



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 851**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**C08B 37/02** (2006.01)

**C07C 303/00** (2006.01)

**C07C 309/00** (2006.01)

**C07B 45/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02803847 .9**

86 Fecha de presentación : **28.11.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1456247**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54

Título: **Procedimiento de sulfonación de compuestos que comprenden grupos hidroxilos (OH) libres o aminas primarias o secundarias.**

30

Prioridad: **29.11.2001 FR 01 15444**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2008**

73

Titular/es: **Organes, Tissus : Régénération,  
Réparation, Remplacement-OTR3  
33, rue Pierre Brossolette  
94000 Créteil, FR**

72

Inventor/es: **Petit, Emmanuel;  
Garcia-Papy, Dulce y  
Barbier-Chassefiere, Véronique**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 292 851 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).

# ES 2 292 851 T3

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de sulfonación de compuestos que comprenden grupos hidroxilos (OH) libres o aminas primarias o secundarias.

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de compuestos sulfatados, en condiciones, no degradantes, reproducibles y compatibles con utilizaciones de dichos compuestos en las que debe describirse una definición molecular precisa, como por ejemplos como agentes terapéuticos.

10 El procedimiento de la invención se aplica a todo compuesto monomérico, oligomérico o polimérico que comprende grupos hidroxilo (OH) libres o aminas primarias o secundarias sustituidas o no. Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento de O y N sulfonación, de polímeros funcionalizados.

15 Los procedimientos de preparación de compuestos sulfatados descritos en la técnica anterior inducen generalmente roturas de las cadenas de los polímeros durante la O o N sulfonación y por lo tanto la formación de residuos de reacción potencialmente tóxicos. El procedimiento según la presente invención pretende precisamente evitar este inconveniente al permitir la adición controlada de grupos sulfonatos en condiciones acondicionadas tal que la integridad estructural del polímero inicial, como un oligosacárido, no sea alterada.

20 Se conoce en la técnica anterior polímeros funcionalizados con propiedades anticoagulantes y principalmente una familia de derivas obtenidos por sustituciones, sobre una cadena de dextranos (D), grupos carboximetílicos (CM), metil-bencilamida (B) y metil-bencilamidossulfonato (S), designados bajo la abreviación CMDDBS. Los procedimientos de preparación de estos polímeros han sido descritos en particular en la patente francesa publicada con el N° 2 461 724 así como en la patente de EE.UU. publicada con el N° 4 740 594. Ninguna de estas patentes proporciona un análisis preciso de las estructuras poliméricas obtenidas y los procedimientos descritos no permiten aportar la evidencia de que los productos obtenidos son homogéneos. Las condiciones experimentales de la reacción de sulfonación descritas en estas patentes dan prioridad a la fijación de sulfonas sobre los grupos OH libres del residuo glucosídico, y el análisis presentado no permite poner claramente en evidencia la presencia de bencilamina-sulfonato.

30 Se han descrito otros miembros de la familia de los CMDDBS, designados HBGF por "Heparin Binding Growth Factor" (factor de crecimiento unido a heparina en el idioma inglés), como agentes de cicatrización en la patente de EE.UU. publicada con el N° 5693625. Los HBFGPP se describen también por sus propiedades de estimulaciones de la reparación y de la regeneración de lesiones inducidas en los tejidos musculares (Patente francesa N° 2 718 024), nervioso (Patente francesa N° 2 718 026), del tracto digestivo (Patente francesa N° 2 718 023) así como su propiedad antiinflamatoria (Patente francesa N° 2 718 025). Estas patentes establecen una serie de criterios funcionales que permiten cribar entre todos los polímeros biocompatibles los que responden a las cuatro propiedades funcionales siguientes:

- 40 - Proteger los factores de crecimiento a la afinidad por heparina (HBGF) como los factores de crecimiento de los fibroblastos tales como los FGF1&2 o los factores transformantes, como el TGF beta, contra las degradaciones proteolíticas así como potenciar sus actividades biológicas en una serie de ensayos sobre cultivo celular.
- 45 - Presentar una actividad anticoagulante inferior a 10 unidades internacionales por mg.
- Inhibir la actividad de la elastasa leucocitaria en condiciones fisiológicas.
- Inhibir la actividad de la plasmina en condiciones fisiológicas.

50 La solicitud de patente francesa N° 9809309 describe la estructura de una familia de polímeros, designados RGTA por "ReGeneraTing Agent" (agente regenerador en el idioma inglés), que presentan propiedades de los HBGFPP y describe su procedimiento de preparación y propiedades. Los RGTA presentan efectos antifibróticos, principalmente que permiten mejorar la calidad de las cicatrices cutáneas, de los efectos antioxidantes principalmente para tratar los efectos deletéreos de los radicales libres (después de radiaciones ionizantes o durante el estrés oxidativo inducido por isquemias) y propiedades de regulación de la homeostasia tisular principalmente de masas óseas. Estas propiedades completan aquellas descritas para los HBGFPP.

Los polímeros descritos en la patente francesa N° 98 09309 responden a la fórmula siguiente:



en la que:

65 A es un monómero; X representa un grupo RCOOR'; Y representa un grupo O o N-sulfonato fijado sobre A y que responde a una de las fórmulas siguientes ROSO3R'; RNSO3R'; los grupos R son cadenas hidrocarbonadas alifáticas, opcionalmente ramificadas y/o insaturadas y que pueden contener uno o varios ciclos aromáticos con la excepción de la bencilamina y de la bencilamina-sulfonato; R' representa un átomo de hidrógeno o un catión; a representa el

número de monómeros; x representa la tasa o grado de sustitución de los monómeros A con grupos X; y representa la tasa o grado de sustitución de los monómeros A con grupos Y.

Entre los polímeros descritos en la patente francesa N° 98 09309, se pueden citar derivados de dextrano como los CDMS. Se han descrito igualmente polímeros del tipo CMDS como anticoagulantes (Maiga *et al.* Carbohydrate Polymers, 1997, 32, 89-93).

En todos estos ejemplos de la técnica anterior, los métodos de síntesis descritos no permiten la obtención de productos según los criterios de reproducibilidad suficiente que asegure el mantenimiento de la integridad molecular y la ausencia de contaminantes. En efecto, si los procedimientos de sustituciones de grupos carboxílicos se describen ampliamente en la técnica anterior y permiten la sustitución controlada y acondicionada asegurando una reproducibilidad suficiente, los procedimientos de sulfonación son más difíciles de dominar.

Los procedimientos de sulfonación se realizan a un pH muy ácido lo que no permite preservar la integridad de la cadena del polímero principalmente si esta está constituida por azúcares naturales. Además, estas condiciones de sulfonación conllevan descarboxilaciones difíciles de controlar.

Así numerosos trabajos de la técnica anterior describen métodos que permiten sulfatar polisacáridos del tipo Aa. Por ejemplo el dextrano sulfato (u O-sulfonato) (DS), el carboximetil-dextrano-sulfato (CM-D-S) (u O-sulfonato), u otros oligosacáridos sulfatos (u O-sulfonatado) como el xilano o el almidón se han sulfatado (u O-sulfonatado) mediante procedimientos del tipo del que se describe en la patente de EE.UU. N° 4 814437. Entre estos métodos, se han descrito los que proponen una sulfonación de polisacáridos que utilizan ácidos fuertes como agentes de sulfonación por numerosos autores. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4 740 594 y N° 4 755 379 y francesa N° 2 772 382 describen un tratamiento con ácido clorosulfónico que utiliza diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) como disolvente para la producción de moléculas del tipo CM-D-S y CM-D-B-S. Este procedimiento ya se había descrito ampliamente en antiguos trabajos ya que se había utilizado el mismo ácido para la síntesis del DS con la piridina como disolvente de carácter básico (Ricketts, Biochem J. 51, 210-133, 1952). El ácido sulfúrico y el ácido sulfónico en presencia de la formamida también han sido utilizados para la preparación de DS a bajas temperaturas, como se describe en las patentes de EE. UU. N° 3 498 972 y 3 141 014. Se conoce que estas condiciones de reacción fuertemente ácidas provocan la degradación parcial de los mismos productos en presencia de disolventes de carácter básico o a bajas temperaturas. Conllevan una importante fragmentación de la cadena macromolecular en el caso de productos poliméricos y una hidrólisis parcial de ciertos grupos funcionales contenidos en las moléculas a sulfonatar. Se han aportado varias mejoras a estas condiciones de fuerte acidez con la utilización de medios mejor tamponados o de menor acidez. Así, la utilización de complejos de trióxido de azufre ( $\text{SO}_3$ ) como agentes de sulfonación menores severos que los ácidos sulfúricos y sulfónicos ya se han introducido (Archives of biochemistry and biophysics, 95, 36-41, 1961; tetrahedron letters, 29, 7, 803-806, 1988; J. Chem. Soc. Perkin trans. 1, 157, 1995). Se han comercializado varios complejos del tipo  $\text{SO}_3$ -amina, como el  $\text{SO}_3$ - $\text{ME}_3\text{N}$  (trimetilamina), el  $\text{SO}_3$ - $\text{Et}_3\text{N}$  (trietilamina), el  $\text{SO}_3$ -piridina, y el  $\text{SO}_3$ -piperidina. Estos reactivos se utilizan en un medio anhidro en disolventes como DMF, formamida y DMSO. Sin embargo estos métodos a pesar de ser utilizados para la producción de polisacáridos sulfatos, principalmente como los derivados de dextrano, funcionalizados por grupos éster, éter o amida, presentan inconvenientes mayores ya que conllevan:

- la fragmentación aleatoria de la cadena macromolecular de los polímeros, sin embargo en proporciones menos importantes que con los ácidos sulfónicos,
- una hidrólisis parcial de los grupos funcionales ya presentes sobre los polímeros citados anteriormente, y
- generan productos secundarios por formación de aminas que contaminan las preparaciones y que han resultado ser tóxicos después de inoculación *in vivo* (Brain Res 16, 208-2, 473-478, 1981).

Estas técnicas se han mejorado más con el fin de eliminar al máximo los residuos tóxicos así como lo propone para la piridina el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. N° 4 814 437. En efecto, los  $\text{SO}_3$ -aminas utilizados en este procedimiento de la técnica anterior son reactivos con los grupos aldehídos presentes sobre el extremo reductor de la mayoría de los polisacáridos, principalmente en el dextrano, y el enlace así formado es covalente y por lo tanto permanente.

El inconveniente de la utilización de complejos del tipo  $\text{SO}_3$ -amina se ha superado igualmente al emplear complejos del tipo  $\text{SO}_3$ -amida como el  $\text{SO}_3$ -DMF y el  $\text{SO}_3$ -FA. Por ejemplo, las sales de DS, más particularmente las sales de sodio, se preparan actualmente como se describe en la patente de EE.UU. N° 4 855 416, por la O-sulfonación del dextrano con un complejo de  $\text{SO}_3$  asociado a la formamida ( $\text{SO}_3$ -FA) con la formamida como disolvente. Este método comprende la formación *in situ* del complejo  $\text{SO}_3$ -FA y luego su reacción con el dextrano. La fuerte reactividad del complejo  $\text{SO}_3$ -FA provoca una fuerte acidez del medio de reacción a pesar de la utilización de una atmósfera inerte ( $\text{N}_2$ ) y de disolventes anhidros. Este hecho conlleva igualmente la degradación de la cadena macromolecular.

Otro complejo no-aminado muy utilizado es el  $\text{SO}_3$ -DMF. También se ha propuesto en la patente francesa N° 2 772 382 para la síntesis de polisacáridos sulfatados del tipo CM-D-S y CM-D-B-S. Sin embargo, el complejo  $\text{SO}_3$ -DMF como el complejo  $\text{SO}_3$ -FA, producen una fuerte acidez del medio de reacción, lo que genera igualmente la fragmentación de la cadena macromolecular y la hidrólisis de grupos lábiles que conlleva una pérdida del control de la

## ES 2 292 851 T3

síntesis y de los productos finales. Este procedimiento es por lo tanto tan imperfecto como los otros procedimientos en el caso de la preparación de polímeros poli-aniónicos de altos pesos moleculares que no se desea cortar de una manera aleatoria y no controlada.

5 El documento US 5 229 504 describe un procedimiento para preparar quitosano sulfonato, en particular por reacción de un complejo  $\text{SO}_3$ -DHF con quitosano tratado previamente.

10 Es en esta inquietud de mejora de los métodos de síntesis, que se han descrito protocolos que permiten la obtención de CMDBS y CMDS en la patente francesa N° 97 15702. Según la patente francesa N° 97 15702, esta mejora permite por una parte la obtención de derivados de dextrano que presentan una mayor homogeneidad de peso molecular y por otra parte controlar las tasas de sustitución que aseguran una mejor homogeneidad de las estructuras y así una mejor definición. Ahora bien, el método descrito en la patente francesa N° 97 15702 reposa, como en la técnica anterior, en la sulfonación de polisacáridos que utilizan  $\text{SO}_3$ -amina (DMF, piridina o trietilamina), y los ejemplos dados se obtienen exclusivamente con la  $\text{SO}_3$ -piridina. Además, este método conduce a la formación de trazas residuales de piridina  
15 cuya toxicidad para el ser humano es bien conocida y no parece permitir la ausencia de formación de fragmentos de la cadena del polisacárido.

20 La presente invención tiene precisamente por objetivo ofrecer nuevos métodos generales de sulfonación que permiten controlar con mucho rigor y precisión las condiciones de sustituciones de grupos sulfonatos sobre compuestos que contienen funciones hidroxilos o funciones aminas primarias o secundarias.

25 Este objetivo se alcanza gracias a un procedimiento de sulfonación de compuesto que presenta una o varias funciones hidroxilos libres y/o una o varias funciones aminas primarias o secundarias sustituidas o no, caracterizado porque comprende el tratamiento de dicho compuesto con el complejo  $\text{SO}_3$ -DMF en presencia de un captador de ácido, elegido entre el grupo que comprende: los alquenos o alquinos con punto de ebullición inferior a  $100^\circ\text{C}$  o una de sus mezclas.

30 Se entiende por captador de ácido una sustancia o una mezcla de sustancias capaces de reaccionar selectivamente con los protones libres en solución. Después de la adición de este captador de ácido en la mezcla de reacción, los protones son atrapados por el captador de ácido y no participan más al descenso del pH ya que ya no son reactivos.

Ventajosamente, el captador de ácido es un buteno como el 2-metil-2-buteno (2M2B), 2-metil-propeno, 2-metil-penteno, o sus isómeros, o una de sus mezclas.

35 El procedimiento según la invención es remarcable porque permite evitar la aplicación de pH muy ácidos y así suprimir el riesgo de roturas de los compuestos tratados. Además, presenta la ventaja de no introducir sustancias tóxicas difíciles o imposibles de eliminar completamente.

Más particularmente, el procedimiento según la invención comprende las etapas siguientes:

- 40
- a) la disolución o la preparación de una solución homogénea del compuesto a sulfonatar en un disolvente o un co-disolvente anhidro, como la dimetilformamida (DMF) o un co-disolvente compuesto de formamida y de dimetilformamida.
  - 45 b) la adición a temperatura ambiente ( $20$ - $22^\circ\text{C}$ ) de un exceso molar de un captador de ácido, como el 2-metil-2-buteno, miscible en el co-disolvente.
  - c) la adición rápida del complejo  $\text{SO}_3$ -DMF bajo agitación,
  - 50 d) la agitación de la mezcla obtenida en la etapa precedente durante una o dos horas a una temperatura controlada e inferior a  $30^\circ\text{C}$ ,
  - 55 e) la parada de la reacción por adición progresiva de la mezcla sobre una disolución alcalina, por ejemplo una solución al 2% de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) u otra base, con un control de pH nunca inferior a 4 con el fin de obtener las sales del compuesto a sulfonatar.

60 El procedimiento de la invención comprende ventajosamente la purificación del compuesto sulfonato obtenido en la etapa (e), por ultrafiltración tangencial contra el agua (ella misma de calidad inyectable para el ser humano) a través de una membrana de ultrafiltración con un umbral de corte de 100 Dalton.

65 Preferentemente, el disolvente empleado en la etapa (a) no es dimetilsulfóxido (DMSO), ya que los trabajos realizados en el marco de la presente invención han puesto en evidencia que este disolvente se elimina muy difícilmente de las preparaciones de polisacáridos sulfonados y por lo tanto constituye un obstáculo para su utilización en la preparación de formas farmacéuticas.

Cuando el compuesto a sulfonatar es poco soluble en un disolvente o un co-disolvente anhidro una forma particular de realización del procedimiento consiste en protonar dicho compuesto con el fin de favorecer su disolución. Se trata principalmente de compuestos a sulfonatar que son polímeros de un azúcar, como el dextrano, sustituido con uno o

## ES 2 292 851 T3

varios grupos carboxilato, cuya protonación conduce a la formación de grupos -COOH, por ejemplo por el paso sobre una columna de intercambio de cationes.

5 Así, las condiciones de sulfonación son suficientemente adecuadas y controladas para evitar una descarboxilación del polímero inicialmente sustituido con grupos carboxílicos. En consecuencia, las condiciones de sulfonación son ventajosamente las siguientes:

10 El polímero a sulfonatar se disuelve en un disolvente anhidro (véase el ejemplo II,1). Un exceso molar de captador de ácido (como el alqueno 2M2B) se adiciona. Se adiciona el reactivo de sulfonación (SO<sub>3</sub>) como el complejo SO<sub>3</sub>-DMF y la reacción se desarrolla a una temperatura inferior a la temperatura de evaporación del captador de ácido. La reacción se para mediante la adición de una solución alcalina, como NaHCO<sub>3</sub>.

15 El procedimiento de la invención se aplica a monómeros, oligómeros o polímeros. Se adapta más particularmente a los polímeros como los HBGFP o los RGTA definidos anteriormente, y por lo tanto principalmente a compuestos derivados de dextranos o de copolímeros de ácidos málicos. Así, la invención se interesa más especialmente en los polímeros de fórmula:



20 en la que:

25 A es un monómero; X representa un grupo RCOOR'; Y representa un grupo O o N-sulfonato fijado sobre A y que responde a una de las fórmulas siguientes ROSO<sub>3</sub>R'; RNSO<sub>3</sub>R'; los grupos R son cadenas hidrocarbonadas alifáticas, opcionalmente ramificadas y/o insaturadas y que pueden contener uno o varios ciclos aromáticos con la excepción de la bencilamina y de la bencilamina-sulfonato; R' representa un átomo de hidrógeno o un catión; a representa el número de monómeros; x representa la tasa o grado de sustitución de los monómeros A con grupos X; y representa la tasa o grado de sustitución de los monómeros A con grupos Y.

30 El procedimiento de la invención puede realizarse sobre polímeros, principalmente de fórmula (I), donde los enlaces entre los monómeros o entre los monómeros y sus sustituyentes, como los enlaces A-A o A-X de los polímeros de fórmula (I), se realizan con funciones inestables en medio ácido, principalmente funciones éter, amida, éter, acetal (osídico) u otros grupos.

35 El procedimiento de la invención está adaptado por lo tanto más particularmente a la preparación de azúcares sulfatados, monoméricos u oligoméricos, como ciertos fragmentos de heparina, o también para polímeros de la familia de los RGTA principalmente cuando A es un monómero osídico como en el caso de los polímeros a base de dextrano o de cualquier otro compuesto polisacárido.

40 Otras ventajas y características de la invención aparecerán de los ejemplos que siguen que se refieren a la realización del procedimiento según la invención y que harán referencia a los dibujos en el anexo en los que:

45 - La figura 1 es una representación gráfica de una molécula de CMDS en la que se evidencia el aldehído terminal. Para un CMDS en el que los valores x e y son diferentes de 0 existen 3 tipos de unidades Z, a) el aldehído, o hemiacetal, b) el carboximetil-glucósido y c) el sulfonato-glucósido.

- La figura 2 representa el equilibrio entre la función aldehído y el hemiacetal de la unidad terminal de un dextrano sustituido. La unidad sustituida en posición anomérica no participa más en el equilibrio.

50 - La figura 3 representa el perfil cromatográfico de una molécula del tipo CMDS con las características estructurales descritas en la tabla 3.

- La figura 4 muestra los perfiles cromatográficos obtenidos para un mismo producto PA07 sobre columnas diferentes de gel de filtración.

55 - La figura 5 da la estructura del CMDS.

60 Estos ejemplos comprenden así la comparación del procedimiento de la invención con los de la técnica anterior, principalmente para la sulfonación de los polímeros derivados de dextrano como los CMDS o CMDBS. Esta comparación muestra que los protocolos propuestos en las patentes francesas N° FR 97 15702 y N° 9907636 no permiten obtener una buena preservación de la integridad molecular de los polímeros de dextrano ya que generan fragmentaciones detectables y cuantificables mediante métodos simples así como hidrólisis de grupos injertados sobre las cadenas macromoleculares.

65

## ES 2 292 851 T3

### I. Evaluación de la sulfonación

#### I.1 - Métodos de medida de grupos carboxílicos y sulfonatos

5 Para permitir comparar los diferentes métodos de sulfonación, hemos medido el grado de sustitución (ds) en grupos carboxilos (x) y en grupos sulfonatos (y) por unidad de glucosa. El dextrano siendo un polímero de glucosa, posee sobre cada unidad de glucosa 3 grupos OH reactivos. Por este hecho el ds máximo teórico es de 3. Las valoraciones se hacen mediante métodos titrimétricos y mediante análisis elemental, según los protocolos habituales descritos en la técnica anterior.

10 La valoración titrimétrica, en combinación con el análisis elemental, permite determinar las tasas de sustitución global (x e y) de grupos, carboximetil-éter (x) y sulfonatos (y).

#### I.2 - Determinación de la posición de grupos de sustitución

15 Con el fin de precisar la posición de los grupos injertados sobre las unidades osídicas, hemos utilizado un método de análisis por RMN (Resonancia Magnética Nuclear de Protón) según las condiciones habituales conocidas por el experto en la técnica (J. Biol. Chem. 275, 38, 29383-29390, 2000). Hemos utilizado un espectrómetro Bruker 200 Mhz.

#### I.3 - Método que permite medir la fragmentación de las cadenas poli-osídicas

25 Con el fin de medir la integridad de la cadena polimérica antes y después de la reacción de adición de los grupos sulfonatos, se han valorado los aldehídos presentes en el producto en solución.

30 La valoración de los aldehídos permite determinar el número de unidades terminales reductoras de los productos, ya que solamente el extremo terminal reductor del polímero presenta un grupo aldehído como muestra la figura 1. Así el número de grupo aldehído se valora sobre el producto a sulfonatar, en este caso, es igual a 1 micromol de aldehído por gramo de producto. Este valor debe quedar en todos los casos inferior o igual al valor del producto de partida si no ha habido formación de roturas a lo largo de la reacción.

35 En efecto el valor del aldehído libre medido después de la reacción de sulfonación es inferior al valor medido antes de la introducción de grupos sulfonato (1,0 micromol/g por un CMDS a 0,5 mmol/g). Los valores del aldehído libre habitualmente encontrados para un producto tipo CMDS en el que  $x=0,5$  e  $y=1,25$  son próximos a 0,4 micromoles de aldehído por gramo de producto. Por el contrario, si este número supera el valor de partida (1,0) forzosamente ha habido formación de roturas.

40 Este método permite por lo tanto medir la formación de fragmentos ya que cada rotura de cadena genera un nuevo grupo aldehído reactivo y detectable.

#### I.4 - Método que permite medir los pesos moleculares y estudiar la homogeneidad aparente de la preparación

45 La medida del peso molecular se realiza por cromatografía de exclusión estérica de alta eficacia en  $\text{NaNO}_3$  0,1 M sobre columnas de gel de filtración KB-804 y KB-805 (Shodex Japon) en serie a 0,7 ml/min. Los productos se detectan en la salida de la columna mediante un detector mini de dispersión de luz modelo Dawn y un refractómetro del tipo RID 10 (J. Biol. Chem. 275, 38, 29383-29390, 2000). La homogeneidad de la preparación se refleja mediante la curva de distribución del peso molecular y la medida de la anchura (a media altura) del pico así como por la medida de la simetría de la curva.

50 Una segunda técnica de HPLC-gel de filtración permite mostrar la homogeneidad de la molécula en lo que se refiere a la repartición de los pesos moleculares. Una distribución gaussiana se muestra en la figura 3.

55 Las condiciones cromatográficas son: Columna: TSKgelG4000PWX(TOSHAAS) a 30°C, 7,8 mm DI x 30 cm; fase móvil: NaCl 0,3 M; caudal: 0,7 ml/min; detección: IR 0,06.

60 Se ha constatado que para productos sintetizados según las técnicas que utilizan los complejos de  $\text{SO}_3$ -amina la homogeneidad de la preparación varía según el sistema cromatográfico utilizado.

65 Cuando el producto se separa mediante las columnas Shodex el pico es asimétrico pero cuando se utiliza el segundo sistema de separación cromatográfico, el pico correspondiente al mismo producto aparece simétrico como muestra la figura 4. Esto indica que la homogeneidad de la dispersión de pesos moleculares en estas preparaciones así como en las de la técnica anterior es relativa al sistema de separación utilizado.

## ES 2 292 851 T3

### II - Ejemplos de O-sulfonación de carboximetil-dextrano que utiliza la invención y comparación con la técnica anterior

Diferentes reacciones de O-sulfonación mediante reactivos como el ácido clorosulfónico, o bien también complejos SO<sub>3</sub>-amina, el complejo SO<sub>3</sub>-DMF, y el complejo SO<sub>3</sub>-DMF en presencia del captador de ácido, el 2-metil-2-buteno (SO<sub>3</sub>-DMF/2m2B), objeto de la presente invención se describen en los ejemplos siguientes.

Con el fin de establecer estas comparaciones, se ha elegido el carboximetil de dextrano como polímero de partida.

#### 10 II. 1 - Reacción en presencia del captador de ácido con el complejo SO<sub>3</sub>-DMF/2-metil-2-buteno

En un matraz de fondo redondo de 500 mL, se disolvieron 5 g de carboximetil-dextrano en forma ácida (CMDH<sup>+</sup>), (24,27 mmol) en 40 mL de formamida, luego se añadieron 40 mL de 2-metil-2-buteno (25 equivalentes) bajo agitación. Se añadieron 7,90 g de SO<sub>3</sub>-DMF (5 equivalentes por unidad de glucosa). La reacción se desarrolla durante 2 horas a 15 30°C bajo agitación.

La reacción se paró vertiendo muy lentamente el medio de reacción en 200 mL de NaHCO<sub>3</sub> al 2%. El pH debía estar próximo a 7. Si no fue el caso, la solución se neutralizó por adición de sosa o de HCl. En todos los casos, el pH de la solución no debía ser inferior a 5 con el fin de evitar la degradación de los productos.

Después de la eliminación del exceso de agua, de la DMF y del 2M2B por evaporación en el rotavapor a presión reducida el producto se purificó por ultrafiltración tangencial seguida de una liofilización. Se obtuvieron 6 g de producto sulfonatado en forma de un polvo blanco.

25 La Tabla 1, a continuación, indica la reproducibilidad de la O-sulfonación del CMDH<sup>+</sup> (x= 0,52) con 5 equivalentes de SO<sub>3</sub>-DMF y 25 equivalentes de 2M2B por unidad de glucosa. El porcentaje EM (desviación de la media) tiene que ver con productos preparados a partir del mismo CMD.

30 TABLA 1

	(x) antes de sulfonación	COO- en mEq/g (x) después de sulfonación	EM %	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en mEq/g	EM %	Aldehído en μmol/g	EM %	
35	1	0,52	1,58 (0,53)	2	3,82 (1,28)	5	0,35	5
40	2	0,52	1,54 (0,50)	1	3,76 (1,25)	1	0,49	3
	3	0,52	1,57 (0,52)	1	3,79 (1,26)	1	0,55	3
	4	0,52	1,52 (0,48)	2	3,64 (1,17)	1	0,60	8
45	EM= desviación de la media (%)							

La Tabla 2, a continuación, indica que la O-sulfonación del CMDH<sup>+</sup> en función de la cantidad de reactivo SO<sub>3</sub>-DMF/2M2B (1:5)

50

TABLA 2

Equivalentes SO <sub>3</sub> /DMF(2M2B) por unidad de glucosa	Grado de sustitución (ds)	
	x	y
0,0	0,50	-
2,0 (10,0)	0,49	0,42
2,5 (12,5)	0,52	0,89
3,0 (15,0)	0,52	1,00
4,0 (20,0)	0,49	1,10
5,0 (25,0)	0,52	1,20

65

## ES 2 292 851 T3

Se han efectuado diez manipulaciones independientes según este protocolo: cinco se han realizado siguiendo estrictamente el mismo protocolo con 5 equivalentes de SO<sub>3</sub>-DMF y 25 equivalentes de 2M2B, conforme a la Tabla 1, entradas 1-4. Otras cinco se han realizado haciendo variar la cantidad de reactivo SO<sub>3</sub>-DMF/2M2B de 2 a 5 equivalentes de reactivos por unidad de glucosa. La relación SO<sub>3</sub>-DMF versus 2M2B se queda siempre constante 1:5 (Tabla 2, entradas 1-5).

Los resultados muestran que el método es reproducible para la obtención de productos que poseen grupos éteres y de enlaces osídicos.

En todos los casos, el porcentaje EM (desviación de la media) es inferior al límite máximo fijado al 10%.

Conviene anotar que (x) no varía significativamente (EM<2%) (no hay descarboxilación) y que (y) es<3%.

Las medidas de pesos moleculares confirman la ausencia de heterogeneidad (figura 3 correspondiente al producto descrito en la Tabla 1, entrada 4) PM= 67500 +/-7500.

Los resultados obtenidos demuestran que en presencia de 2M2B, las tasas de sulfonación obtenidas son función de la estequiometría de la reacción. Además, las condiciones de reacción no afectan a las tasas de grupos carboximetil-éter previamente injertados sobre el CMD.

### II.2 - Definición de la molécula por análisis por RMN de protón

El análisis de los productos sintetizados se ha efectuado utilizando las técnicas analíticas como la valoración titrimétrica, el análisis elemental, la valoración de azúcares reductores, y el HPLC/filtración sobre gel acoplado a una detección MALLS completadas por espectroscopía <sup>1</sup>H-RMN.

La espectroscopía <sup>1</sup>H-RMN permite precisar la posición y la relación de las tasas de sustitución de los diferentes grupos sobre los 3 hidroxilos reaccionables en C-2 y C-3,4 de las unidades osídicas del dextrano de partida. La tabla 3, a continuación, indica la posición de sustituciones X e Y sobre A por análisis RMN en el ejemplo del dextrano del tipo CM-D-S.

TABLA 3

Polímero	ds			Posiciones de grupos expresados en ds				peso molecular
				X		Y		
	X	Y	OH	C2	C3 + C4	C2	C3 + C4	
CMDS	0,50±0,4	1,20±0,4	1,30±0,4	0,35	0,15	0,52	0,68	67000±5000

d.s.: grado de sustitución para cada grupo por unidad de glucosa (A). X= CM: CH<sub>2</sub>COONa; Y= SO<sub>3</sub>Na.  
 OH: representa el número de grupo OH que no ha reaccionado por monómero A.  
 d.s. se calcula a partir de grupos hidroxilo residuales que no han sido sustituidos (el número OH libre de partida es de 3 por monómero de glucosa A. (n= 3).  
 C3 + C4: sustitución global en las posiciones C-3 + C-4, calculado para X, Y y OH libre como la diferencia entre el d.s. total y el d.s. determinado en posición C-2.

### III. Comparación con la técnica anterior

#### III.1 - O-sulfonación por el ácido clorosulfónico. Reacción con ClSO<sub>3</sub>H

Se añadieron 5 g de carboximetil-dextrano (24,27 mmol, un equivalente por unidad de glucosa) en 162 mL de diclorometano. Se obtuvo una mezcla heterogénea. La mezcla se agitó fuertemente con el fin de obtener una suspensión homogénea del producto en diclorometano.

Se añadieron lentamente a la mezcla 1,6 mL de ácido clorosulfónico (24,27 mmol, un equivalente por unidad de glucosa). El medio de reacción se mantuvo bajo agitación durante 2 horas. A lo largo de la reacción, se formaron aglomerados de productos de un color marrón. La mezcla se filtró (sobre vidrio frito n° 4) y el producto recuperado

## ES 2 292 851 T3

se lavó 2 veces con 100 mL de diclorometano, 3 veces con 100 mL de una mezcla diclorometano/dioxano (1:1) y una última vez con 100 mL de dioxano. El producto obtenido se disolvió en 200 mL de agua destilada y la solución se llevó a pH 9,5 por adición de sosa 2M luego a pH 7 por adición de HCl 0,05 mol/L.

5 La solución se filtró, se concentró y se precipitó con 500 mL de metanol. El precipitado así obtenido se secó luego en una estufa, antes de ser purificado.

Se efectuaron tres manipulaciones independientes según este protocolo:

10 Una con un equivalente de ácido clorosulfónico a temperatura ambiente.

Una con dos equivalentes de ácido clorosulfónico a temperatura ambiente.

15 Una con dos equivalentes de ácido clorosulfónico a 4°C.

### III.2 - *Reacción con complejos SO<sub>3</sub>-amina o amida*

20 Los protocolos detallados a continuación se realizaron utilizando diferentes complejos a base de SO<sub>3</sub>: SO<sub>3</sub>-piridina, SO<sub>3</sub>-trimetilamina, SO<sub>3</sub>-trietilamina y SO<sub>3</sub>-DMF (dimetilformamida).

La Tabla 4, a continuación, indica las características estructurales y biológicas de los productos obtenidos por O-sulfonación de un CMD (d.s. C= 0,56) por los diferentes complejos de SO<sub>3</sub>.

25 En un matraz de fondo redondo de 500 mL, se disolvieron 5 g de carboximetil-dextrano (24,27 mmol, un equivalente por unidad de glucosa) en 50 mL de formamida. Para favorecer la disolución del carboximetil-dextrano, la temperatura del medio de reacción se llevó hasta aproximadamente 50°C. Una vez disuelto el producto, la solución se llevó a temperatura ambiente. Por cada reacción efectuada, se preparó independientemente una disolución que contenía cada uno de los complejos descritos en la Tabla 4 siguiente en 50 mL de formamida y se añadió a la disolución de carboximetil-dextrano bajo agitación. La reacción se desarrolló durante 2 h a temperatura ambiente.

30 La reacción se paró al añadir 2l de agua destilada a 4°C. Se mezcló y se llevó el pH del medio hasta 7,5-8 con ayuda de una disolución de NaOH 2M.

35 Después de la eliminación del exceso de agua por evaporación con el rotavapor a presión reducida el producto se purificó por ultrafiltración tangencial seguida de una liofilización. Se obtuvieron 6 g de producto en forma de un polvo blanco.

Se efectuaron cuatro manipulaciones independientes según este protocolo:

40 Una con dos equivalentes de complejo SO<sub>3</sub>-piridina a temperatura ambiente.

Una con dos equivalentes de complejo SO<sub>3</sub>-trimetilamina a temperatura ambiente.

45 Una con dos equivalentes de complejo SO<sub>3</sub>-trietilamina a temperatura ambiente.

Una con dos equivalentes de complejo SO<sub>3</sub>-DMF a temperatura ambiente.

50 Por otro lado se realizó una reacción (Tabla 4 línea 8) exactamente según el protocolo descrito en el ejemplo 5 de la patente francesa N° FR 97 15702, en la que la disolución del CMD se obtuvo por la formación de sales de trietilamonio. El SO<sub>3</sub>-piridina en una relación molar compleja de OH libre es igual a 0,4 (lo que corresponde a 2 equivalentes de complejo por unidad de glucosa) se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de polímero. La reacción se hizo en dimetilformamida a temperatura ambiente.

55 La Tabla 4 muestra las características estructurales de varios polímeros del tipo CMDS sintetizados según los diferentes métodos y las restricciones de cada método. El procedimiento según la invención corresponde a las entradas 10 y 11 de la Tabla 4 y las condiciones descritas en el ejemplo N° 1.

60

65

# ES 2 292 851 T3

TABLA 4

	Reactivo de sulfonación	Condiciones de reacción	x	y	Aldehído terminal ( $\mu\text{mol/g}$ )	Actividad ( <i>in vivo</i> )	Toxicidad ( <i>in vivo</i> )
5							
10	1	-	0,56	0,0	1,00	(-)	(-)
	2	1 eq/22 °C	0,41	0,22	12,7	variable	variable
	3	2 eq/22 °C	0,37	0,35	11,0	variable	variable
15	4	2 eq/4 °C	0,51	0,35	4,0	variable	variable
	5	2 eq/22 °C	0,50	0,00	1,9	(+)	(+)
	6	2 eq/22 °C	0,29	0,40	1,6	(+)	(+)
20	7	2 eq/22 °C	0,44	0,17	1,8	(+)	(+)
		piridina					
25	8	2 eq/22 °C	1,00*	0,35	1,9	(-)	(+)
		piridina					
	9	2 eq/22 °C	0,37	0,23	1,5	Nd	Nd
30	10	2 eq/22 °C	0,57	0,62	0,8	(+)	(-)
		DMF/2M2B					
35	11	5 eq/22 °C	0,55	1,15	0,5	(+)	(-)
		DMF/2M2B					
40	Nd= no determinado						
	* el producto de partida en este experimento estaba sustituido en CM a 1 residuo por unidad de glucosa.						

Los diferentes productos del tipo DCS se sintetizaron a partir de un lote único de dextrano carboxilado (Tabla 4, entrada 1) teniendo un grado de sustitución en carboxilato de  $x = 0,56$ . Después de su purificación, los productos se caracterizaron mediante las diferentes técnicas de análisis estructural.

Los resultados de titrimetría muestran que las reacciones de O-sulfonación por ácido clorosulfónico y los complejos de  $\text{SO}_3$ -amida o amina provocan una rotura del enlace éter de los grupos carboxilos injertados (dsC o x) y una degradación de la cadena macromolecular (peso molecular y valoración de los azúcares reductores). Esta rotura es más marcada cuanto más importante es el número de equivalente de reactivo añadido. El descenso de la temperatura del medio de reacción permite limitar esta degradación.

Es de notar que el producto preparado por el complejo  $\text{SO}_3$ - $\text{Et}_3\text{N}$  (Tabla 4, entrada 6) es el producto más sulfonado pero también el que ha sufrido la mayor descarboxilación. La tendencia se confirma con los otros productos.

Las dos últimas entradas de la tabla (entradas 10 y 11) ponen en juego el producto 2M2B que actúa como un captador de ácido con el fin de limitar la degradación de los enlaces éteres de los grupos carboxilatos injertados y de la cadena macromolecular y la degradación de la cadena.

Conviene constatar que en presencia del producto 2M2B el dsC del producto obtenido después de sulfonación es idéntico al dsC precursor. Esto se verifica cualquiera que sea la cantidad de reactivo añadido. En efecto, con 2,5 veces más de complejo  $\text{SO}_3$ -DMF (entrada 11), se obtiene un dsS superior pero sobre todo el dsC no cambia. La eficacia del protocolo en presencia de 2M2B por lo tanto se demuestra.

## ES 2 292 851 T3

Mientras que para las otras técnicas de O-sulfonación ya conocidas, hay descarboxilación y degradación de la cadena macromolecular, la técnica de O-sulfonación en presencia del producto 2M2B permite resolver el problema de la pérdida de los grupos carboxilatos injetados sobre el dextrano.

5 Las medidas de actividades *in vivo* así como las de toxicidades *in vivo* se realizaron sobre modelos de regeneración musculares del músculo Extensor Digitorum Longus de la pata trasera de la rata adulta después de aplastamiento según las condiciones experimentales descritas en GAUTRON J., KEDZIA C., HUSMANN I. AND BARRITAU D. "Accélération de la régénération de un muscle squelettique de rat adulte par des dérivés de dextranses" C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie (1995), 318: 671-676. La regeneración se cuantificó sobre los cortes histológicos por medidas del número de fibras musculares regeneradas. La toxicidad se midió mediante una disminución de la formación de fibras (comparadas con los testigos injetados por una solución de suero fisiológico) así como por el análisis del aspecto de la regeneración y la evidencia de zonas anormales de regeneración o la formación de zonas inflamatorias que muestran una degeneración del tejido muscular.

15

### IV - Generalización del procedimiento por otros tipos de polímeros

La Tabla 5 muestra la síntesis de varios polímeros de fórmula AaXxYy, en la que A es un azúcar y a es superior a 1 por el procedimiento de la invención y sus características analíticas.

20

TABLA 5

25

	Producto de partida <sub>dsc</sub>	Escala	dsS	dsC	Aldehído terminal (μmol/g)
30	1 Dextrano (D)	2 g	1,19	-	0,15 μmol/g
	2 D	2 g	1,24	-	0,15 μmol/g
35	3 CM <sub>50</sub> -D	2 g	1,22	0,5	0,20 μmol/g
	4 CM <sub>50</sub> -Celulosa (C)	2 g	1,23	0,5	0,20 μmol/g
40	5 CM <sub>50</sub> -D	10 g	1,17	0,5	0,20 μmol/g
	6 CM <sub>50</sub> -C	10 g	1,22	0,5	0,20 μmol/g
	7 CM <sub>60</sub> -B <sub>60</sub> -D	50 g	1,24	0,5	0,20 μmol/g
45	8 CM <sub>60</sub> -B <sub>20</sub> -C	10 g	1,23	0,6	0,05 μmol/g
	9 CM <sub>60</sub> -PhA <sub>60</sub> -D	10 g	1,23	0,6	0,05 μmol/g
50	10 CM <sub>60</sub> -PhA <sub>60</sub> -C	10 g	1,22	0,6	0,05 μmol/g

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de sulfonación de compuesto que presenta una o varias funciones hidroxilos libres y/o una o varias funciones aminas primarias o secundarias sustituidas o no, **caracterizado** porque comprende el tratamiento de dicho compuesto con el complejo SO<sub>3</sub>-DMF en presencia de un captador de ácido, elegido entre el grupo que comprende los alquenos o alquinos de punto de ebullición inferior a 100°C o una de sus mezclas.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el captador de ácido se elige entre el grupo que comprende 2-metil-2-buteno (2M2B), 2-metil-propeno, 2-metil-penteno o sus isómeros, o una de sus mezclas.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

15 a) la disolución o la preparación de una solución homogénea del compuesto a sulfonatar en un disolvente o un co-disolvente anhidro, como la dimetilformamida (DMF) o un co-disolvente compuesto de formamida y de dimetilformamida.

20 b) la adición a temperatura ambiente (20-22°C) de un exceso molar de un captador de ácido, como el 2-metil-2-buteno, miscible en el co-disolvente.

c) la adición rápida del complejo SO<sub>3</sub>-DMF bajo agitación,

25 d) la agitación de la mezcla obtenida en la etapa precedente durante una o dos horas a una temperatura controlada e inferior a 30°C,

e) la parada de la reacción por adición progresiva de la mezcla sobre una disolución alcalina, por ejemplo una solución al 2% de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) u otra base, con un control de pH nunca inferior a 4 con el fin de obtener las sales del compuesto a sulfonatar.

30 4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque comprende la purificación del compuesto sulfonataado obtenido en la etapa (e).

35 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 ó 4, **caracterizado** porque comprende antes de la etapa (a), la protonación de dicho compuesto con el fin de favorecer su disolución durante la etapa (a).

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el compuesto a sulfonatar se elige entre el grupo que comprende los monómeros, los oligómeros y los polímeros.

40 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el compuesto a sulfonatar es un polímero de fórmula:



45 en la que, A es un monómero; X representa un grupo RCOOR'; Y representa un grupo O o N-sulfonato fijado sobre A y que responde a una de las fórmulas siguientes ROSO3R', RNSO3R'; los grupos R son cadenas hidrocarbonadas alifáticas, opcionalmente ramificadas y/o insaturadas y que pueden contener uno o varios ciclos aromáticos con la excepción de la bencilamina y de la bencilamina-sulfonato; R' representa un átomo de hidrógeno o un catión; a representa el número de monómeros; x representa la tasa o grado de sustitución de los monómeros A con grupos X; y representa la tasa o grado de sustitución de los monómeros A con grupos Y.

50 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 ó 7, **caracterizado** porque el polímero es un derivado del dextrano o un copolímero de ácidos málicos.

55 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 ó 8, **caracterizado** porque el polímero comprende los enlaces entre los monómeros o entre los monómeros y sus sustituyentes realizados por funciones inestables en medio ácido, principalmente las funciones éster, amida, éter, acetal.

60

65

FIG. 1

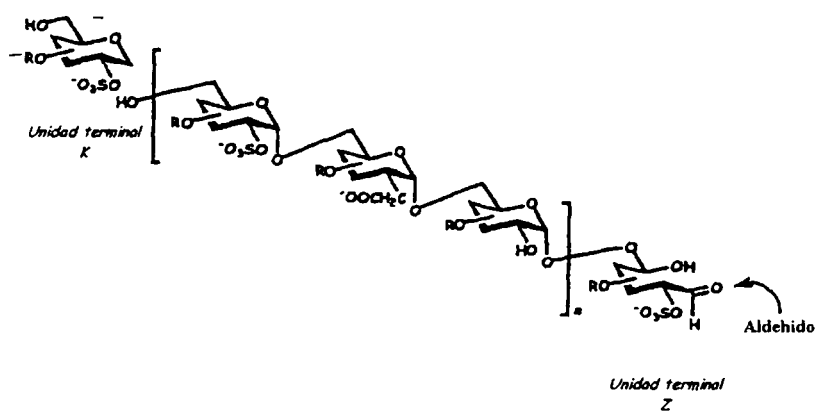


FIG. 2

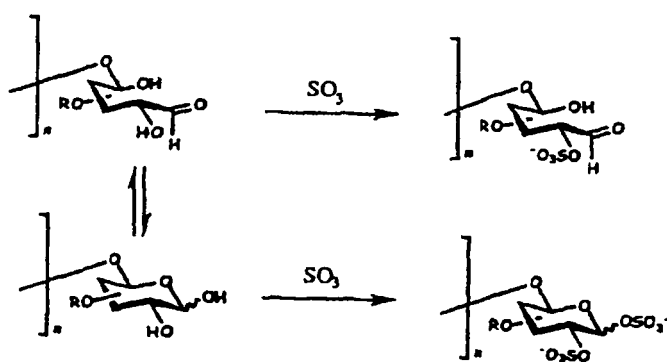


FIG. 3

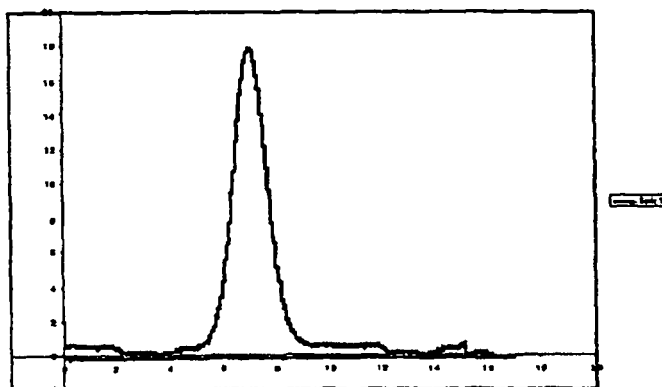


FIG. 4

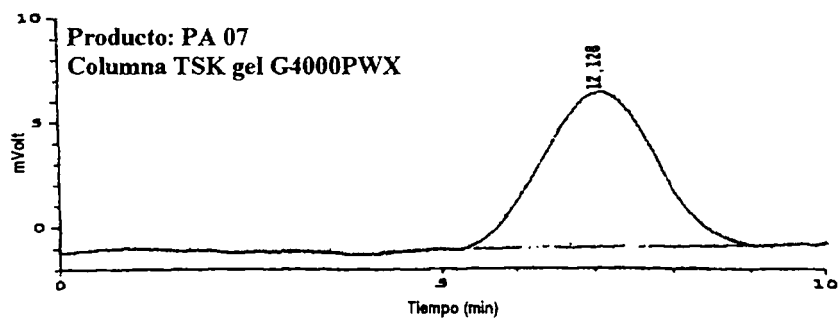
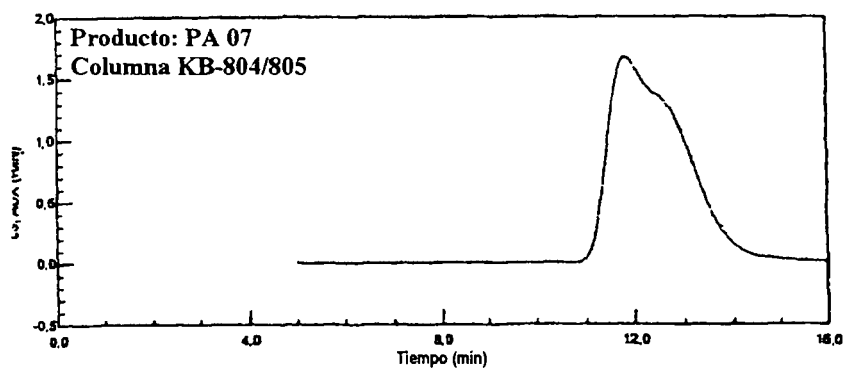


FIG. 5

