 0 °C a 10 °C, en donde la cantidad molar de NaClO está dentro del intervalo de 0,3 a 0,8 eq. y la cantidad molar de R³-TEMPO está dentro del intervalo de 0,005 a 0,2 eq., con respecto a la unidad repetitiva del polisacárido, o mediante 1,1,1-triacetoxi-1,1-dihidro-1,2-benziodoxol-3(1H)-ona (DMP) en DMSO a la temperatura de 10 °C a 50 °C, en donde la cantidad de DMP está dentro del intervalo de 0,05 a 2 eq., con respecto a la unidad repetitiva del polisacárido.

25 6. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5. caracterizado por que el polisacárido de partida es ácido hialurónico o sulfato de queratán, y que, en la segunda etapa, el polisacárido oxidado sufre la reacción de eliminación en una mezcla de agua/disolvente aprótico polar en presencia de una base a la temperatura de 30 a 80 °C, preferiblemente a la temperatura de 50 a 60 °C.

30 7. El método de preparación según la reivindicación 6 caracterizado por que la cantidad de la base es de 0,01 a 20 eq., preferiblemente de 5 a 10 eq., con respecto a la unidad de polisacárido repetitiva, en la que la base se selecciona del grupo que comprende bases orgánicas, por ejemplo piridina, trietilamina o N, N-diisopropiletilamina, o bases inorgánicas, por ejemplo Ca(OH)₂.

8. El método de preparación según las reivindicaciones 6 o 7. caracterizado por que el disolvente aprótico es miscible en agua y comprende, por ejemplo, DMSO o sulfolano, y la relación en volumen de disolvente/agua está en el intervalo de 3/1 a 1/2.

35 9. Método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8. caracterizado por que la segunda etapa de reacción continúa durante 12 a 150 horas.

10. Método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5. caracterizado por que el polisacárido de partida es sulfato de condroitina, carragenano o sulfato de dermatán, y que el polisacárido oxidado se elimina espontáneamente en la segunda etapa directamente en la mezcla de reacción para formar un aldehído α, β-insaturado,

y la eliminación espontánea continúa sin la necesidad de añadir cualquier base, disolvente orgánico, y sin aumentar la temperatura de reacción.

11. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10 caracterizado por que el peso molecular del polisacárido de partida está en el intervalo de $5 \cdot 10^3$ a $5 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹.
- 5 12. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11 caracterizado por que se añade borohidruro de sodio en la tercera etapa en la cantidad de 0,1 a 10 equivalentes, preferiblemente 0,3 a 2 equivalentes, calculados con respecto a la unidad de polisacárido repetitiva, en agua, a la temperatura de 5 - 40 °C, preferiblemente a la temperatura de 15-25 °C, a un pH en el intervalo de 5 a 10, preferiblemente de 6 a 8.
- 10 13. Uso de los derivados como se define en la reivindicación 1 o 2 para la preparación de materiales que tienen un efecto antioxidante mejorado.
14. Uso de los derivados como se define en la reivindicación 2, donde el polisacárido es ácido hialurónico, para la preparación de materiales que tienen un efecto anticancerígeno.

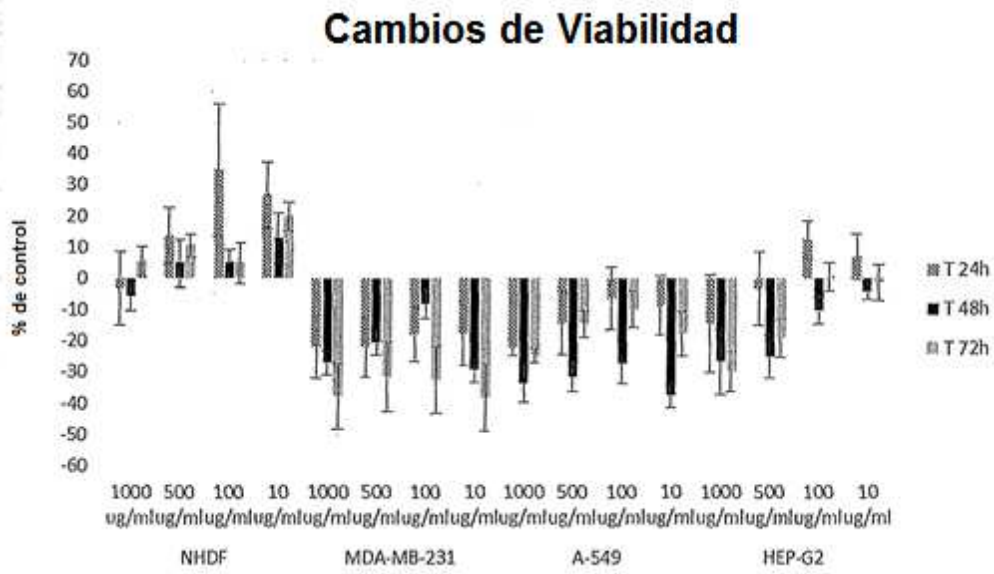


Fig. 1

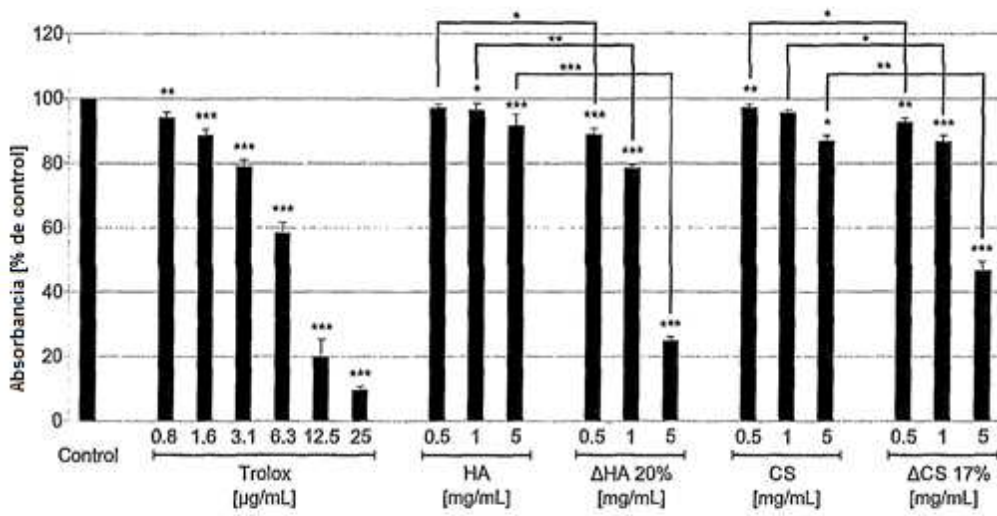


Fig. 2