



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015032849-0 B1



(22) Data do Depósito: 02/07/2014

(45) Data de Concessão: 14/09/2021

(54) Título: POLISSACARÍDEO DE SULFATO DE ÁCIDO POLIGULÔNICO OU SAL DE GRAU FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO, MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO MESMO E COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA

(51) Int.Cl.: C08B 37/04; A61K 31/734; A61K 31/737; A61P 35/00; A61P 35/04.

(30) Prioridade Unionista: 02/07/2013 CN 201310275323.7.

(73) Titular(es): SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES.

(72) Inventor(es): JIAN DING; JING AI; YI CHEN; XUN HUANG.

(86) Pedido PCT: PCT CN2014081472 de 02/07/2014

(87) Publicação PCT: WO 2015/000411 de 08/01/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/12/2015

(57) Resumo: POLISSACARÍDEO DE ÁCIDO POLIGULÔNICO SULFATADO OU SAL DE GRAU FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO DO MESMO, são descritos polissacarídeo de ácido poligulônico sulfatado ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, processo de preparação e uso do mesmo no preparo de inibidores do crescimento tumoral e/ou metástases. O sulfato de ácido poligulônico ou seu sal farmaceuticamente aceitável da presente invenção pode ser utilizado no preparo de um ou mais inibidores do crescimento tumoral, inibidores da angiogênese, inibidores da heparanase, inibidores da enzima C-Met, inibidores da polimerização de microtúbulos, inibidores da atividade do fator de despolimerização da actina e/ou inibidores da agregação da actina.

“POLISSACARÍDEO DE SULFATO DE ÁCIDO POLIGULÔNICO OU SAL DE GRAU FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO, MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO MESMO E COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção pertence ao campo da medicina. Em particular, a presente invenção diz respeito a um sulfato de ácido poligulônico ou a um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, assim como o método de preparação de inibidores de crescimento de tumores/ou metástases.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Tumores representam uma séria ameaça à vida e saúde humanas. Tumores malignos tornaram-se a causa de morte número um entre residentes urbanos e a causa de morte número dois entre residentes rurais, ocupando o primeiro lugar no ranking de mortalidade por várias doenças. A metástase de tumores é um sinal de malignidade; as metástases e a recorrência de tumores malignos são a principal causa de insucesso no tratamento. Portanto, descobrir drogas antitumorais capazes de inibir o crescimento tumoral e a formação de metástases é o foco atual das atenções.

[003] De acordo com os estudos mais recentes, sacarídeos não são apenas uma classe de constituições estruturais importantes e fontes de energia, mas também possuem importantes funções biológicas. Eles estão envolvidos no reconhecimento célula-célula e sinalização e são considerados como uma classe de importantes moléculas de sinalização além dos ácidos nucleicos no organismo. Além disso, visto que muitas vezes eles são fatores-chave para o reconhecimento de sinais nas superfícies celulares, reações antígeno-anticorpo, transdução e detecção de sinais celulares, cresce cada vez mais o interesse pelas pesquisas de polissacarídeos ativos com atividades biológicas. Porém, devido à estrutura complexa e às dificuldades na separação e caracterização estrutural de sacarídeos, até o momento, apenas polissacarídeos de *Coriolus versicolor*, polissacarídeos de *Polyporus*, polissacarídeos de cogumelos, polissacarídeos de esquizofilano,

polissacarídeos de *Poria cocos* e similares têm sido usados para fins clínicos. Existe a necessidade na técnica de se obter mais tipos de polissacarídeos com atividades biológicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] Apesar das dificuldades na resolução estrutural e preparo de carboidratos e do problema de baixa atividade de açúcares naturais, para não falar do problema prático de grave incidência de tumores e dificuldades de tratamento, o inventor da presente invenção realizou-a com base em estudos tanto extensivos como intensivos. O inventor realizou a presente invenção reagindo o ácido poligulurônico com um agente sulfonante em uma temperatura adequada e durante um período de tempo adequado para produzir um derivado sulfatado de ácido oligo-gulurônico, e então adicionando um agente redutor, obtendo desse modo um sulfato de ácido poligulônico (doravante denominado no presente relatório de “PGAS”).

[005] É, portanto, um objetivo da presente invenção prover um sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. O sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo de acordo com a presente invenção tem um significativo efeito inibidor do crescimento tumoral e da formação de metástases, e o mecanismo de ação é associado com sua habilidade de inibir a atividade da heparanase, atividade da enzima C-Met, angiogênese, polimerização dos microtúbulos, fatores de despolimerização da actina e similares. De preferência, a presente invenção provê um sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em que as unidades de ácido L-gulurônico são conectadas uma à outra através da ligação 1,4-glicosídica com um grupo hidroxila localizado na posição 1 da extremidade redutora e os anéis do açúcar são completamente sulfatados nas posições C-2.

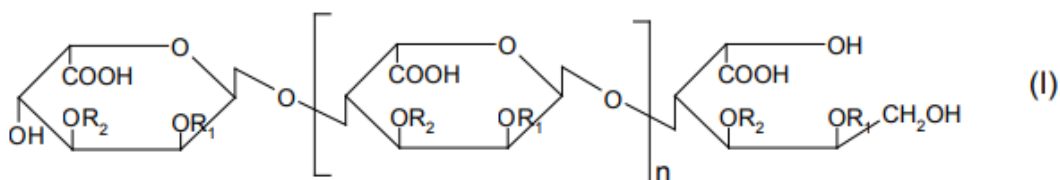
[006] É outro objetivo da presente invenção prover um processo de preparação do sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. É ainda outro objetivo da presente invenção prover o uso do sulfato de ácido

poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo no preparo de inibidores do crescimento de tumores e/ou formação de metástases.

[007] É ainda outro objetivo da presente invenção prover uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do sulfato de ácido poligulônico ou de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo de acordo com a presente invenção.

[008] É ainda outro objetivo da presente invenção prover um método de tratamento de tumores.

[009] De acordo com um aspecto da presente invenção, é provido um sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo tendo uma estrutura da seguinte fórmula geral (I);



em que n representa 0 ou um número inteiro de 1-23, R_1 é SO_3H , R_2 , independente um do outro, é H ou SO_3H , desde que o grau de sulfatação calculado como o teor de enxofre do sulfato de ácido poligulônico seja desde 5 a 20% em peso.

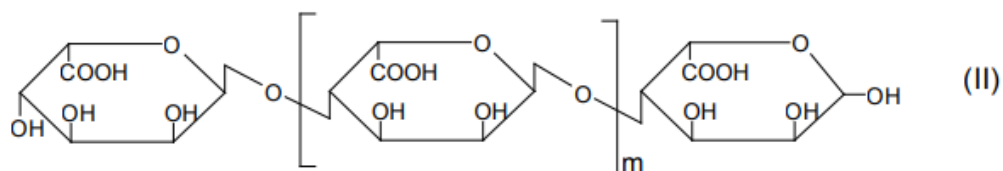
[010] No sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo representado pela fórmula geral (I) da presente invenção, o ácido poligulônico é formado a partir de ácidos L-gulurônicos mediante a ligação 1,4-glicosídica com um grupo hidroxila localizado na posição 1 da extremidade redutora, os anéis do açúcar sendo completamente sulfatados na posição C-2 e parcialmente sulfatados na posição C-3.

[011] Na fórmula geral (I) acima, n é 0 ou um número inteiro de 1-23, por exemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23; de preferência, n é um número inteiro de 2-13, mais preferivelmente, n é 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, e mais preferivelmente ainda, n é 4, 5, 6, 7 ou 8. De

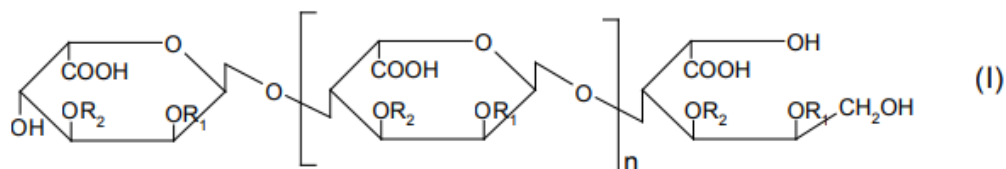
preferência, o teor de enxofre é de 7-15 % em peso, mais preferivelmente 9-13 % em peso. De acordo com a presente invenção, os melhores efeitos biológicos são obtidos usando desde tetrassacarídeos a dodecassacarídeos (especialmente, desde hexassacarídeos a decassacarídeos) e/ou quando o teor de enxofre for de 7-15% em peso (especialmente, 9-13 % em peso), provavelmente porque esses polissacarídeos são mais facilmente reconhecidos e aceitos pelas células do corpo.

[012] De acordo com a presente invenção, os sais farmacêuticamente aceitáveis dos sulfatos de ácido poligulônico podem ser sais de, por exemplo, sódio, potássio, cálcio ou magnésio desses compostos, preferindo-se os sais de sódio. Os sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser preparados por métodos convencionais.

[013] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é provido um processo de preparo do sulfato de ácido poligulônico ou de sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, compreendendo fazer reagir o ácido poligulônico conforme demonstrado na seguinte fórmula estrutural (II) com um reagente sulfonante, seguido de redução mediante um agente redutor, para produzir o sulfato de ácido poligulônico conforme demonstra a fórmula geral (I):



na fórmula (II), m representa 0 ou um número inteiro de 1-48;



na formula geral (I), n, R1 e R2 são conforme definido acima.

[014] De acordo com a presente invenção, de preferência, o reagente sulfonante pode ser ácido clorossulfônico; de preferência, a temperatura de sulfonação pode estar entre 45 e 85°C, mais preferivelmente, entre 60 e 75°C, e o tempo de reação pode ser de 1,5 - 4,5 horas, mais preferivelmente, 2 - 3,5 horas, e mais preferivelmente ainda, 3 horas; de preferência, o agente redutor é borohidreto de sódio, cianoborohidreto de sódio, reagentes de níquel-hidreto, agentes redutores à base de halogênio ou similares.

[015] De acordo com ainda outro aspecto da presente invenção, é provido o uso do sulfato de ácido poligulônico ou de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo no preparo de inibidores do crescimento de tumores e/ou formação de metástases.

[016] De acordo com a presente invenção, o termo “tumores” refere-se a qualquer forma de tumores, inclusive malignidades, e pode ser, por exemplo, câncer de fígado, câncer de estômago, câncer colorretal, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de pâncreas, câncer de rim, câncer de bexiga, câncer de próstata, melanoma, câncer de cérebro e semelhantes.

[017] De acordo com a presente invenção, o sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo pode ser, de preferência, usado como inibidor do crescimento tumoral, inibidor de metástases tumorais, inibidor da angiogênese, inibidor da heparanase, inibidor da enzima C-Met, inibidor da polimerização de microtúbulos, inibidor da atividade dos fatores de despolimerização da actina e/ou inibidor da agregação da actina.

[018] De acordo com ainda outro aspecto da presente invenção, é provida uma composição farmacêutica, compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do sulfato de ácido poligulônico ou de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. De preferência, o componente ativo da composição farmacêutica consiste em um ou mais de um sulfato de ácido poligulônico ou sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Em uma concretização da presente invenção, além do sulfato de ácido poligulônico ou do sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, a composição farmacêutica da

presente invenção pode compreender uma ou mais drogas antitumorais ou drogas antitumorais adjuvantes como componente ativo.

[019] De acordo com a presente invenção, a composição farmacêutica pode ainda compreender um veículo farmaceuticamente aceitável. O veículo farmaceuticamente aceitável pode ser qualquer um comumente utilizado no estado da técnica.

[020] De acordo com a presente invenção, a composição farmacêutica pode ser utilizada como inibidor do crescimento tumoral.

[021] De acordo com a presente invenção, de preferência, a composição farmacêutica pode ser utilizada como inibidor de metástases tumorais.

[022] Além disso, de preferência, a composição farmacêutica pode ser utilizada como inibidor da angiogênese, inibidor da heparanase, inibidor da enzima C-Met, inibidor da polimerização de microtúbulos, inibidor da atividade dos fatores de despolimerização da actina e/ou inibidor da agregação da actina.

[023] De acordo com ainda outro aspecto da presente invenção, é provido o método de tratamento de tumores, compreendendo os seguintes passos: administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do sulfato de ácido poligulônico ou de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo a um indivíduo que necessita de tratamento.

[024] De acordo com a presente invenção, o termo “quantidade eficaz” pode referir-se a uma quantidade eficaz em dosagens e por períodos de tempo necessários para atingir o resultado desejado. A dita quantidade eficaz pode variar de acordo com tais fatores como tipo de doença, sintomas da doença tratada, estrutura de um órgão-alvo específico a ser tratado, tamanho do indivíduo ou gravidade da doença ou condição. A quantidade eficaz de um composto específico pode ser determinada empiricamente pelos especialistas na área sem experimentação indevida.

[025] Diante do exposto acima, é de grande importância que o sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo da presente invenção seja usado no preparo de um medicamento para tratamento de

tumores e metástases tumorais, a fim de resolver o problema atual de falta de medicamentos eficazes para tratamento de tumores.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[026] A Figura 1 demonstra o resultado de separação por coluna para os respectivos componentes do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção.

A Figura 2 demonstra o efeito inibidor do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção no crescimento de xenotransplantes ortotópicos MDA-MB-435 do câncer de mama humano.

A Figura 3 demonstra o efeito inibidor do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção em metástases de pulmão xenotransplantes ortotópicos do câncer de mama humano MDA-MB-435. O Painel A demonstra uma imagem típica (ampliação: 200x) de metástase no pulmão por coloração H&E; O Painel B é uma vista quantitativa do efeito inibidor do PGAS na metástase de pulmão de xenotransplantes ortotópicos MDA-MB-435. Os dados da Figura são expressos como média \pm DP em um experimento típico. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, grupo de tratamento vs. grupo de controle.

A Figura 4 demonstra o efeito inibidor da angiogênese do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção nos xenotransplantes ortotópicos MDA-MB-435 do câncer de mama humano. O Painel A demonstra uma imagem típica de coloração de CD31, com setas apontando para a coloração positiva (ampliação: 200x) (no Painel A: "C" é o grupo de controle, "P" é o grupo de tratamento com o PGAS); O Painel B é uma vista quantitativa do efeito inibidor da angiogênese do PGAS nos xenotransplantes ortotópicos MDA-MB-435 do câncer de mama humano. Os dados da Figura são expressos como média \pm DP em um experimento. ** $P < 0,01$, grupo de tratamento vs. grupo de controle.

A Figura 5 demonstra o efeito inibidor do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção na metástase de pulmão experimental das células B16F10 de melanoma murino. O Painel A demonstra uma imagem típica de metástases no pulmão; O Painel B é uma vista quantitativa do efeito inibidor do PGAS na

metástase de pulmão experimental de B16F10. Os dados da Figura são expressos como média \pm DP em um experimento típico. Os resultados semelhantes podem ser obtidos de, no mínimo, dois experimentos independentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, grupo de tratamento vs. grupo de controle.

A Figura 6 demonstra o efeito inibidor do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção na neovascularização da membrana embrionária corioalantóica de galinha (CAM). O Painel A demonstra o grupo de controle de dissolvente; O Painel B demonstra o grupo de PGAS de 200 $\mu\text{g}/\text{ovo}$; O Painel C demonstra o grupo de PGAS 400 $\mu\text{g}/\text{ovo}$; Painel D demonstra o grupo de PGAS de 800 $\mu\text{g}/\text{ovo}$ (ampliação: 40x).

A Figura 7 demonstra o efeito inibidor do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção na atividade da heparanase. O Painel A demonstra o espectro de HPLC indicando a inibição da atividade da heparanase pelo sulfato de ácido poligulônico da presente invenção; O Painel B demonstra a taxa de inibição da atividade da heparanase pelo sulfato de ácido poligulônico da presente invenção, calculada a partir dos resultados do espectro do Painel A acima.

A Figura 8 demonstra o efeito inibidor do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção na polimerização da tubulina em um sistema isento de células. O Painel A demonstra a dependência do tempo e o Painel B demonstra a dependência da dose.

A Figura 9 demonstra o efeito inibidor do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção na despolimerização da actina em um sistema isento de células.

A Figura 10 demonstra o efeito inibidor do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção na despolimerização da actina/atividade de clivagem do fator de despolimerização da actina.

****P<0,01, grupo de Cofilin vs. grupo de controle; **P<0,01, grupo médico vs. grupo de Cofilin.**

A Figura 11 demonstra a atividade inibidora de metástases tumorais dos respectivos componentes do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[027] A presente invenção será descrita a seguir em mais detalhes por meio de modalidades. Porém, as modalidades seguintes são fornecidas apenas para fins ilustrativos sem limitar o escopo da presente invenção.

Materiais e reagentes

[028] Ácido poligulurônico adquirido de Lan Tai Pharmaceuticals Co.Ltd da Universidade Ocean da China, com peso molecular médio de 10000 Da em relação ao dextrano. Formamida, ácido clorossulfônico, etc. foram fornecidos pelo Grupo Sinopharm Chemical Reagent Company, grau A.R.. Dextrano com peso molecular padrão foi adquirido da Zhejiang Haimen Pharmaceutical Factory, Zhejiang, grau medicinal, (1996) No. 135501, teor: 10MG/tubo de ensaio, solvente: salino normal, formulação: diluído até a concentração desejada com solução salina normal antes de cada administração. Coluna de gel TSK gel 2000SWXL, TSK gel G3000SWXL disponibilizada pela TOSOH Company of Japan; Bio-Gel-P6, Bio-Gel-P10, adquiridos da Bio-Rad Company; Sephadex G-10, Sepharose CL-4B, adquiridos da Pharmacia Company; tubulina, actina, adquiridos da SIGMA Company.

Instrumentos

[029] Espectrômetro infravermelho inteligente NEXUS-470 de NICOLET Company; Espectrômetro DPX-300 NMR de Bruker Company; Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) de Beijing Longzhida Co., Ltd.; UV-2102 Espectrofotômetro de UV-Visível de Unocal Corporation, US. Animais de Laboratório [0039] Camundongos nus BALB/cA, 18-22 g, fornecidos pelo Instituto de Materiais Médicos de Xangai, Academia Chinesa de Ciências;

camundongos C57BL/6, 6-7 semanas, fornecidos pelo Centro de Animais de Xangai, Academia Chinesa de Ciências; ovos frescos foram adquiridos da Granja Shanghai Shenbao.

Exemplo 1: Preparo do sulfato de ácido poligulônico (PGAS)

[030] 3 ml de ácido clorossulfônico foram adicionados gota a gota a 10 ml de formamida, mantendo a temperatura abaixo de 5° C. Após 20 minutos de reação, 1 g de ácido poligulurônico foi adicionado e reagido a uma temperatura de 65-70°C durante 3 horas. Dois volumes de solução de etanol a 80% foram adicionados ao produto da reação e agitados repetidamente para obter uma substância viscosa. Uma solução de etanol a 80% adicional foi adicionada e os passos acima foram repetidos duas vezes. A solução foi decantada e a água foi adicionada para obter uma substância viscosa. A substância viscosa foi ajustada com a solução de Na₂CO₃ a 1% até pH de 7,0 e submetida à precipitação com álcool com 2 volumes de solução de etanol a 95%. O precipitado resultante foi secado a uma temperatura de 50-60°C para produzir um derivado sulfatado do ácido poligulurônico. O derivado foi formulado em uma solução de acetato de sódio de 4mg/ml (pH 7,0) e à solução foi adicionado borohidreto de sódio até 50mM. A reação foi conduzida a uma temperatura de 30-40°C durante 30 minutos e terminada em um banho de gelo. O pH foi ajustado com o ácido acético 0,1M, o borohidreto de sódio que não tinha reagido foi liberado e o pH foi ajustado para neutro. A solução resultante foi precipitada repetidamente, lavada com etanol e secada, obtendo-se um produto bruto do sulfato de ácido poligulônico (PGAS). O PGAS bruto foi formulado em uma solução a 10% e submetido à precipitação com a solução de etanol a 95%. O precipitado resultante foi lavado com etanol absoluto, secado e formulado em uma solução a 5%. A solução foi filtrada com uma membrana de 3µm para remover impurezas e dessalgada na coluna Sephadex G-10 (15x100 cm) com água como fase móvel e usando a coleta de frações. Os eluados foram detectados com o método de ácido sulfúrico e carbazol, e os componentes contendo o açúcar foram combinados, concentrados sob pressão

reduzida, dessalgados e liofilizados, obtendo-se o sulfato de ácido poligulônico refinado.

[031] O teor de enxofre do sulfato de ácido poligulônico conforme preparado acima foi determinado com o método de combustão no frasco de oxigênio. Uma amostra de cerca de 25mg foi colhida, pesada com precisão e submetida à destruição dos compostos orgânicos seguindo o método de combustão no frasco de oxigênio. Um frasco de combustão de 1000 ml foi usado; 0,1ml de solução concentrada de peróxido de hidrogênio e 10 ml de água foram usados como líquido absorvente. Uma vez que a fumaça gerada foi completamente absorvida, a substância resultante foi colocada e mantida em banho de gelo durante 15 minutos, aquecida até a ebulição suave durante 2 minutos, resfriada, adicionando-se 50 ml de tampão de acetato de amônia – etanol (pH 3,7), 30 ml de etanol e 0,3 ml de solução de alizarina a 0,1% como indicador, e titulada para vermelho alaranjado claro com a solução de titulação de perclorato de bário (0,05 mol/L). 1 ml da solução de titulação de perclorato de bário (0,05 mol/L) é equivalente a 1,603 mg de S. Os resultados do teste demonstram que, com base no produto seco, o teor de enxofre do sulfato de ácido poligulônico é de 11,2% em peso.

Exemplo 2: Caracterização estrutural do sulfato de ácido poligulônico (PGAS)

[032] A caracterização estrutural foi realizada com os componentes sacarídeos na fração resultante do preparo do sulfato de ácido poligulônico acima.

1. Espectro de absorção UV.

[033] O sulfato de ácido poligulônico acima foi diluído até uma concentração adequada e escaneada, tendo água destilada como o branco, entre 190 nm-400 nm com o espectrofotômetro de UV visível UV-2102. Verificou-se que a fração não tinha um pico de absorção específico na região ultravioleta, indicando uma ligação dupla não conjugada na estrutura. Porém, havia uma absorção não específica a 190-200 nm.

2. Espectroscopia infravermelha.

[034] 0,5 mg de PGAS foram preparados, obtendo-se pastilhas de KBr; a espectroscopia infravermelha foi realizada com o espectrômetro infravermelho inteligente NEXUS-470. Constatou-se que a vibração de estiramento simétrica dos grupos hidroxila estava presente a 3219.53 cm^{-1} , a vibração de estiramento simétrica dos grupos carbonila estava presente a 1612.58 cm^{-1} , a vibração do tipo tesoura dos grupos carboxila estava presente a 1414.33 cm^{-1} , a vibração de estiramento simétrica das ligações carbono-oxigênio nos grupos carboxila estava presente a 1103.97 cm^{-1} , o pico de vibração de estiramento de C-O-S estava presente a 823.30 cm^{-1} , e o pico de vibração de estiramento de S=O no sulfato após sulfatação estava presente a 1274.62 cm^{-1} , o que indica que o composto tem a estrutura central contendo grupos carboxila, hidroxila e sulfônico.

3. Espectroscopia de RMN do PGAS.

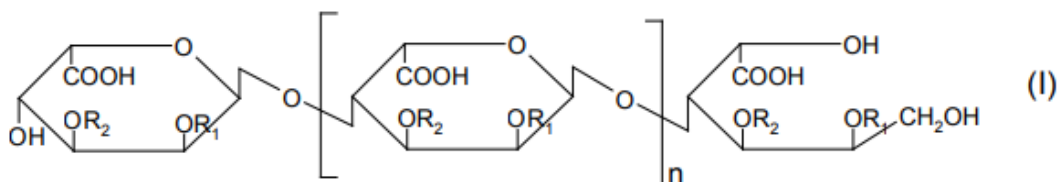
[035] A espectroscopia de RMN (^{13}C -RMN) do PGAS foi determinada com o espectrômetro Bruker Avance DPX-300 NMR. Verificou-se que, no espectro, os picos de sinais de C-2 não sulfonados não foram vistos enquanto os picos de sinais de C-3 não sulfonados ainda existiam, o que indica que os grupos hidroxila na posição C-2 são relativamente sulfatados, sendo que os grupos hidroxila na posição C-3 são sulfatados apenas parcialmente.

4. Peso molecular e distribuição de peso molecular do PGAS.

[036] O peso molecular do PGAS foi determinado com o método de GPC. A detecção foi realizada usando o Detector de Índice de Refração com dextrano da Fluka Company como peso molecular padrão, coluna de TSK gel 2000SWXL como coluna cromatográfica e uma solução aquosa contendo azida de sódio a 0,2% e Na_2SO_4 a 2,84% como fase móvel, a uma taxa de fluxo de $0,5\text{ ml/min.}$, temperatura de 35° C e volume de injeção de $25\text{ }\mu\text{l}$. Verificou-se que o peso molecular médio do PGAS com relação ao dextrano foi de 2513 Da, e os resultados de determinação de múltiplos lotes de amostras demonstraram que o seu peso molecular médio com relação ao dextrano foi de 1500-8500 Da.

[037] Esses resultados em conjunto confirmam que a fração acima é o sulfato

de ácido poligulônico que tem um grupo hidroxila na posição 1 na extremidade redutora do ácido poligulurônico e é completamente sulfatado na posição C-2 e parcialmente sulfatado na posição C-3, tendo a seguinte fórmula (I):



em que n , R_1 and R_2 são conforme definido acima.

Exemplo 3: Separação e preparo dos componentes do PGAS

[038] Uma amostra do PGAS preparado conforme descrito acima foi colhida, formulada em uma solução a 5%, filtrada com uma membrana de 3 μ m para remover impurezas, e separada na coluna de gel Bio-Gel-P6 (1,6×180 cm), com 0,2 mol/L de NH_4HCO_3 como fase móvel, e as frações foram coletadas. Os eluados foram detectados com o método de ácido sulfúrico-carbazol, os componentes contendo açúcar foram coletados e os componentes do volume de vazios foram adicionalmente separados na coluna de gel Bio-Gel-P10 (1,6×180 cm). Os produtos resultantes foram liofilizados para produzir uma série de componentes sacarídeos do PGAS, os quais foram identificados por espectrometria de massa. Os resultados confirmam a produção dos di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa-, nona-, deca-, undeca e mais sacarídeos de PGAS.

[039] Nos experimentos abaixo, os Exemplos 4-11 usam o produto preparado no Exemplo 1 enquanto os Exemplos 12 e 13 usam os produtos preparados no Exemplo 3.

Exemplo 4: Avaliação da eficácia da inibição do crescimento tumoral do sulfato de ácido poligulônico (PGAS)

[040] As células de câncer de mama humano MDA-MB-435 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, USA) em uma fase de crescimento

exponencial a uma concentração de $2,5 \times 10^7$ células/ml foram inoculadas na segunda almofada de gordura mamária esquerda de camundongos nus, fêmeas (BALB/cA fornecidos pelo Instituto de Materiais Médicos de Xangai, Academia Chinesa de Ciências). Quando os tumores cresceram até o tamanho de $100-200 \text{ mm}^3$, os animais foram uniformemente divididos de acordo com o volume tumoral em grupo de controle negativo, grupo de tratamento com injeção de doxorubicina (Adriamicina, ADM) (grupo de controle positivo) e grupos de tratamento com 5 mg/kg e 20 mg/kg de PGAS (grupos experimentais de PGAS), 20 camundongos por grupo. Os grupos experimentais de PGAS e o grupo de controle positivo receberam a dose uma vez por semana via injeção intravenosa durante 7 semanas contínuas e o grupo de controle negativo recebeu a dose igual de uma solução salina normal. Nos experimentos, o calibrador vernier foi usado para medir o diâmetro dos tumores duas vezes por semana, e o volume tumoral (V) foi calculado pela fórmula abaixo: $V = 1/2 \times a \times b^2$ em que a e b representam o comprimento e a largura dos tumores, respectivamente. O volume tumoral relativo (VTR) foi calculado com base nos resultados medidos, usando a fórmula de cálculo: $VTR_t = V_t / V_0$; em que V_0 é o volume tumoral medido quando os animais foram divididos de acordo com as diferentes dosagens (ou seja, d0), e V_t é o volume tumoral no dia da medição. O indicador de avaliação farmacodinâmica da atividade antitumoral é a taxa de proliferação tumoral relativa T/C (%), cuja fórmula de cálculo é conforme segue: $T/C (\%) = TRTV: VTR \text{ do grupo de tratamento}; CVTR: VTR \text{ do grupo de controle negativo}$. Avaliação da Eficácia: T/C % >60% significa ineficaz; T/C % ≤60% com significância estatística de $P < 0,05$ significa eficaz.

[041] Os animais foram sacrificados 1 semana após a interrupção da administração. Os tecidos pulmonares foram fixados na solução de Bouin (ácido pícrico saturado: formaldeído: ácido acético glacial=75:25:5) por mais de 34 horas e embebidos em etanol absoluto até aparecerem metástases pulmonares como nódulos brancos e os tecidos pulmonares 100% C T RTV

RTV x recuperarem sua cor normal. Os nódulos das metástases pulmonares por pulmão foram observados e a sua quantidade registrada sob um microscópio de dissecação. Uma parte dos tecidos tumorais ortotópicos foi colocada em nitrogênio líquido, armazenada sob congelamento para extração total de ARN e proteína. Uma parte dos pulmões e tecidos tumorais ortotópicos foi fixada em formalina a 10% e a angiogênese nos tecidos tumorais foi determinada pela coloração H&E e imuno-histoquímica.

[042] Verificou-se que, nos dias 15-20 após a inoculação do tumor, os xenoenxertos de câncer de mama humano MDA-MB-435 cresceram até cerca de 100-200 mm³ com 100% de sucesso na inoculação; nas semanas 8-9 após a inoculação, uma grande quantidade de metástases apareceu nos tecidos pulmonares dos camundongos nus portadores de câncer, com a taxa de metástases de 100%. Neste momento, os animais foram sacrificados e submetidos à avaliação do efeito antitumoral. O tratamento com o PGAS foi realizado via injeção intravenosa uma vez por semana durante 7 semanas contínuas. O grupo de tratamento com 5 mg/kg de PGAS demonstrou a capacidade de inibir o crescimento de tumores ortotópicos, mas o efeito inibidor do crescimento tumoral foi insignificante com o valor de T/C de 67,3%; o grupo de tratamento com 20 mg/kg de PGAS demonstrou a capacidade de inibir o crescimento dos xenoenxertos de câncer de mama humano MDA-MB-435 em camundongos nus com o valor de T/C de até 37,6%. O grupo de controle positivo tratado com a droga ADM demonstrou a capacidade de inibir significativamente o crescimento de tumores ortotópicos de câncer de mama humano MDA-MB-435, sendo que o valor de T/C do grupo de tratamento com 5mg/kg de ADM foi de 21,8%. Isso demonstra que o PGAS pode inibir significativamente o crescimento dos xenoenxertos ortotópicos de câncer de mama humano MDA-MB-435 (Figura 2).

[043] No regime de dosagem de 5mg/kg e 20 mg/kg via injeção intravenosa uma vez por semana durante 7 semanas contínuas, as taxas de inibição do PGAS de metástases pulmonares dos xenoenxertos de câncer de mama

humano MDA-MB-435 foram de 60,2% e 88,4%, respectivamente. A taxa de inibição de doxorubicina (5 mg/kg) de metástases pulmonares foi de 89,8%. Isso demonstra que o PGAS pode inibir significativamente as metástases pulmonares dos xenoinxertos ortotópicos de câncer de mama humano MDA-MB-435 (Figura 3). Além disso, o efeito do PGAS na angiogênese in vivo foi avaliado pela coloração imuno-histoquímica. A detecção do marcador específico de células endoteliais CD31 demonstrou que uma grande quantidade de pequenos vasos foi gerada nos xenoinxertos ortotópicos de câncer de mama humano MDA-MB-435. Não houve alteração significativa na quantidade de pequenos vasos nos xenoinxertos no grupo de tratamento com 5 mg/kg de PGAS em comparação com o grupo de controle enquanto houve uma grande redução na quantidade de pequenos vasos nos xenoinxertos no grupo de tratamento com 20 mg/kg de PGAS em comparação com o grupo de controle, com a taxa de inibição de 42,1%. Isso demonstra que o PGAS pode inibir significativamente a angiogênese nos xenoinxertos ortotópicos de câncer de mama humano MDA-MB-435 (Figura 4).

Exemplo 5: Avaliação da eficácia do sulfato de ácido poligulônico (PGAS) na inibição de metástases tumorais.

[044] Camundongos C57BL/6 de 6-7 semanas de idade (fornecidos pelo Centro de Animais de Xangai, Academia Chinesa de Ciências) foram divididos ao acaso em um grupo de controle negativo tratado com a solução normal salina, um grupo de tratamento com 5 mg/kg de PGAS e um grupo de tratamento com 20 mg/kg de PGAS de 10 animais por grupo. Células de melanoma murino B16F10 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, USA) em fase de crescimento exponencial em concentração de 2.5×10^6 células/ml foram inoculadas na veia da cauda dos camundongos. 20 minutos antes da inoculação das células, os grupos PGAS receberam a dose única via injeção intraperitoneal (i.p.) e o grupo de controle negativo recebeu a dose equivalente de solução salina normal. 11 dias mais tarde, os pulmões dos camundongos foram removidos e os tecidos pulmonares foram fixados na solução de Bouin

(ácido pícrico saturado: formaldeído: ácido acético glacial = 75:25:5) por mais de 24 horas. O número de nódulos de metástases pulmonares por pulmão foi observado e registrado sob um microscópio de dissecação. De modo alternativo, tal observação foi realizada após os tecidos pulmonares terem sido ainda embebidos em etanol absoluto durante dois dias até que os tecidos pulmonares recuperassem a cor normal. Verificou-se que, 11 dias após a inoculação, uma grande quantidade de metástases apareceu nos tecidos pulmonares dos camundongos com a taxa de metástases de 100% e, no regime de dosagem de uma única injeção i.p., o grupo de tratamento com 5 mg/kg de PGAS demonstrou inibição significativa de metástases tumorais com taxa de inibição de até 40,81% e o grupo de tratamento com 20 mg/kg de PGAS demonstrou uma inibição mais significativa de metástases pulmonares das células de melanoma B16F10 com taxa de inibição de até 82,20%. Os resultados demonstram que o PGAS pode inibir significativamente as metástases pulmonares das células de melanoma B16F10 (Figura 5).

[045] Além disso, o inventor estudou o mecanismo de ação do PGAS.

Exemplo 6: Teste de inibição da angiogênese pelo PGAS

[046] Ovos frescos (adquiridos da granja Shenbao de Xangai) foram colocados na base da incubadora Roll-X (Lyon Electric Company, CA, USA) a 39°C e umidade de 50% (lado da câmara de gás para cima). Após a incubação contínua durante 7 dias, os ovos foram iluminados para identificar se os embriões de galinha estavam vivos e a posição da membrana corioalantóica foi determinada e marcada. Um pequeno furo foi feito na extremidade do saco de ar dos ovos e o embrião de galinha foi posicionado horizontalmente (a membrana corioalantóica para cima). O saco de ar foi suavemente sugado com a pêra de sucção de borracha para que a membrana corioalantóica desabasse e fosse separada da casca de ovo, deixando-a em repouso durante um determinado período de tempo. Então, uma abertura em forma de janela de 1 cm² foi feita sobre o embrião de galinha; o material da abertura foi recortado

com tesoura e moído, retirando o pó da casca de ovo; a casca de ovo na altura da abertura foi retirada, deixando a membrana corioalantóica claramente visível. As esponjas de gelatina de 0,25 x 0,25 x 0,25 (comprimento x largura x altura) cm³ foram tratadas com o PGAS de 10 µl na concentração final de 200, 400, 800 µg/ovo e um veículo controle e então colocadas suavemente no lugar na membrana corioalantóica sem grandes vasos. A pequena abertura foi selada com fita transparente estéril e os ovos foram incubados durante 48 horas. A fita foi retirada para fins de observação, as fotografias foram tiradas (ampliação: 40x) e o efeito inibidor do PGAS na angiogênese da membrana corioalantóica do embrião de galinha foi avaliada. Constatou-se que (Figura 6) na membrana corioalantóica adjacente à esponja contendo o PGAS, a densidade de vasos foi significativamente reduzida, demonstrando-se a tendência de inibição concentração-dependente. Isso demonstra que o PGAS tem efeito inibidor sobre a angiogênese.

Exemplo 7: Teste de inibição da atividade da heparanase pelo PGAS

[047] O sistema de expressão em células de insetos, isento de soro, e o sistema de purificação na coluna de afinidade da heparanase foram estabelecidos usando o ADNc da heparanase humana obtida da placenta humana mediante a amplificação por PCR e recombinação genética, obtendo-se a heparanase altamente ativa com pureza de 95% ou superior. Adicionaram-se 150 µl do tampão de reação (acetato de sódio 50 mM, pH 4,2), 0,5 µg FITC-HS (heparan sulfato marcado com isotiocianato de fluoresceína) e a heparanase na concentração final de 25 ng/ml assim como o PGAS em várias concentrações, reagindo-os a 37°C durante 3 horas. Após 5 minutos a 100°C, realizou-se a centrifugação a 10000 rpm durante 20 minutos para peletizar os materiais insolúveis. O sobrenadante foi filtrado com a membrana de filtro de 0.45 µm e então injetado na coluna de gel TSK gel G3000SWXL com a carga de 20 µl, usando o tampão de NaCl de 50 mM Tris/150 mM, pH 7.5, e a taxa de fluxo de 8 ml/min. A intensidade de fluorescência do produto de FITC-HS foi detectada com o detector de fluorescência (Ex: 485 nm, Em: 538 nm). A

atividade relativa da enzima foi avaliada pela redução da metade da área dianteira do pico intacto de FITC-HS, a fim de determinar o efeito do PGAS sobre a atividade da heparanase. Constatou-se que o PGAS inibe a atividade da heparanase de maneira dose-dependente com o IC₅₀ de 6,55 ng/ml, e quando a dose é igual a 40 ng/ml, a atividade é melhor do que a da heparina do controle positivo (Figura 7).

Exemplo 8: Teste de inibição da atividade da enzima C-Met pelo PGAS

[048] O substrato da reação enzimática Poly (Glu, Tyr) foi revestido em uma placa de microtitulação; a solução de ATP e a solução do sulfato de ácido poligulônico e enzima c-Met em concentrações adequadas foram adicionadas e colocadas em um agitador para reagir a 37°C durante 1 hora. Então, o anticorpo PY99 diluído em T-PBS contendo 5 mg/ml de BSA foi adicionado e reagido no agitador a 37°C durante 0.5 horas. Além disso, o IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase de rábano foi adicionado e reagido no agitador a 37°C durante 0,5 hora adicional. Finalmente, a solução reveladora OPD de 2 mg/ml foi adicionada, reagida a 25°C no escuro durante 1-10 minutos, e H₂SO₄ 2M foi adicionado para terminar a reação. A absorbância a 490 nm foi medida pelo leitor de microplacas e a taxa de inibição da atividade enzimática foi calculada: Taxa de Inibição (%) = $\frac{\text{Valor OD do composto} - \text{valor OD do poço de controle sem enzima}}{\text{Valor OD do poço de controle sem enzima}} \times 100$.

[049] Constatou-se que a taxa de inibição da atividade enzimática pelo sulfato de ácido poligulônico em uma concentração de 10 µg/ml em c-Met foi de 71,1%, indicando que o sulfato de ácido poligulônico possui efeito inibidor sobre a atividade da enzima c-Met.

Exemplo 9: Teste de polimerização da tubulina pelo PGAS.

[050] 10 µl de PGAS em várias concentrações foram adicionados a uma placa de 96 poços e pré-aquecidos a 37°C durante 10 minutos. O pó liofilizado de tubulina foi diluído no tampão PEM (100 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) mais 1 mM GTP, glicerina a 5% para se obter a concentração de 12 µM. 90 µl

dessa solução foram adicionados à placa de 96 poços e o leitor de microplaca foi ligado, a temperatura foi ajustada para 37°C e o comprimento de onda de detecção foi ajustado para 340 nm. A solução foi cuidadosamente misturada e a leitura foi feita uma vez por minuto durante 30 minutos contínuos. Os resultados demonstram que o PGAS pode inibir significativamente a polimerização da tubulina no sistema isento de células e quando a concentração de PGAS aumentou de 2,5 µM para 40 µM, a taxa de inibição aumentou de 18,26% para 73,44%, demonstrando que é dose dependente, com IC50 de 8,58 µM (Figura 8).

Exemplo 10: Inibição da polimerização da actina pelo PGAS

[051] A actina marcada com pirenilo foi adicionada ao tampão de agregação (100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,5), e incubada a 37°C durante 30 minutos de modo a ser agregada às fibrilas. Então, o tampão de despolimerização da actina (10 mM Tris-HCl, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP, pH 8,0) e o PGAS em diferentes concentrações foram adicionados para diluição e despolimerização. O leitor de microplaca de fluorescência foi ajustado para a onda de emissão de 360 nm e a onda de absorção de 410 nm a 37°C. Tudo foi cuidadosamente misturado e a leitura foi feita uma vez por minuto durante 30 minutos contínuos. Os resultados demonstram que o PGAS pode inibir significativamente o processo de despolimerização da actina no sistema isento de células de maneira dose-dependente (IC50 é de 10,6 µM) (Figura 9).

Exemplo 11: Inibição da despolimerização da actina/ atividade de clivagem da cofilina pelo PGAS

[052] O sulfato de ácido poligulônico foi usado junto com Sepharose CL-4B para preparar uma coluna de cromatografia de afinidade do sulfato de ácido poligulônico. Usando essa coluna de cromatografia, as proteínas ligantes do sulfato de ácido poligulônico na linha de células de câncer de pulmão A549 foram extraídas e separadas. Constatou-se mediante a identificação espectrométrica que a cofilina é uma das proteínas que se liga fortemente ao

sulfato de ácido poligulônico. Os estudos adicionais demonstraram que o sulfato de ácido poligulônico pode inibir significativamente a despolimerização da atina /atividade de clivagem da cofilina (Figura 10). Isso indica que o sulfato de ácido poligulônico pode se ligar à cofilina para inibir a despolimerização da atina /atividade de clivagem da cofilina, inibindo desse modo a migração de células tumorais.

Exemplo 12: Determinação da atividade dos componentes sacarídeos do PGAS

[053] Testou-se a atividade antitumoral dos componentes sacarídeos do PGAS preparados de acordo com a Modalidade 3. Constatou-se que os componentes desde tetrassacarídeos a dodessacarídeos (correspondentes aos com n igual a 2-10 na fórmula geral (I)) do PGAS em uma dose inferior a 15 mg/kg, administrada por via intravenosa, têm o valor T/C de 30% ou inferior com relação ao crescimento dos xenoinxertos ortotópicos de câncer de mama humano MDA-MB-435 em camundongos nus, e a taxa de inibição de 95% ou superior em relação a suas metástases pulmonares; os componentes desde hexassacarídeos a decassacarídeos (na formula geral (i), $n = 4-8$) em uma dose inferior a 10 mg/kg têm o valor de T/C de 30% ou inferior em relação ao crescimento dos xenoinxertos ortotópicos de câncer de mama humano MDA-MB-435 em camundongos nus e a taxa de inibição de 95% ou superior em relação a suas metástases pulmonares. Os resultados são melhores quando o teor de enxofre é de 7-15% em peso e os melhores quando o teor de enxofre é de 9-13 em peso.

Exemplo 13: Determinação da atividade inibidora dos componentes sacarídeos do PGAS contra metástases tumorais

[054] O efeito dos diferentes componentes sacarídeos do PGAS separados no Exemplo 3 sobre metástases tumorais foi detectado com o ensaio de invasão celular Transwell. A tripsina é utilizada para digerir as células de câncer de mama MDA-MB-435 que são cultivadas in vitro em uma fase de crescimento exponencial e, em seguida, lavadas três vezes com a cultura livre de soro e

diluídas até $2 \times 10^6/\text{ml}$. 100 μl da diluição celular foram adicionados às câmaras superiores dos poços na célula Transwell, 600 μl da cultura contendo FBS a 10% foram adicionados às câmaras inferiores e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de diferentes componentes do PGAS foram adicionados a ambas as câmaras, superiores e inferiores. Após a incubação das células em um incubador contendo CO_2 a 5% a 37°C durante 12 horas, o meio da cultura foi retirado e as células foram fixadas em uma solução de etanol a 90% durante 30 minutos. As células foram coloridas com uma solução violeta cristal a 0,1% (ácido bórico 0,1M, violeta cristal a 0,1% (p/v), etanol a 2%) à temperatura ambiente durante 10 minutos, enxaguadas com água limpa e limpas com cotonetes de algodão para retirar as células não migradas na camada superior. As células foram observadas, fotografadas e registradas sob um microscópio. Finalmente, a extração foi feita com a solução de ácido acético a 10% a 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ durante 10 minutos, os valores de OD foram determinados a 595 nm e as taxas de inibição da migração dos diferentes componentes sacarídeos em relação às células de câncer de mama foram calculadas.

Taxa de Inibição da Migração (%) = $(1 - \text{OD}_{\text{tratamento}} / \text{OD}_{\text{controle}}) \times 100\%$

[055] Verificou-se que as células MDA-MB-435 no grupo de controle podem migrar livremente a partir das câmaras inferiores durante 12 horas ao longo do gradiente de concentração de FBS. Como pode ser visto dos resultados fotográficos de coloração cristal violeta, os diferentes componentes sacarídeos do PGAS, desde tetrassacarídeos (na fórmula geral I, $n=2$) a undecassacarídeos (na fórmula geral I, $n = 9$) e polisacarídeos maiores, podem inibir a migração de células tumorais enquanto o componente dissacarídeo (na fórmula geral I, $n=0$) e o componente trissacarídeo (na fórmula geral I, $n=1$) tem taxas de inibição inferiores (Figura 11), indicando que vários componentes do PGAS (especialmente, de tetrassacarídeos a undecassacarídeos e policomponentes maiores) têm efeito inibidor sobre metástases e células tumorais.

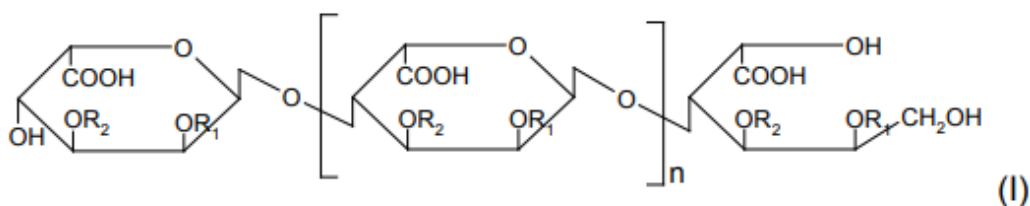
Processamento estatístico

[056] Os dados acima foram submetidos à análise estatística com o programa Statview e os resultados foram expressos como “Valores Médios \pm EP”, usando a ANOVA para comparação.

[057] De acordo com os resultados farmacológicos acima, uma composição farmacêutica pode ser preparada usando os meios de formulação convencionais, misturando uma quantidade eficaz do sulfato de ácido poligulônico da presente invenção com um veículo farmacêutico. A composição farmacêutica pode ser utilizada como droga para tratamento de tumores e droga para tratamento de metástases tumorais, assim como pode ser usada como inibidor da angiogênese, inibidor da heparanase, inibidor da enzima C-Met, inibidor da polimerização de microtúbulos e inibidor da despolimerização da actina. O uso do sulfato de ácido poligulônico de acordo com a presente invenção no preparo de medicamentos é de grande importância para tratamento de tumores e metástases tumorais.

REIVINDICAÇÕES

1. Sulfato de ácido poligulônico ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, tendo uma estrutura da seguinte fórmula geral (I):



em que, n representa 0 ou um número inteiro de 1-23;

R1 é SO₃H;

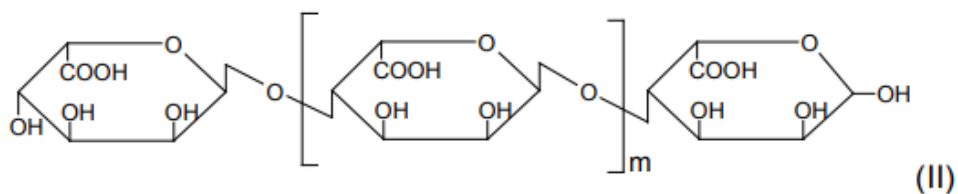
R2, independente um do outro, representa H ou SO₃H, desde que o grau de sulfatação calculado como o teor de enxofre do sulfato de ácido poligulônico seja de 5 a 20% em peso;

em que a unidade de ácido L-gulurônico está ligada por ligações 1,4-glicosídicas entre si, com um hidroxil localizado na posição 1 da extremidade redutora e os anéis de açúcar completamente sulfatados na posição C-2.

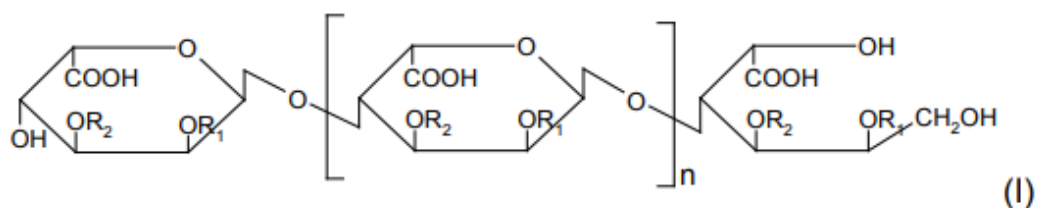
2. Sulfato de ácido poligulônico ou seu sal farmaceuticamente aceitável, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que na fórmula geral (I), n é um número inteiro de 2-13, de preferência 3, 4, 5, 6, 7 ou 8.

3. Sulfato de ácido poligulônico ou seu sal farmaceuticamente aceitável de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** teor de enxofre é de 9-13% em peso.

4. Método para preparar o sulfato de ácido poligulônico ou seu sal farmaceuticamente aceitável, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de compreender a reação do ácido poligulurônico conforme demonstrado na seguinte fórmula estrutural (II) com um reagente de sulfonação, seguida de redução por um agente redutor para obter o sulfato de ácido poligulônico demonstrado na fórmula geral (I).



na fórmula estrutural (II), m representa 0 ou um número inteiro de 1-48;



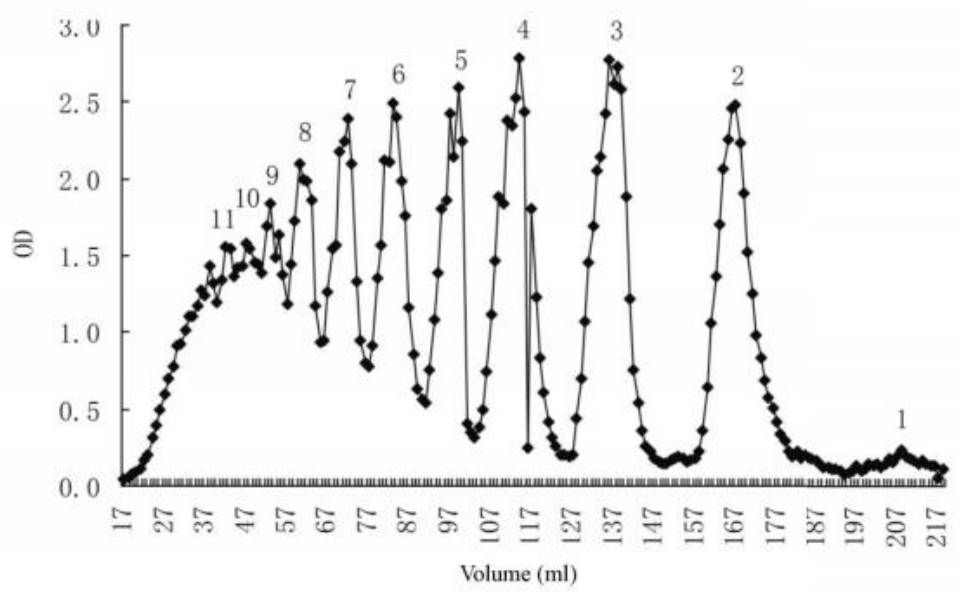
em que, n representa 0 ou um número inteiro de 1-23,

R1 é SO₃H,

R2, independente um do outro, representa H ou SO₃H.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que o reagente de sulfonação é ácido clorossulfônico; a temperatura de sulfonação está na faixa de 60-75 ° C; o tempo de reação está na faixa de 3 horas; e / ou, o agente de redução é selecionado a partir do grupo que consiste em boro-hidreto de sódio, cianoboro-hidreto de sódio, reagentes de hidreto de níquel e agentes de redução à base de halogênio.

6. Composição farmacêutica, **caracterizada pelo** fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do sulfato de ácido poligulônico ou seu sal farmaceuticamente aceitável como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

**FIGURA 1**

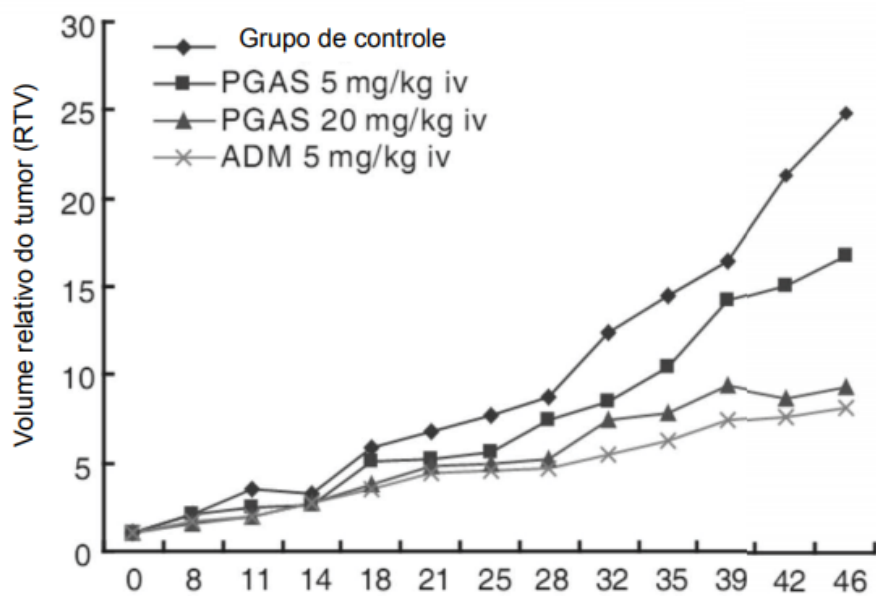
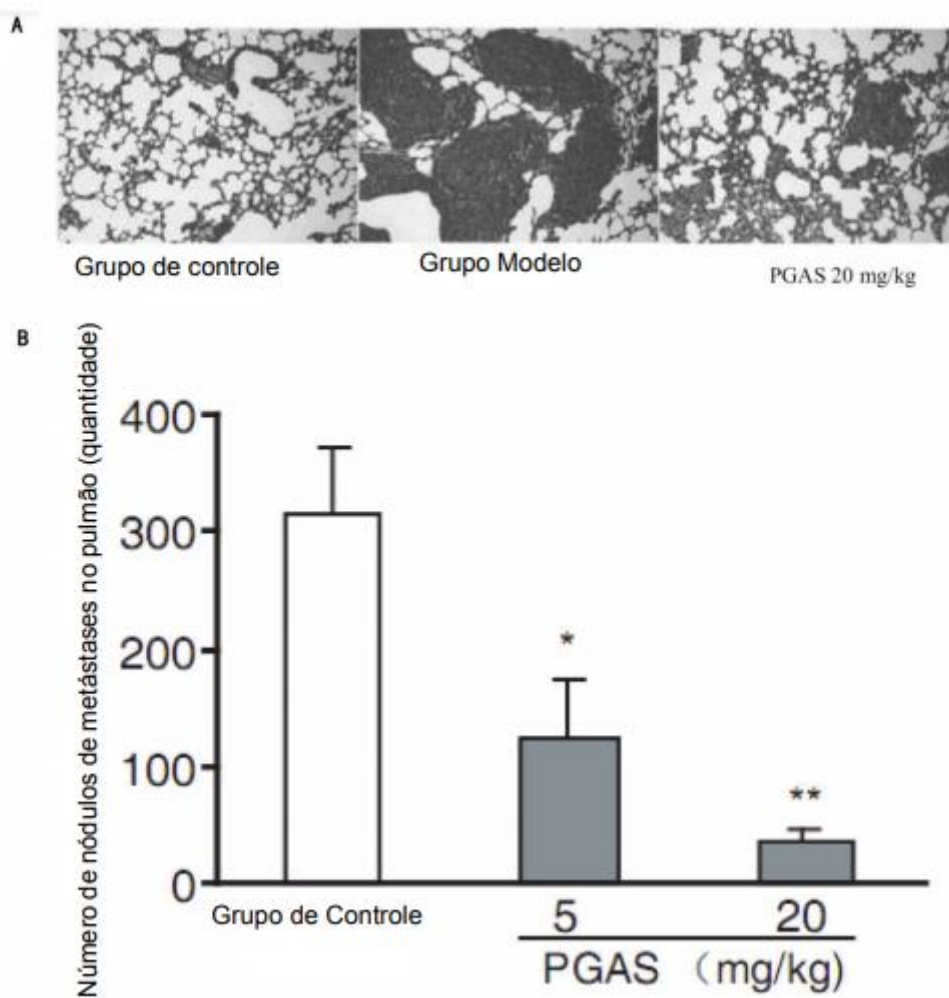
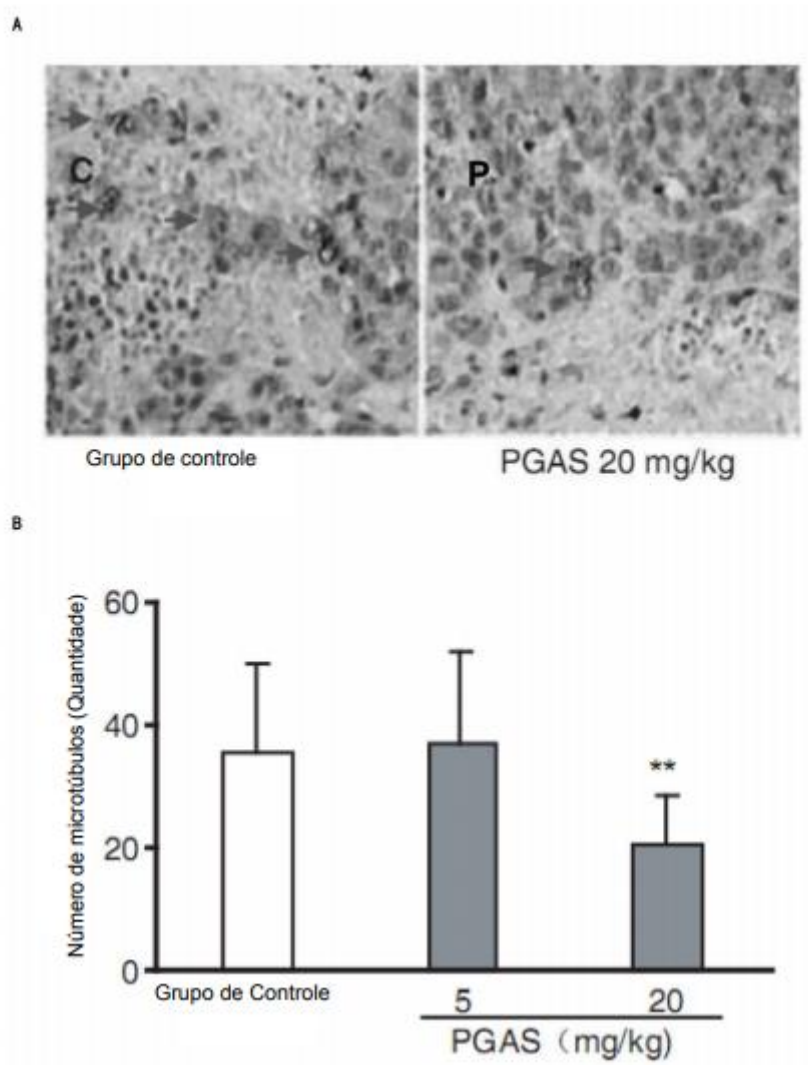
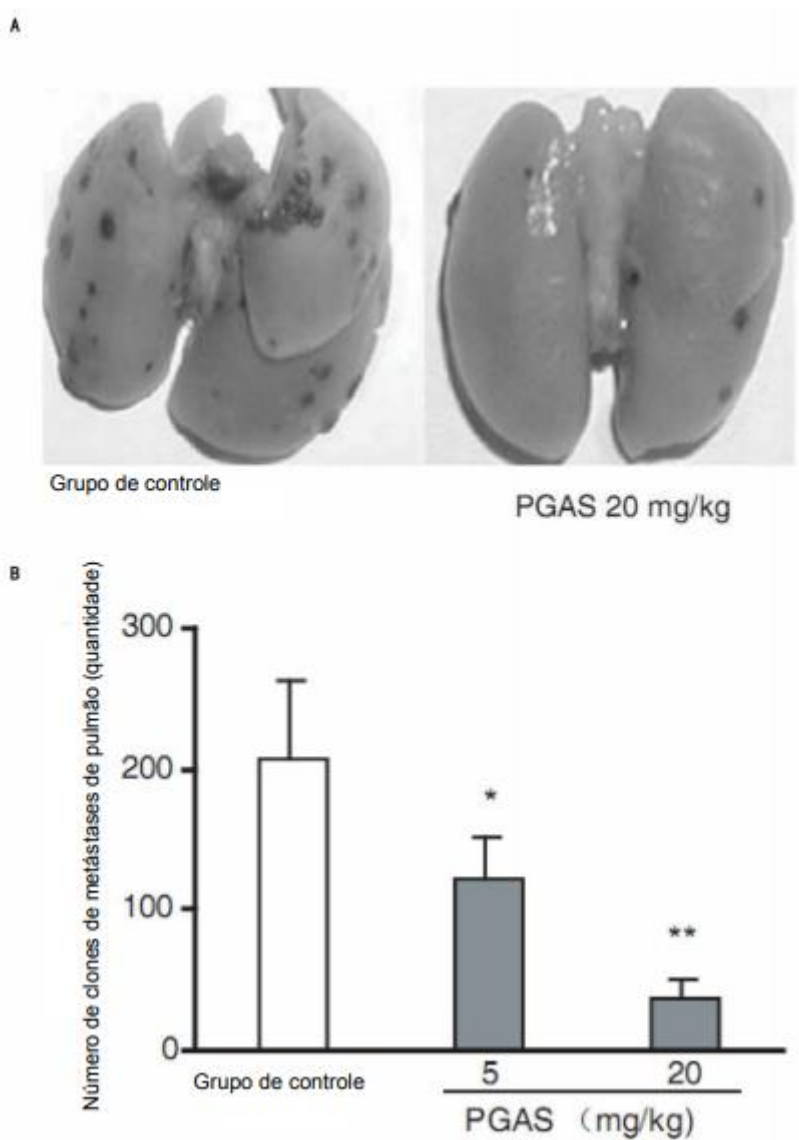


FIGURA 2

**FIGURA 3**

**FIGURA 4**

**FIGURA 5**

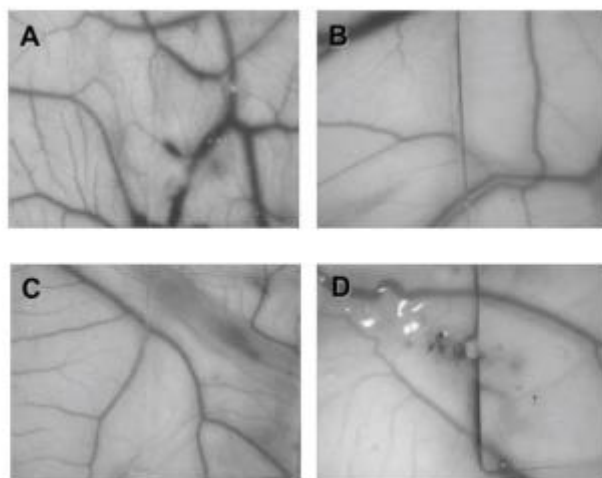
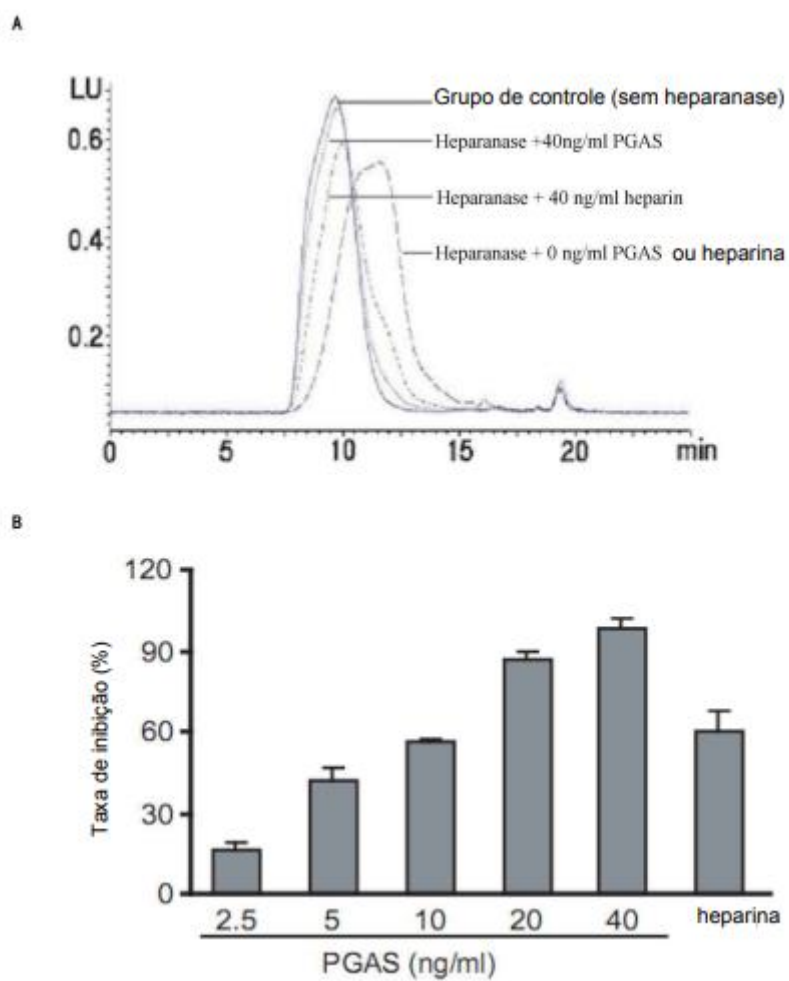
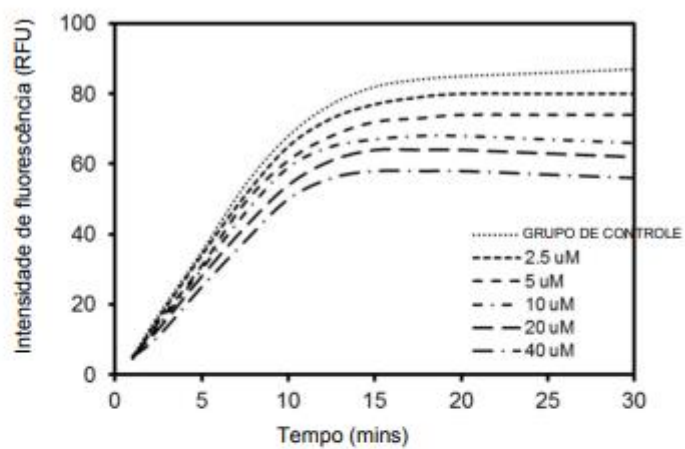


FIGURA 6

**FIGURA 7**

A



B

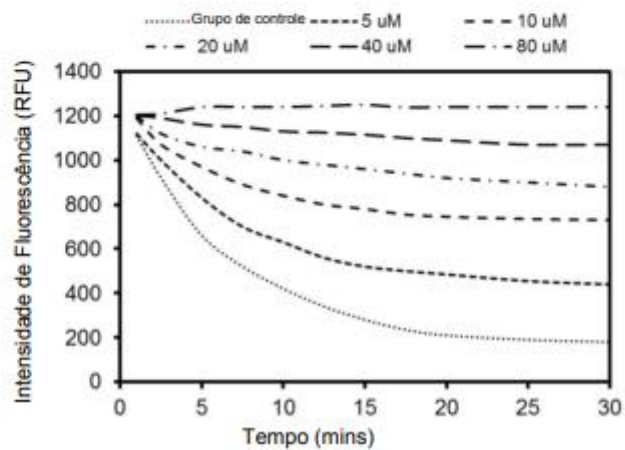
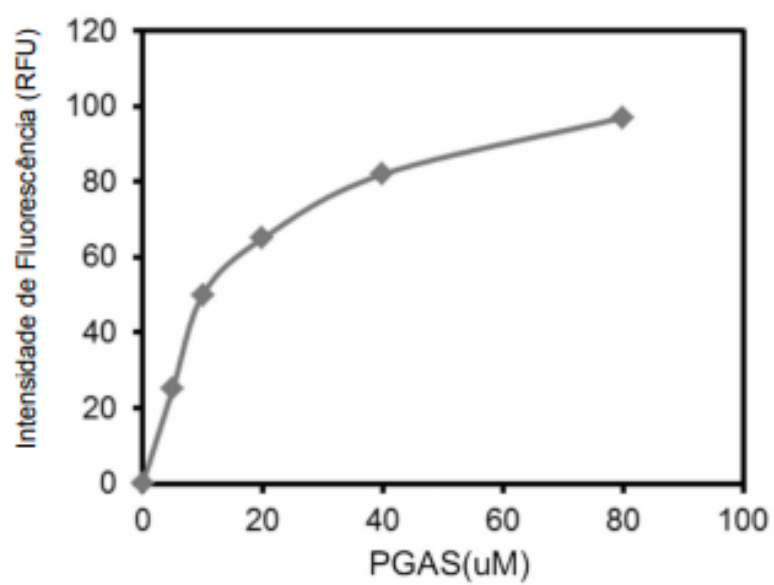


FIGURA 8

**FIGURA 9**

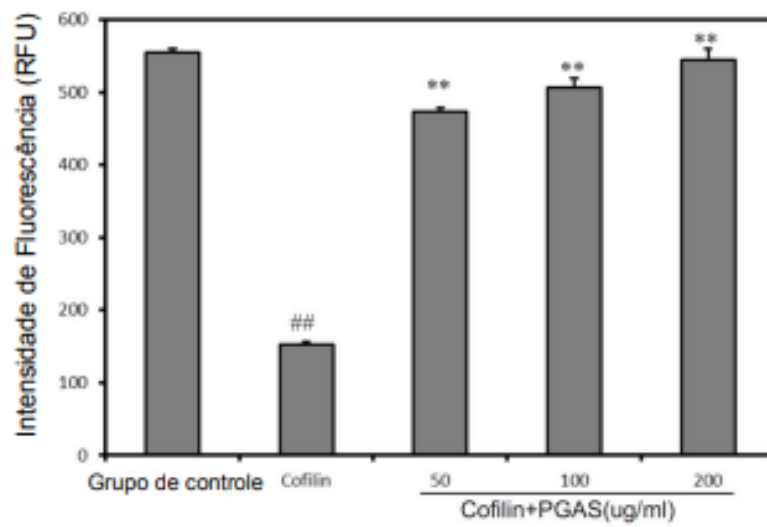
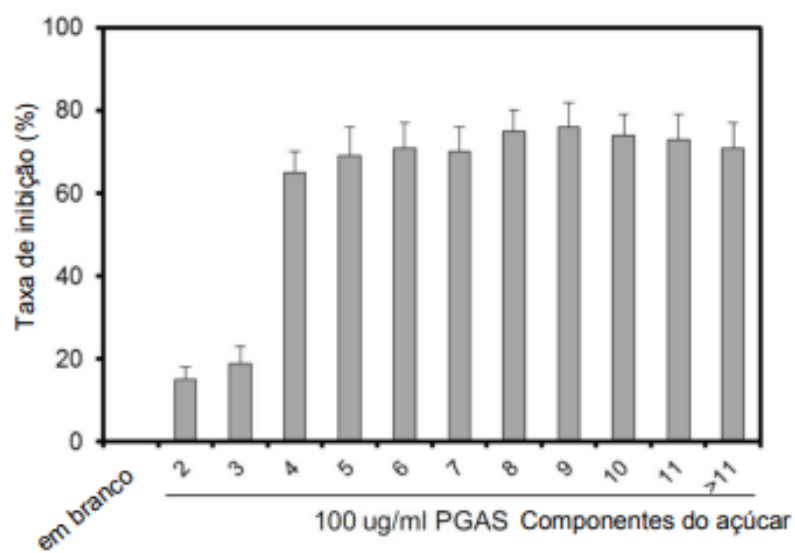


FIGURA 10

**FIGURA 11**