



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

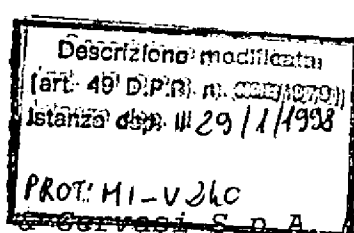
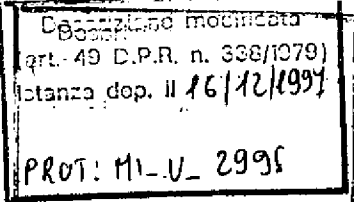
UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900573584
Data Deposito	07/02/1997
Data Pubblicazione	07/08/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Titolo

POLISACCARIDI BATTERICI O-SOLFATATI



INA.021

Notarbartolo & C. S.p.A.

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

Polisaccaridi batterici O-solfatati.

a nome: INALCO S.p.A.

MI 97A 0252

con sede in: MILANO

Inventori designati : ZOPPETTI Giorgio, ORESTE Pasqua, CIPOLLETTI

Giovanni

Depositata il

con il N.

7 FEB. 1997

** * * * *

Tecnica anteriore

Sono noti i polisaccaridi batterici identificati come K4, K5 e K40, costituiti da sequenze ripetitive di acido D-glucuronico ed amminozuccheri. Essi sono ottenuti secondo tecniche note mediante fermentazione di ceppi diversi di E. coli come descritto in varie pubblicazioni (Manzoni M., Bergomi S., F. e Cavazzoni V. Biotechnology Letters 18(4) 383-386 (1996); B. Rodríguez M.R. et al., Eur. J. Biochem., 177 (1988) 117-124; e Dengler T. et al., Carb. Res., 150 (1986) 233-240).

Sono inoltre noti processi di O-solfatazione studiati per altri polisaccaridi come ad esempio per l'eparina dopo completa desolfatazione.

Detti processi prevedono un trattamento preliminare atto a rimuovere dal polisaccaride il suo controione naturale (sodio normalmente) per sostituirlo con tributilammonio idrossido (Ogamo et al Carb. Res. 193 (1989) 165-172) oppure con piridina (Rej et al., Carb. Res. 210 (1991) 299-310) allo scopo di rendere

solubile il polisaccaride stesso in solventi come la dimetilformammide o il dimetilsolfossido.

Detti processi richiedono numerosi stadi tra i quali anche un costoso stadio di liofilizzazione. Inoltre presentano vari inconvenienti come ad esempio il raddoppio in peso dovuto al controione.

Sommario

Noi abbiamo trovato che è possibile ottenere i polisaccaridi K4, K5 e K40 O-solfatati mediante un processo in cui detti polisaccaridi in forma di sali di sodio vengono solfatati direttamente in una sospensione in un solvente organico.

Il processo secondo la presente invenzione comprende i seguenti stadi:

- a) sospensione del polisaccaride in forma di sale di sodio in un solvente aprotico,
- b) O-solfatazione con un addotto di piridina-solfo triossido o di trimetilammina-solfo triossido o con acido clorosolfonico;
- c) diluizione con acqua;
- d) correzione del pH sino ad un valore basico;
- e) precipitazione mediante aggiunta di etanolo saturato con acetato di sodio;
- f) dissoluzione con una soluzione di NaCl;
- g) diafiltrazione;
- h) precipitazione del prodotto con alcoli come etanolo o metanolo o isopropanolo o con acetone;

i) essiccamento.

Con il processo secondo la presente invenzione si ottengono polisaccardi aventi peso molecolare da 4.000 a 35.000 e rapporto solfati/carbossili da 0,5 a 4,0;

I polisaccaridi O-solfatati secondo la presente invenzione presentano una interessante attività antiangiogenetica ed antivirale oltre che anticoagulante. Inoltre sono efficaci in cosmetica nella prevenzione della caduta dei capelli.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Le caratteristiche ed i vantaggi del processo per la preparazione di polisaccaridi batterici O-solfatati e dei prodotti ottenuti operando secondo la presente invenzione saranno maggiormente illustrati nel corso della seguente descrizione dettagliata.

Nella presente invenzione il materiale di partenza è costituito dai polisaccaridi batterici ottenibili da E. Coli definiti rispettivamente come K4, K5 e K40.

Il polisaccaride K5 è costituito da acido D-glucuronico e da N-acetil glucosammina uniti con legame α 1-4. Il legame tra i disaccaridi è β 1-4. Il polisaccaride K4 è costituito da acido D-glucuronico e da N-acetil galattosammina uniti con legame β 1-3. Il legame tra i disaccaridi è β 1-4. Il polisaccaride K4 contiene anche un'unità di D-fruttosio legata con legame β 2-3 all'acido D-glucuronico. Il polisaccaride K40 è costituito da trisaccaridi formati da acido D-glucuronico unito ad una N-acetilglucosammina con legame α 1-4 legata a sua volta ad un'altra N-

acetilglucosammina con legame α 1-6. Il legame tra i trisaccaridi è di tipo β 1-4. Il polisaccaride K40 contiene anche un'unità di serina legata al carbossile dell'acido glucuronico.

Nel processo secondo la presente invenzione detti polisaccaridi, in forma di sali di sodio, vengono addizionati a temperatura ambiente con un solvente aprotico per formare una sospensione. Detto solvente è preferibilmente scelto dal gruppo costituito da dimetilformammide, dimetilacetammide e dimetilsolfossido. Possono essere impiegate anche miscele di questi solventi. La quantità di solvente impiegato è compresa fra 10 e 80 parti in peso rispetto al polisaccaride.

Per la reazione di O-solfatazione, alla sospensione ottenuta viene aggiunta una soluzione costituita da una quantità compresa fra 10 e 50 parti in peso rispetto a detto polisaccaride, dello stesso solvente impiegato per preparare detta sospensione, e da una quantità compresa fra 0,5 e 20 parti in peso rispetto a detto polisaccaride, di un addotto di piridina-solfo triossido di trimetilammina-solfo triossido o con acido clorosolfonico.

La reazione viene condotta sotto agitazione a temperatura compresa fra 0 e 70°C, e preferibilmente fra 15 e 35°C, per un tempo compreso fra 2 e 24 ore.

Quando il tempo di reazione è terminato, la sospensione ottenuta viene diluita con un volume eguale di acqua oppure di soluzioni di NaCl da 0,1 a 1 N e poi il pH viene portato ad un valore compreso fra 7,5 e 8,5 mediante aggiunta di una soluzione acquosa

di NaOH al 3-6% in peso.

Il prodotto viene precipitato mediante aggiunta di 1.5-3 volumi di etanolo saturato con acetato di sodio e mantenendo la miscela a temperatura di 3-5°C per 12-15 ore. Il precipitato ottenuto viene sciolto in 100 parti in peso di una soluzione 2N di sodio cloruro e la soluzione viene diafiltrata con 10 volumi di acqua distillata impiegando una cartuccia di dialisi cut-off 3000 con sistema millipore TFF.

Il prodotto viene precipitato mediante aggiunta di 2-4 volumi di etanolo e poi viene essiccato a temperatura di 60°C, a pressione ridotta.

Quando si desidera ottenere un prodotto con caratteristiche di attività anti HIV il polisaccaride K4 di partenza viene preliminarmente defruttosilato ad esempio con il metodo descritto da B. Rodriguez M.R. et al. (Eur. J. Biochem., 177 (1988), 117-124).

I polisaccaridi O-solfatati secondo la presente invenzione vengono analizzati mediante titolazione conduttimetrica, spettroscopia ^{13}C -NMR e ^1H -NMR ed HPLC. In particolare, il loro peso molecolare viene determinato mediante HPLC.

I polisaccaridi O-solfatati secondo la presente invenzione sono caratterizzati da un peso molecolare compreso fra 4.000 e 35.000 e da un rapporto solfati/carbossili da 0,5 a 4,0.

I composti secondo la presente invenzione presentano una buona attività antiangiogenetica per cui possono essere utilizzati nel

controllo della crescita tumorale e della formazione di metastasi.

Essi presentano inoltre una buona attività anticoagulante. Infine...
i composti maggiormente solfatati (solfati/disaccaride > 2,5)
e nel caso del K⁴ defruttosilato presentano una interessante
attività anti HIV-1.

Grazie a queste caratteristiche essi possono essere impiegati con
successo nella terapia umana.

I composti secondo la presente invenzione, oltre che a scopo
terapeutico per le indicazioni soprariportate, possono essere
impiegati anche in campo cosmetico con la funzione di coadiuvanti
nella prevenzione della caduta dei capelli.

Per i previsti impieghi terapeutici o cosmetici i derivati
ottenibili in accordo con il processo dell'invenzione vengono
formulati secondo tecniche convenzionali in adatte forme di
somministrazione quali ad esempio soluzioni sterili, forme di
dosaggio topiche e, in generale, in tutte quelle forme fino ad
oggi proposte per derivati di tipo polisaccaridico o di
glicosamminoglicani.

In particolare per l'impiego terapeutico a scopo
antiangiogenetico, anticoagulante ed anti HIV-1 le dosi efficaci
sono comprese fra 0.1 e 10 mg/kg/giorno.

USA è necessario fornire questi dati).

A scopo illustrativo dell'invenzione vengono riportati i seguenti
esempi.

ESEMPIO 1: O-solfatazione del polisaccaride K4.

1 g di K4 sale di sodio ottenuto per fermentazione (come descritto da Manzoni, M., Bergomi, S Molinari, F., & Cavazzoni, V (1996) Production and purification of an extracellularly produced K4 polysaccharide from Escherichia coli. Biotechnology Letters, 18, 383-386) viene sospeso in 60 ml di dimetilformammide anidra a temperatura ambiente e vengono poi aggiunti 40 ml di dimetilformammide anidra contenente 15,3 g di addotto piridina-solfo triossido. La sospensione ottenuta viene mantenuta a temperatura ambiente, sotto agitazione, per 18 ore e quindi diluita con un ugual volume di acqua. Il pH viene portato a 9 con NaOH al 4% e il prodotto viene precipitato con 2 volumi di etanolo saturato con acetato di sodio mantenendo la soluzione a 4°C per 12 ore. Il precipitato ottenuto viene sciolto in 100 ml di sodio cloruro 2 N e diafiltrato con 10 volumi di acqua distillata utilizzando una cartuccia da dialisi cut-off 3000 con sistema millipore TFF.

Il prodotto viene infine precipitato con 3 volumi di etanolo ed essiccato a temperatura di 60°C a pressione ridotta.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto solfati/carbossili di 3 e peso molecolare medio di 28.000 d.

ESEMPIO 2: O-solfatazione del polisaccaride K4 defruttosilato.

1 g di K4 sale di sodio viene defruttosilato come descritto da B. Rodriguez M.R. et al. e poi trattato come descritto nell'esempio 1.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto solfati/carbossili di 1,2 e peso molecolare medio di 35.000 d.

ESEMPIO 3: O-solfatazione del polisaccaride K5.

1 g di K5 sale di sodio ottenuto per fermentazione come descritto da Manzoni M. et al. viene trattato come nell'esempio 1.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto solfati/carbossili di 3,5 e peso molecolare medio di 11.000 d.

ESEMPIO 4: O-solfatazione del polisaccaride K40.

1 g di K40 sale di sodio ottenuto per fermentazione come descritto da Dengler T. ed al. viene trattato come nell'esempio 1.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto solfati/carbossili di 3 e peso molecolare medio di 32.000 d.

ESEMPIO 5: O-solfatazione del K5 con acido clorosolfonico

1 g di K5 sale di sodio ottenuto per fermentazione come descritto da Manzoni M. et al viene essiccato a 60°C a pressione ridotta per 24 ore e disciolto tramite lenta agitazione in 30 ml di una miscela di acido solforico-acido clorosolfonico nel rapporto di 2 a 1 preparata precedentemente e mantenuta a -4 °C. La miscela viene lasciata per 60 minuti sotto agitazione a -4 °C e per altri 60 minuti a temperatura ambiente. Si recupera il prodotto neutralizzando con NaOH 5N controllando la temperatura con bagno refrigerato. La soluzione viene quindi desalata utilizzando una cartuccia da dialisi cut-off 3000 con sistema millipore TFF. Il prodotto viene infine precipitato con 3 volumi di etanolo ed

INA.021

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

essiccato.

Il prodotto ottenuto presenta un rapporto solfati/carbossili di
3.3 ed un peso molecolare medio di 4.000 d.

RIVENDICAZIONI

1. Processo per la preparazione di polisaccaridi K4, K5 e K40 O-solfatati comprendente i seguenti stadi:
 - a) sospensione del polisaccaride K4, K5 o K40 in forma di sale di sodio in un solvente aprotico;
 - b) O-solfatazione con un addotto di piridina-solfo triossido o di trimetilammina-solfo triossido o con acido clorosolfonico;
 - c) diluizione con acqua o con NaCl 0.2- 1N;
 - d) correzione del pH sino ad un valore basico;
 - e) precipitazione mediante aggiunta di etanolo saturato con acetato di sodio oppure di metanolo, isopropanolo o acetone;
 - f) dissoluzione con una soluzione di NaCl;
 - g) diafiltrazione;
 - h) precipitazione del prodotto con etanolo;
 - i) essiccamento.
2. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto solvente aprotico impiegato nello stadio a) è scelto dal gruppo costituito da dimetilformammide, dimetilacetammide e dimetilsolfossido.
3. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta O-solfatazione è condotta impiegando una quantità di addotto piridina-solfo triossido o trimetilammina-solfo triossido o di acido clorosolfonico compresa fra 0.5 e 20 parti in peso rispetto a detto polisaccaride, disciolto in quantità compresa fra 10 e 50

- parti in peso rispetto a detto polisaccaride dello stesso solvente impiegato nello stadio a).
4. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta O-solfatazione è condotta a temperatura compresa fra 0 e 70°C per un tempo compreso fra 2 e 24 ore.
 5. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta correzione del pH dello stadio d) è condotta con una soluzione acquosa di NaOH al 2-6% in peso fino a raggiungere un pH compreso fra 7,5 e 8,5.
 6. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta precipitazione dello stadio e) è condotta con 1,5-3 volumi di etanolo o metanolo o isopropanolo o acetone saturato con acetato di sodio e mantenendo la miscela a temperatura di 3-5°C per 12-15 ore.
 7. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il polisaccaride K4 di partenza viene preliminarmente defruttosilato.
 8. Polisaccaridi K4, K5 e K40 O-solfatati caratterizzati da peso molecolare compreso fra 4.000 e 35.000, e rapporto solfati/carbossili da 0,5 a 4.
 9. Polisaccaridi K4, K5 e K40 O-solfatati ottenuti con il processo secondo le rivendicazioni da 1 a 7.
 10. Metodo terapeutico per il controllo di patologie tumorali, da HIV-1 e della coagulazione in cui vengono somministrate dosi

comprese fra 0,1 e 10 mg/kg/giorno di polisaccaridi K4, K5 e K40 O-solfatati secondo la rivendicazione 8.

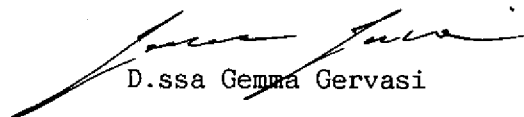
11. Impiego di polisaccaridi K4, K5 e K40 O-solfatati secondo la rivendicazione 8 per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento di patologie tumorali, da HIV-1 e della coagulazione.
12. Impiego di polisaccaridi K4, K5 e K40 O-solfatati secondo la rivendicazione 8 per la preparazione di composizioni cosmetiche.

(PIC/ub)

Milano, li 07.02.1997

p. INALCO S.p.A.

Il Mandatario


D.ssa Gemma Gervasi

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

