(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 314 205**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
A61K 31/717 (2006.01)
A61K 31/718 (2006.01)
A61K 31/719 (2006.01)
A61K 31/721 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **03729214 .1**
(96) Fecha de presentación : **10.01.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1465640**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

(54) Título: **Uso de derivados de polisacáridos como sustancias antiinfecciosas.**

(30) Prioridad: **10.01.2002 DE 102 00 717**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

(73) Titular/es: **Dow Wolff Cellulosics GmbH**
August-Wolff-Strasse 13
29699 Bomlitz, DE

(72) Inventor/es: **Haack, Vera;**
Heinze, Thomas;
Schmidtke, Michaela;
Möllmann, Ute;
Dahse, Hans-Martin y
Härtl, Albert

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Uso de derivados de polisacáridos como sustancias antiinfecciosas.

La invención se refiere al uso de sustancias basadas en oligo- y polisacáridos como materiales antiinfecciosos, tales como agentes antibacterianos y antivirales. Estos agentes antiinfecciosos pueden utilizarse, por ejemplo, en formulaciones cosméticas y farmacéuticas en forma de sustancias conservantes, como compuestos con actividad biológica en preparaciones medicamentosas, para el tratamiento biocida de superficies, de tejidos y de materiales de embalaje para, por ejemplo, alimentos, o de productos que se utilizan en medicina, biología, farmacia, así como para el recubrimiento de heridas para su aplicación en la industria cosmetológica y farmacéutica, la agricultura y la industria de alimentos y forrajes.

Es conocido que globalmente aumenta la cantidad de infecciones causadas por agentes patógenos bacterianos y en ese aspecto la resistencia antibacteriana constituye un problema de salud generalizado. El incremento a nivel mundial de infecciones tuberculosas causadas por cepas de micobacterias que en el transcurso del tiempo se tornaron resistentes a los agentes terapéuticos usuales (B.R.Bloom, J.L. Murray, Science **257**, 1992, 1055), así como el tratamiento de infecciones con estafilococos resistentes a múltiples fármacos (M. Kresken, Bundesgesundheitsblatt **38**,1996, 170), requiere el diseño de nuevas sustancias activas. Existe una imperiosa necesidad de principios activos alternativos con nuevos mecanismos de acción, en especial para contrarrestar la resistencia a los antibióticos y para combatir infecciones bacterianas en casos de intolerancia a los principios activos existentes.

Aunque con el desarrollo de virostáticos nucleosídicos y nucleotídicos muy selectivos, como por ejemplo aciclovir, penciclovir, ganciclovir, sorivudina y cidofovir para el virus de herpes, se logró una importante mejoría en el tratamiento de infecciones potencialmente fatales, los agentes terapéuticos mencionados poseen todos el mismo principio de acción. Inhiben la ADN polimerasa viral. Otra desventaja de estos compuestos radica en que también tienen ingerencia en el metabolismo del ADN de la célula infectada y, por lo tanto, albergan el riesgo de causar efectos mutagénicos, teratogénicos y oncogénicos (Wutzler, P. Thust, R. Antiv. Res. **49**, 2001, 55). Además, en tratamientos prolongados con virustáticos nucleosídicos y nucleotidos se comprobó tanto en cultivos celulares infectados, como también en pacientes inmunosuprimidos, el desarrollo de resistencia a estos medicamentos (Andrei, G. *et al*. Antimicrob. Agents Chemother., 1995, **39**, 1632; Pavic, I. *et al*. Antimicrob. Agents Chemother., 1997, **39**, 2686). Por esa razón se deben desarrollar adicionalmente nuevos agentes profilácticos y terapéuticos de fuerte acción antiviral con otro tipo de mecanismo de acción.

Los compuestos de amonio cuaternario pertenecen al gran grupo de las sustancias de acción biológica. Son capaces de destruir microorganismos tales como bacterias y hongos. Las sales de amonio cuaternario de bajo peso molecular se utilizan como agente desinfectante o como material de recubrimiento biocida (J. Controlled Release **50**, 1998, 145). Un problema típico de los compuestos de bajo peso molecular es una insuficiente biodisponibilidad que, por ejemplo, puede deberse a diferentes procesos de transporte y degradación. Los materiales poliméricos cuaternarios funcionalizados con grupos amino pueden sintetizarse a partir de resinas de intercambio cuaternarias disponibles en el comercio por polimerización de injerto de poliuretanos con polímeros telechélicos hidroxilados del polibutadieno o de polisiloxanos con funciones alcohólicas primarias en la cadena lateral. Estos polímeros biocidas por lo general tienen un elevado costo de producción y con frecuencia son tóxicos, dado que contienen restos de los monómeros tóxicos (Trends in Polymer Science **4**, 1996, 364). Además pueden producirse acumulaciones no deseadas y peligrosas de los polímeros en el organismo, debido a que no son biodegradables. Además, se utilizan polímeros sintéticos que contienen funciones catiónicas como dispersiones para la protección de la madera (Patente Estadounidense 5.049.383). Las desventajas de los polímeros sintéticos que contienen funciones catiónicas son los elevados costos de producción, la toxicidad (contaminación debido al contenido residual de monómeros) y la estabilidad frente a la biodegradación.

Se conocen derivados de polisacáridos con funciones amonio cuaternario y hasta ahora se utilizan ante todo como aditivo para el tratamiento de superficies en la industria textil y del papel, así como en calidad de regulador de la consistencia en cosmética, donde presentan sólo un reducido grado de sustitución (GS) <0,2. Hasta ahora no se dispone de conocimientos respecto de los efectos biológicos. En contraposición, se describe una acción antiinfecciosa, en especial efectos antibacterianos, de éteres de almidón que contienen largas cadenas alquílicas (C_8-C_{22}) que están conectadas con el almidón mediante grupos sililéter (Patente Japonesa 05295002). La reducida estabilidad química de los alquilsilil-éteres o de polisacáridos conduce a una liberación no controlada de grupos funcionales, incluso ya debido a la acción de la humedad ambiental y con ello a la reducción o la pérdida de la actividad biológica (D. Klemm *et al*., Comprehensive Cellulose Chemistry, Wiley-VCH, 1998). Además, los compuestos con grupos sililo de bajo peso molecular son tóxicos. Por lo demás, las publicaciones se refieren a fibras de celulosa y a derivados de quitosano de acción antibacteriana (W. H. Daly, M. M. Guerrini, Polym. Mat. Sci. Eng. **79**, 1998, 220). El quitosano se describe con la mayor frecuencia como polisacárido catiónico natural y se utiliza como agente fungicida en cosmética (T. Tashiro, Macromol. Mater. Eng. **286**, 2001, 63, K.C. Gupta, M.N.V.R. Kumar, J.M.S.-Rev. Macromol. Chem. Phys. **C40**, 2000, 273). Las desventajas de estos polisacáridos con frecuencia son las contaminaciones con otras sustancias biogénicas, el elevado precio debido a los costosos métodos de aislamiento y purificación y la estructura propia de la naturaleza, los grupos amonio están ubicados exclusivamente en la cadena principal del polímero. Además, no puede controlarse su distribución y el contenido está limitado a un grado de sustitución de 1. También se han descrito superabsorbentes que consisten en polisacáridos modificados catiónicamente y reticulados como la celulosa (EP 0 582 624 B1).

El documento de Patente Estadounidense-A-5 254 540 describe derivados de almidón antimicrobianos, con grupos funcionales amonio, basados en piridina, anilina, pirazina o alquileno, donde una parte de la estructura del almidón se oxidó a funciones aldehído.

Existen indicios en la bibliografía que la actividad biológica se deba a la existencia de las funciones amonio cuaternario, donde por otra parte se describe que comprobadamente los compuestos típicos con grupos tetraalquil nitrógeno catiónicos, como Polyquaternium 10, no presentan bioactividad (W.A. Daly, M.M. Guerrini, D, Culberson, J. Macossay, en: Science and Technology of Polymers and Advanced Materials, Plenum Press 1998, 493). Sobre la base de los resultados existentes de la bibliografía de ninguna manera puede concluirse si las estructuras realmente desarrollan una actividad biológica y cuáles serían éstas.

La invención se basa en la misión de encontrar polímeros con una nueva acción antiinfecciosa; las sustancias deben poseer una elevada acción antiinfecciosa en un amplio espectro, permitir combatir de manera efectiva la resistencia a antibióticos en el caso de infecciones bacterianas, ofrecer nuevas posibilidades para el tratamiento de infecciones virales y, además, ser de buena tolerancia, biodegradables, no tóxicos y de sencilla preparación.

El objetivo se cumple según la invención mediante la provisión de derivados de polisacáridos de acuerdo con la reivindicación 1, en los cuales mediante reacciones de eterificación se introdujeron funciones catiónicas con un grado de sustitución (GS) en el intervalo de 0,4 a 3,0, en especial agrupaciones alquilamonio con un GS en el intervalo de 0,6 a 1,8, por medio de grupos espaciadores en los polisacáridos. Los polisacáridos de acuerdo con la reivindicación 1 son especialmente adecuados debido a su biodegradabilidad y atoxicidad.

La invención se refiere por lo tanto al uso de polisacáridos de acuerdo con la reivindicación 1 que están sustituidos con grupos amonio cuaternarios con un grado de sustitución de 0,4 a 3,0, unidos mediante enlazadores, como agentes antiinfecciosos o bien para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Los compuestos usados según la invención de acuerdo con la reivindicación 1 presentan una elevada actividad biológica y de manera sorprendente inhiben el desarrollo de bacterias patógenas, como p. ej. estafilococos y micobacterias, con concentraciones inhibitorias mínimas en el intervalo de 5-60 mg/L, así como la multiplicación del virus del herpes e influenza en un intervalo de 3-50 mg/L. Debido a estas propiedades, los compuestos pueden utilizarse para la preparación de medicamentos para prevenir y combatir infecciones bacterianas y virales. Pueden utilizarse tanto solos, como también en combinación con agentes terapéuticos conocidos o con sustancias adyuvantes y vehículos de tolerancia fisiológica.

Los compuestos antiinfecciosos de acuerdo con la reivindicación 1 pueden emplearse para su uso como solución o suspensión en medios aceptables para uso farmacéutico, para administración tópica o parenteral, por medio de inyecciones intravenosas, subcutáneas o intramusculares, para aplicación intranasal; en forma de comprimido, cápsula o supositorio. Los compuestos pueden usarse en dosificaciones de 0,1-1000 mg/kg de peso corporal.

Para la preparación de los compuestos efectivos de acuerdo con la invención se utilizan de preferencia almidones, tales como almidones nativos de diferente origen, por ejemplo almidón de patata, de trigo, de maíz y de arroz, y almidones parcialmente hidrolizados por vía química o enzimática, tales como Solamyl, amilosa, amilopectina y almidón de maíz ceroso, así como almidón de plantas modificadas por ingeniería genética, como los del tipo Hylon. El contenido de amilosa en los almidones, al igual que el contenido de amilopectina, puede ser en cada caso de 0-100%, de preferencia de 30-70%. Los pesos moleculares de polisacáridos adecuados se ubican en el intervalo de 10^3-10^7 g/mol (compárese la Tabla 1). Las unidades repetitivas de anhidroglucosa - (AGU) pueden estar conectadas por medio de enlaces α(1-4), α(1-6), α(1-3), β(1-4) y β(1-3) o también combinaciones de estos, como por ejemplo α(1-4) y α(1-6), como se muestra esquemáticamente en la Figura 1, o α(1-6), α(1-3) y α(1-4) y pueden contener cadenas laterales conectadas de diferente longitud. Además también pueden contener otros grupos funcionales, como funciones éster fosfato, por ejemplo en el almidón natural de patata.

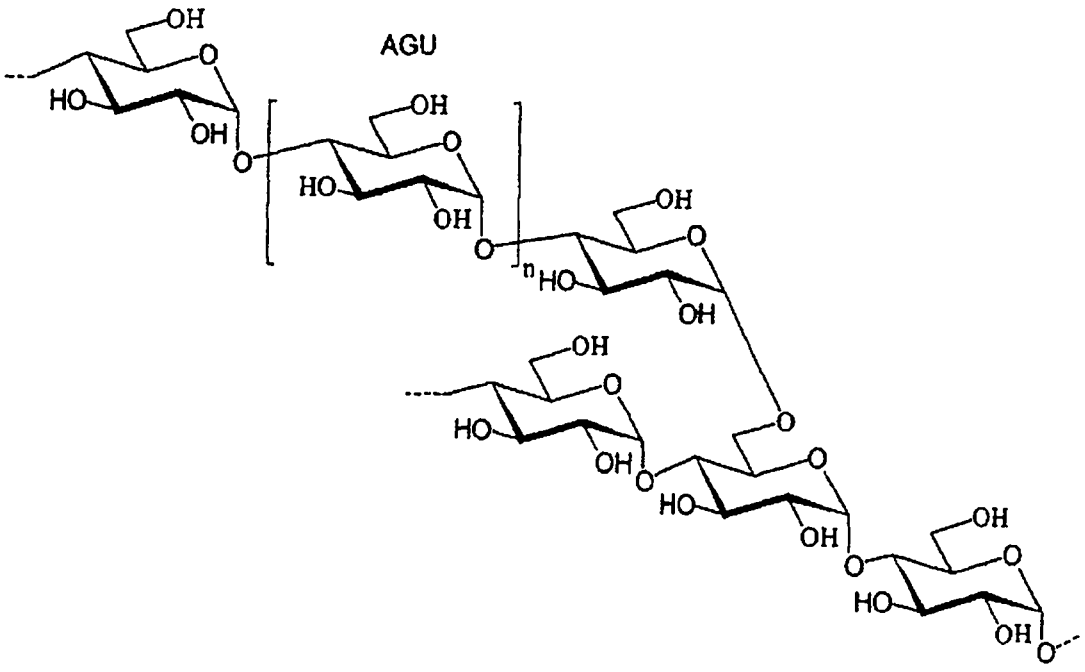


Fig. 1: ejemplo de estructura de los polisacáridos que pueden usarse

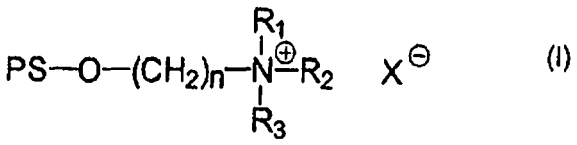
TABLA 1

Material amiláceo	Contenido de amilosa (%)	Peso molecular (GPC[1]) ($g \cdot mol^{-1}$)
Hylon VII (H)	70	$9 \cdot 10^6$
almidón de patata (P, Emsland)	28	$40 \cdot 10^6$
almidón de maíz (M)	28	$76 \cdot 10^6$
almidón de trigo (W)	26	$65 \cdot 10^6$
almidón de maíz ceroso (WM)	1	$51 \cdot 10^6$
Solamyl (S)	28	9700

[1] determinado en DMSO

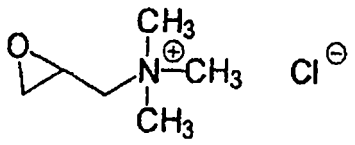
El grado de transformación en los grupos hidroxilo se indica mediante el grado de sustitución (GS) medio. Este valor medio indica sin diferenciación alguna el número de grupos hidroxilo funcionalizados y por lo tanto en los polisacáridos indicados por definición se ubica en el intervalo de 0 a 3. El GS en grupos catiónicos de los derivados de polisacáridos de acción antiinfecciosa de la invención oscila entre 0,4 y 3,0, de preferencia entre 0,6 y 1,8. Si en las derivatizaciones se introducen grupos funcionales que por sí mismos contienen grupos reactivos, p. ej. grupos hidroxilo, como resultado de la eterificación de polisacáridos con epóxidos, estos también pueden reaccionar formando largas cadenas laterales.

Los derivados de polisacáridos que pueden usarse de acuerdo con la invención son conocidos en general o pueden obtenerse de manera en sí conocida, en especial mediante la eterificación de polisacáridos con compuestos reactivos, por lo que se forman directamente compuestos de amonio cuaternario de la fórmula general (I) (PS: resto de polisacárido, se muestra sólo un sustituyente) o en donde la cuaternización se produce a continuación de la reacción de eterificación. En la fórmula (I) R_1, R_2 y R_3 significan de manera independiente entre sí, de preferencia, alquilo con 1-4 átomos de C o bencilo o bencilo sustituido (los sustituyentes son, p. ej., 1 a 3 alquilo, halógeno, alcoxi, carbamoílo, alcoxicarbonilo, ciano, dialquilamino), R_1 también puede ser hidrógeno, X un anión (p. ej. halogenuro, hidróxido, sulfato, hidrogenosulfato y otro anión de ácidos minerales y carboxílicos), n puede ser 2-4.

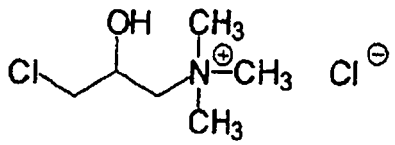


(I)

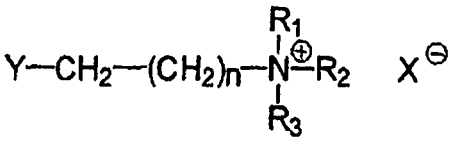
Los reactivos cuaternarios de cationización de uso preferido son el cloruro de 2,3-epoxipropiltrimetilamonio (QUAB®151, Degussa AG, fórmula II) o el cloruro de 3-cloro-2-hidroxipropiltrimetilamonio (QUAB® 188, Degussa AG, fórmula III). También pueden usarse reactivos de la fórmula general IV con Y = Cl, Br y n = 1-3 para la eterificación de los polisacáridos.



(II)



(III)



(IV)

Por lo tanto el enlazador, por medio del cual los grupos amonio cuaternarios están unidos con los polisacáridos, es alquileno C_2-C_4 eventualmente sustituido con hidroxi.

La eterificación para la preparación de los derivados de polisacáridos de acción biológica puede llevarse a cabo de diferente forma y se realiza de un modo conocido en sí mismo, en el que se logran elevados contenidos de grupos catiónicos. Se emplean tanto suspensiones de los polímeros en un alcohol y lejía de sosa y agua (procedimiento heterogéneo), siendo apropiados como medios de reacción los alcoholes como metanol, isopropanol y, de preferencia, etanol o lejías alcalinas acuosas, de preferencia lejía de sosa/agua con una transición del sistema heterogéneo al sistema homogéneo, como también soluciones homogéneas de los polímeros en disolventes dipolares-apróticos, como dimetilsulfóxido o dimetilacetamida en presencia de cloruro de litio u otros disolventes. El tiempo de reacción para la reacción con el reactivo de cationización oscila entre 1 y 48 h, de preferencia entre 3 y 24 h, y la temperatura oscila entre 30 y 130ºC, de preferencia entre 40 y 80ºC. Debido a los equivalentes molares utilizados del agente de eterificación puede además ajustarse el grado de sustitución de los productos y variarse en amplios intervalos. Además, también las reacciones en varias etapas son apropiadas para la obtención de los derivados de polisacáridos, en donde un producto ya cationizado o funcionalizado con grupos amino se hace reaccionar nuevamente en las condiciones antes indicadas. El procesamiento de los productos de reacción se realiza con procedimientos habituales de la química de polímeros, en donde los productos secundarios de bajo peso molecular y los residuos de reactivos se separan mediante diálisis o procesos de lavado o precipitación a partir de agua en disolventes orgánicos.

Los grados de sustitución se calculan por medio de los valores de nitrógeno determinados por análisis elemental de acuerdo con la siguiente fórmula de determinación:

$$GS_N = \frac{162{,}15 \cdot \%N}{1401 - 151{,}64 \cdot \%N}$$

Además, los iones conjugados contenidos en los compuestos, tales como cloruro, y los espectros de RMN, son adecuados para la determinación de los valores de GS.

Los siguientes ejemplos de realización han de explicar en mayor detalle la invención pero sin limitarla de ningún modo.

Ejemplos de realización

1. *Preparación de los compuestos mediante un proceso de reacción heterogénea en etanol/lejía de sosa/agua*

Se suspenden 20 g de polisacárido (tipo de polisacáridos, véase la siguiente Tabla 2) en 80 ml de etanol. A esta suspensión se agrega gota a gota una solución de 10,85 g de NaOH en 28 ml de agua y 80 ml de etanol, así como una solución de 0,246 mol de QUAB®188 (solución acuosa al 69%). La mezcla de reacción se agita durante 6 h a 60ºC. El producto se neutraliza con HCl 0,1 N, se dializa y se liofiliza.

El rendimiento es del 95% (referido al GS alcanzado).

Análisis elemental: %N, 3,51

Grado de sustitución medio (GS_N) =0,66

TABLA 2

Cationización heterogénea

Polisacárido	Reactivo		Producto	Grado de sustitución
	Tipo	Relación molar AGU : reactivo		
Hylon	QUAB®188	1 : 3	H 1 (466)	0,50
Hylon	QUAB®188	1 : 2	H 2 (KS005)	0,66
Amioca	QUAB®188	1 : 3	WM 1 (505)	0,14
Almidón de patata	QUAB®188	1 : 3	P 1[1] (491)	0,34
Almidón de patata	QUAB®188	1 : 3	P 2[1] (469)	0,58
Almidón de trigo	QUAB®188	1 : 3,25	W 1 (527)	0,99
Almidón de trigo	QUAB®188	1 : 2	W 3 (571)	0,61
Almidón de trigo	[2]	1 : 5	W 4	0,72
Almidón de trigo	[2]	1 : 10	W 5	0,81

[1] diferentes concentraciones de NaOH

[2] reactivo: $Cl\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N(C_2H_5)H_2Cl$

2. *Reacción de polisacáridos en lejía de sosa acuosa*

Se suspenden 20 g de polisacárido (tipo de polisacáridos, véase la siguiente Tabla 3) en una solución de lejía de sosa (0,5 g de NaOH en 100 ml de agua). La mezcla se agita durante una hora a 60ºC. A esta temperatura se agregan gota a gota 0,123 mol de QUAB®151 o bien de QUAB®188 en el caso del almidón degradado Solamyl. La mezcla de reacción se agita durante 6 h a 60ºC. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se neutraliza con HCl 0,1 N; a continuación se dializa y se liofiliza.

El rendimiento asciende al 98% (referido al GS alcanzado).

Análisis elemental: %N, 3,34

Grado de sustitución medio (GS_N) = 0,60

TABLA 3

Cationización heterogénea/homogénea

Polisacárido	Reactivo		Producto	Grado de sustitución
	Tipo	Relación molar AGU : reactivo		
Hylon	QUAB®151	1 : 1	H 3 (477)	0,40
Hylon	QUAB®151	1 : 2	H 4 (KS006)	0,92
Amioca	QUAB®151	1 : 0,5	WM 2 (503)	0,38
Amioca	QUAB®151	1 : 1	WM 3 (501)	0,60
Amioca	QUAB®151	1 : 2	WM 4 (502)	0,92
Almidón de maíz	QUAB®151	1 : 0,5	M 1 (517)	0,35
Almidón de maíz	QUAB®151	1 : 1	M 2[1] (516)	0,55
Almidón de maíz	QUAB®151	1 : 1	M 3[1] (519)	0,72
Almidón de maíz	QUAB®151	1 : 2	M 4 (515)	1,03
Patata	QUAB®151	1 : 3	P 3 (KS 016)	0,69
Patata	QUAB®151	1 : 2	P 4 (KS 013)	1,05
Almidón de trigo	QUAB®151	1 : 0,5	W 4 (520)	0,39
Solamyl	QUAB®188	1 : 2	S 1[1](554)	0,68
Solamyl	QUAB®188	1 : 3	S 2 (555)	0,76
Solamyl	QUAB®188	1 : 2	S 3[1] (568)	0,80

[1] diferentes concentraciones de NaOH

3. *Proceso de reacción homogénea en dimetilsulfóxido (DMSO)*

Se suspenden 15 g de polisacárido (tipo de polisacáridos, véase la siguiente Tabla 4) en dimetilsulfóxido (DMSO) a temperatura ambiente y se calientan a 80ºC, disolviéndose el polisacárido. La solución se enfría a temperatura ambiente y se agregan 0,5 g de NaOH disueltos en 20 ml de agua. A continuación se agregan gota a gota 0,0925 mol de QUAB®151 bajo agitación. La mezcla de reacción se agita durante 24 h a 60ºC. Después de enfriar a temperatura ambiente, se neutraliza la mezcla con HCl 0,1 N, a continuación se dializa y se liofiliza.

El rendimiento asciende al 99% (referido al GS alcanzado).

Análisis elemental: %N, 3,22

Grado de sustitución medio (GS_N) = 0,57

TABLA 4

Cationización homogénea

Polisacárido	Reactivo		Producto	Grado de sustitución
	Tipo	Relación molar AGU : reactivo		
Hylon	QUAB®151	1 : 3	H 5 (436)	0,55
Almidón de patata	QUAB®151	1 : 1	P 5 (KS 9)	0,42
Amioca	QUAB®151	1 : 1	WM 5 (504)	0,57
Almidón de trigo	QUAB®151	1 : 1	W 5 (531)	0,41
Almidón de maíz	QUAB®151	1 : 1	M 5 (532)	0,40
Solamyl	QUAB®151	1 : 1	S 4 (588)	0,60

4. *Cationización en varias etapas*

Se suspenden 5 g de polisacárido cationizado (tipo de polisacáridos, véase la siguiente Tabla 5) en una solución de lejía de sosa (0,5 g de NaOH en 100 ml de agua). La mezcla se agita durante una hora a 60ºC. A esta temperatura se agregan gota a gota 0,2 mol de QUAB®'151. La mezcla de reacción se agita durante 6 h a 60ºC. Después de enfriar a temperatura ambiente, se neutraliza la mezcla con HCl 0,1 N; a continuación se dializa y se liofiliza.

El rendimiento asciende al 95% (referido al GS alcanzado)

Análisis elemental: %N, 5,11

Grado de sustitución medio (GS_N) = 1,32

TABLA 5

Cationización en varias etapas

Almidón cationizado		Reactivo			Grado de sustitución
Polisacárido	GS inicial	Tipo	Relación molar AGU : reactivo	Producto	GS_N
Hylon	0,40	QUAB®151	1 : 2	H 6 (479)	0,90
Hylon	0,80	QUAB®151	1:1,5	H 7 (498)	1,10
Patata	0,77	QUAB®151	1 : 2	P 6 (506)	1,18
Patata	0,42	QUAB®151	1 : 10	P 7 (597)	1,32
Amioca	0,60	QUAB®151	1 : 10	WM 6 (598)	1,25
Trigo	0,41	QUAB®151	1:10	W 6 (603)	1,16
Trigo	0,88	QUAB®151	1 : 10	W 7 (602)	1,41
Maíz	0,55	QUAB®151	1:10	M 6 (600)	1,13

Patata	1,32	QUAB®151	1:15	P 8	1,80
Maíz	1,13	QUAB®151	1 : 10	M 7	1,65
Solamyl	0,80	QUAB®151	1 : 2	S 5 (610)	0,91

5. *Determinación de la actividad antibacteriana/antimicrobiana de los compuestos contra bacterias gram-positivas y gram-negativas y contra levaduras*

La actividad antibacteriana de los compuestos contra *Staphylococcus aureus* SG 511, *S. aureus* 134/93 (resistentes a múltiples fármacos) y *Mycobacterium vaccae* IMET 10670 se verificó mediante la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (MHK) en un microensayo de dilución de caldo en caldo de Müller-Hinton (DIFCO) de acuerdo con las directrices del NCCLS [National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 4th Ed.; Villanova, Ed.; Approved standard Document M7-A4. NCCLS, (1997)]. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

Actividad antibacteriana

Muestra	Grado de sustitución GS_N	MHK [mg/l]		
		Staphylococcus aureus		Mycobacterium vaccae
		SG 511	134/93	IMET10670
H 4 KS006	0,92	15,6	15,6	7,8
H 7 498	1,10	15,6	15,6	7,8
WM 4 502	0,92	31,25	62,5	15,6
M 3 519	0,72	15,6	62,5	7,8
M4 515	1,03	31,25	62,5	1'5,6
P3 016	0,69	31,25	62,5	7,8
P4 013	1,05	15,6	125	3,9
W 2 567	0,57	62,5	62,5	15,6
W3 571	0,61	31,25	31,25	7,8
W 1527	0,99	31,25	31,25	15,6
S 1 554	0,68	31,25	62,6	15,6
S 2 555	0,76	15,6	31,25	7,8
S 3 568	0,80	15,6	15,6	7,8

6. *Determinación de la acción antiviral contra el virus Herpes simplex, tipo 1*

Antes de los estudios antivirales se determinó la concentración citotóxica de 50% (CC_{50}) en células de riñón de mono Verde (GMK, por sus siglas en inglés) para poder excluir efectos no específicos de las sustancias. Para ello se inoculan céspedes de células de GMK cerrados en placas de microtitulación con las correspondientes diluciones seriadas de sustancia (factor 2) (Schmidtke *et al.*; J. Virol. Meth. 95, 2001, 133). Después de una incubación de 72 horas se realizó la tinción de las células con violeta cristal/metanol. Después de la separación del colorante se mide la densidad óptica de las distintas cavidades en un fotómetro de placa de la empresa Dynatech (550/630 nm) y se compara con el valor medio de 6 controles celulares sin tratar, que se considera 100%. La CC_{50} representa la concentración de

la sustancia en el punto de intersección de la curva de extinción de la serie de diluciones con la línea del 50% del valor medio del control. El efecto antiviral de los compuestos respecto de HSV-1 se analizó en el ensayo citopático de efecto de inhibición (ensayo de inhibición zpE) en células GMK y se determinó la dosis inhibitoria del 50% (IC_{50}) (Schmidtke *et al.*; J. Virol. Meth. 95, 2001, 133). El índice de selección se calculó como cociente a partir de CC_{50} e IC_{50} (Tabla 7).

Los compuestos de partida (reactivos QUAB o bien almidones no modificados) no evidenciaron un efecto antiviral (resultados sin representar).

TABLA 7

Actividad antiviral

Muestra	Grado de sustitución GS_N	CC_{50} (µg/ml) en células GMK	IC_{50} (µg/ml) frente a HSV-1	Índice de selección (CC_{50}/IC_{50})
H 3 477	0,40	>200	8,54	> 23,42
H 1 466	0,50	>200	5,11	> 39,14
H 2 005	0,66	> 200	7,07	> 28,29
WM 2 503	0,38	> 200	7,05	> 28,37
M 1 517	0,35	> 200	7,84	> 25,51
P 1 491	0,34	> 200	10,15	> 19,70
W 4 520	0,39	> 200	10,55	> 18,96
S 1 554	0,68	141,54.	3,59	39,43

7. *Determinación de la forma de acción en el PRT modificado*

Los estudios realizados respecto del mecanismo de acción de la sustancia se efectuaron a modo de ejemplo con la cepa Kupka de HSV1 sensible a aciclovir y al ácido fosfonofórmico en un PRT modificado con el compuesto M 1 (Schmidtke *et al.*; J. Virol. Meth. **95**, 2001, 133). En este caso, el agregado de la sustancia se realizó en distintas concentraciones:

1) sólo al virus sin células (10^6 pfu/ml), que luego se incubó junto con el compuesto durante 6 h a 37ºC y después de la dilución de la sustancia se incluyó en el PRT: sin reducción de placas en el intervalo de dosis de hasta 6,25-25 µg/ml (resultados sin representar).

2) sólo en el agar: sin reducción de placas en el intervalo de dosis de hasta 6,25-25 µg/ml (resultados sin representar).

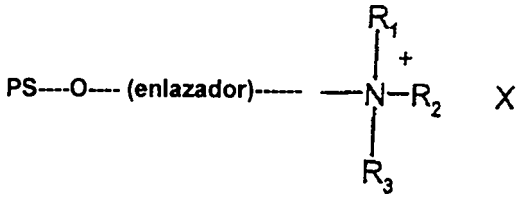
3) sólo durante la hora de absorción durante 2 h a 4ºC (3,12-12,5 µg/ml) y

4) 1, 2 y 4 h antes de la adición del virus (3,12-12,5 µg/ml).

Los resultados de los estudios respecto del mecanismo de acción muestran que los compuestos según la invención no tienen efecto antiviral, dado que no pudo comprobarse una inactivación del virus sin células. Más bien la presencia de la sustancia antes o durante la absorción del virus en las células de ensayo es condición para la inhibición de la replicación del virus del herpes.

REIVINDICACIONES

1. Uso de derivados de polisacáridos amiláceos con enlaces alfa-glicosídicos de la fórmula general (I)



en donde

PS representa un resto de polisacárido basado en almidón,

X significa un anión,

R^1 significa hidrógeno, alquilo C_1-C_4 o bencilo o bencilo sustituido,

R^2 y R^3, independientemente entre sí, significan cada uno alquilo C_1-C_4 o bencilo o bencilo sustituido y

enlazador es un grupo alquileno C_2-C_4 opcionalmente sustituido con hidroxi,

los grupos amonio cuaternarios unidos por medio del enlazador están sustituidos con un grado de sustitución de 0,4 a 3,0,

para la preparación de un medicamento contra enfermedades infecciosas.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el grado de sustitución es de 0,6 a 1,8.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los polisacáridos son almidones, tales como almidón de patata, de trigo, de maíz y de arroz, almidón parcialmente hidrolizado por vía química o enzimática o almidones obtenidos de plantas modificadas por ingeniería genética.