



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 121**

51 Int. Cl.:
A61K 31/737 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05775288 .3**
96 Fecha de presentación : **06.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1755620**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Derivados de exopolisacáridos (EPS) despolimerizados sulfatados, su preparación y sus usos.**

30 Prioridad: **14.06.2004 FR 04 06405**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.10.2011

73 Titular/es: **Institut Francais de Recherche pour
l'Exploitation de la Mer (IFREMER)
155, rue Jean-Jacques Rousseau
92130 Issy-les-Moulineaux Cédex, FR
Universite René Descartes - Paris 5**

72 Inventor/es: **Matou, Sabine;
Collic-Jouault, Sylvia;
Helley, Dominique;
Ratiskol, Jacqueline;
Sinquin, Corinne;
Boisset, Claire;
Guezennec, Jean y
Fischer, Anne-Marie**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de exopolisacáridos (EPS) despolimerizados sulfatados, su preparación y sus usos

La presente invención se refiere al uso ciertos derivados polisacáridicos altamente sulfatados y de baja masa molecular obtenidos a partir de un polisacárido de origen bacteriano para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la modulación de la angiogénesis, utilizable particularmente para acelerar la reparación del endotelio vascular en accidentes trombóticos y esto con un bajo riesgo hemorrágico.

La heparina, un polisacárido sulfatado extraído de la mucosa de mamíferos, es el agente antitrombótico más usado en la prevención y el tratamiento de la trombosis venosa. Sin embargo, en el transcurso de los tratamientos con heparina, pueden surgir efectos secundarios tales como una reacción alérgica o una complicación hemorrágica (debido a su alta actividad anticoagulante). Además, la heparina se ha revelado poco activa en la prevención y el tratamiento de la trombosis arterial. A causa de los límites del uso terapéutico de la heparina, es importante poder disponer de nuevos polisacáridos (por ejemplo, fucanos, sulfato de condroitina fucosilado, exopolisacáridos, etc...), de origen no mamífero (para evitar cualquier riesgo potencial de transmisión de agentes no convencionales), de baja actividad anticoagulante (con el fin de disminuir el riesgo de hemorragia) y eficaces para combatir la trombosis arterial.

Los objetivos son prevenir o tratar la trombosis arterial y sus consecuencias. Efectivamente, en caso de una lesión vascular arterial, la ausencia de una monocapa de células endoteliales desencadena una agregación plaquetaria seguida de la formación de un trombo. Este trombo arterial puede obstruir el lumen del vaso sanguíneo e impedir así cualquier oxigenación del tejido más adelante capaz de suponer una necrosis. Frente a este riesgo, sería interesante poder favorecer la reparación del endotelio vascular y estimular la formación de una circulación vascular colateral, dos eventos celulares que proceden de la estimulación de la angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso complejo, regulado fisiológicamente, que desemboca en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la red vascular preexistente. Es en las situaciones patológicas descritas anteriormente (lesión del endotelio vascular o hipoxia) cuando la cantidad de ciertos factores angiogénicos tales como el factor del crecimiento fibroblástico básico (FGF-2) o el factor del crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se vuelven mucho más importantes en el entorno perivascular. Efectivamente, el FGF-2 se libera principalmente después de la lesión del endotelio vascular, mientras que el VEGF se sintetiza principalmente por las células en situación de hipoxia. Estos dos factores FGF-2 y VEGF desencadenan el proceso de angiogénesis actuando sobre las células endoteliales, lo que se traduce en una estimulación de las tres etapas principales de la angiogénesis: migración, proliferación y diferenciación de las células endoteliales para formar neovasos (Folkman J., *Nat. Med.*, 1995, 1, 27-31; Detillieux K.A. *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 2003, 57, 8-19; Heilmann C. *et al.*, *Cardiovasc. Surg.*, 2002, 10, 570-578; Mc Neil P.L. *et al.*, *J. Cell Biol.*, 1989, 109, 811-822; Heba G. *et al.*, *J. Vasc. Res.*, 2001, 38, 288-300 y Marti H.H. y Risau W. *et al.*, *Thromb. Haemost.*, 1999, 82 (Supl. 1), 44-52).

Estudios anteriores han mostrado que los polisacáridos sulfatados (tales como heparina o fucano) o no sulfatados (tales como, por ejemplo, ácido hialurónico) pueden modular, según las condiciones experimentales, la angiogénesis inducida por un factor de crecimiento angiogénico. Estos polisacáridos son ricos en grupos químicos de carga negativa (grupos sulfato y ácido carboxílico) que les permiten interaccionar con un gran número de proteínas de carga positiva, entre ellas ciertas proteínas matriciales (membrana basal, matriz extracelular), ciertos factores de coagulación, factores de crecimiento (tales como, por ejemplo, FGF-2 y VEGF) y sus receptores de alta afinidad que son proteínas conocidas por intervenir en la angiogénesis (Giroux J.L. *et al.*, *Eur. J. Cell Biol.*, 1998, 77, 352-359; Matou S. *et al.*, *Thromb. Res.*, 2002, 106, 213-221; Chabut D. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2003, 64, 696-702; Luyt C.E. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, 305, 24-30). Estos factores de crecimiento pertenecen a la familia de los factores de crecimiento que pueden fijarse a heparina ("Heparin-Binding Growth Factor" o HBGF). Estos polisacáridos solubles polianiónicos pueden modular la interacción del factor angiogénico con sus receptores de alta afinidad (induciendo la transducción de la señal) o de baja afinidad (cofactor de los receptores de alta afinidad) presentes en la superficie de las células endoteliales. Así, el polisacárido puede potenciar el efecto del factor angiogénico catalizando la fijación de varias moléculas a los receptores de alta afinidad, lo que amplifica la dimerización de estos últimos. Esta dimerización de los receptores desencadena la transducción de la señal, estimulando así la expresión de los genes implicados en la migración, la proliferación y la diferenciación de las células endoteliales. En este supuesto, el polisacárido sulfatado actúa como cofactor igual que el proteoglucano con sulfato de heparano de membrana (sitio de baja afinidad) (Rusnati M. y Presta M., *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 1996, 26, 15-23; Soker S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 203, 1339-47). A la inversa, el polisacárido sulfatado puede interferir en la fijación del factor angiogénico al proteoglucano con sulfato de heparano mediante competición de carga, impidiendo así la inducción de una respuesta celular.

El exopolisacárido (EPS) denominado GY 785 es un polisacárido producido por la bacteria *Alteromonas infernus* que se describe en la patente FR 2.755.142, así como en el artículo de Raguene G. *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 1997, 82, 422-30). El EPS GY 785 está constituido por una población heterogénea de moléculas de masa molecular media elevada, es decir, de masa molecular superior a 1×10^6 g/mol. El EPS GY 785 está poco sulfatado (tasa de sulfato inferior al 10% en peso); está constituido por osas neutras (glucosa y galactosa mayoritariamente) y por osas ácidas (ácido glucurónico y ácido galacturónico); no comprende osaminas ni sustituyentes acetato, lactato, piruvato y

succinato; su contenido de proteína es de aproximadamente un 4% en peso (Guezennec J., Ind. Microb. Biotech., 2002, 29, 204-208).

El EPS GY 785 es difícilmente utilizable en su forma nativa en terapia a causa de su elevada masa molecular y de su heterogeneidad de tamaño, que conlleva una mala solubilidad y que vuelve muy difícil la caracterización de preparaciones activas y su obtención reproducible.

En trabajos anteriores, los inventores han puesto a punto un procedimiento de preparación de derivados sulfatados de baja masa molecular que comprende una primera etapa de sulfatación del EPS GY 785 y después una segunda etapa de despolimerización del EPS GY 785 sobresulfatado, mediante hidrólisis ácida o mediante despolimerización radicalica, para obtener derivados despolimerizados que presentan una tasa de sulfato de 20 o 40% en peso (Guezennec J. *et al.*, Carbohydr. Polym., 1998, 37, 19-24). Al contrario que el producto nativo, los derivados obtenidos después de la modificación química del EPS GY 785 presentan actividades anticoagulantes (Collic-Jouault S. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1528, 2001, 141-151).

Los inventores han mostrado igualmente que la despolimerización radicalica, obtenida mediante la acción del peróxido de hidrógeno en presencia de acetato de cobre, conduce en una sola etapa a derivados de baja masa molecular, generalmente inferior a 25.000 g/mol, de composición constante (baja polidispersidad de la masa molecular) y con rendimientos muy superiores a los obtenidos con el procedimiento de despolimerización por hidrólisis ácida. La reacción procede mediante la formación de radicales libres, procedentes de la reacción de un ión metálico (Cu^{2+} o Fe^{3+}) con el peróxido de hidrógeno (Van Dedem G. y Nielsen J.I., Pharmeuropa, 1990, 3, 202-218). Estos radicales libres son muy reactivos y capaces de degradar, a pH neutro, los polisacáridos más eficazmente que la hidrólisis ácida.

Los inventores han mostrado anteriormente en particular que la sulfatación por vía química, realizada según las condiciones de T. Nishino y T. Nagumo (Carbohydr. Res., 1992, 229, 355-362), conduce a derivados que presentan un contenido de sulfato superior al del EPS GY 785 nativo (20 a 40% en peso de sulfato frente a 10% en peso de sulfato, respectivamente). La actividad anticoagulante aumenta en función del contenido de sulfato y esta actividad desaparece si el contenido de sulfato es inferior a un 20% en peso.

Los inventores han descubierto ahora que ciertos derivados de polisacáridos sulfatados y despolimerizados de EPS GY 785 (obtenidos según un procedimiento de preparación que comprende una primera etapa de sulfatación de EPS GY 785 nativo para obtener un derivado sobresulfatado de EPS GY 785 que presenta una tasa de sulfato inferior o igual a un 45% en peso, y después una segunda etapa de despolimerización radicalica del derivado de EPS GY 785 sobresulfatado obtenido en la etapa anterior, para conducir a un derivado de polisacárido que presenta una masa molecular inferior o igual a 25.000 g/mol) tienen actividad sobre la modulación de la angiogénesis.

La presente invención tiene así como primer objeto el uso de derivados polisacarídicos sulfatados que presentan una masa molecular inferior o igual a 25.000 g/mol, un índice de polidispersidad inferior a 2 y una tasa de sustitución en grupos sulfato inferior o igual a un 45%, y preferiblemente comprendido entre 30 y 45% inclusive, estando obtenidos dichos derivados según un procedimiento de preparación que comprende al menos las etapas siguientes:

- una primera etapa de sulfatación química que comprende:

a) una primera subetapa de disolución, en un disolvente anhidro, de un polisacárido liofilizado GY 785 producido por la bacteria marina *Alteromonas infernus* y

b) una segunda subetapa de adición, a una temperatura comprendida entre 45 y 60°C, de al menos un agente de sulfatación química en una cantidad suficiente para conducir a un polisacárido sulfatado que presenta una tasa de sustitución en grupos sulfato inferior o igual a un 45% en peso en base al peso total del polisacárido GY 785 sulfatado;

- una segunda etapa de despolimerización radicalica del polisacárido sulfatado obtenido en la etapa anterior para conducir a un polisacárido sulfatado que presenta una masa molecular inferior o igual a 25.000 g/mol y un índice de polidispersidad inferior a 2, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a una actividad proangiogénica para la terapia cardiovascular.

Los derivados polisacarídicos sulfatados obtenidos según el procedimiento usado según la invención presentan una buena homogeneidad de tamaño (índice de polidispersidad: $I(\text{Mp}/\text{Mn}) < 2$ con Mp = masa molecular media ponderada y Mn = masa molecular media numérica), sin que sea necesario proceder a un fraccionamiento complementario por exclusión estérica.

En la primera etapa, el EPS GY 785 liofilizado puede usarse en estado nativo o en forma de una sal de adición con una base, débil o fuerte, que puede elegirse, por ejemplo, entre piridina, trietilamina, tributilamina, hidróxido de tetrabutilamonio y sosa.

Según una forma de realización preferida del procedimiento usado según la invención, el EPS GY 785 empleado en la primera etapa está preferiblemente en forma de una sal de adición liofilizada con una base. Esta sal liofilizada

- puede prepararse, por ejemplo, mediante elución de una disolución acuosa de EPS GY 785 a una concentración comprendida entre 1 y 8 mg/ml en una columna de resina intercambiadora de iones tal como, por ejemplo, las comercializadas con la denominación Dowex® por la compañía Dow Chemical; el EPS GY 785 está en forma de H^+ . Mientras se recoge el eluido, el pH se acidifica y después se ajusta el pH inmediatamente a aproximadamente 6,5 con la base deseada tal como se define anteriormente. Se ultrafiltra y liofiliza entonces el EPS GY 785 en forma de sal.
- Los disolventes anhidros que pueden usarse en la primera etapa se eligen preferiblemente entre dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) y formamida.
- La cantidad de EPS GY 785 presente en el disolvente anhidro puede estar comprendida entre 1 y 10 mg/ml aproximadamente, preferiblemente entre 1 y 5 mg/ml aproximadamente y aún más preferiblemente esta cantidad es de 5 mg/ml aproximadamente.
- En la subetapa a), la disolución de EPS GY 785 en el disolvente anhidro se realiza preferiblemente con agitación a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas aproximadamente y después a una temperatura comprendida entre 40 y 50°C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 45°C durante aproximadamente 2 horas en atmósfera de argón con tamiz molecular.
- El o los agentes de sulfatación química usados en la subetapa b) pueden añadirse a la solución de EPS GY 785 en forma seca o en forma de una solución en el mismo disolvente anhidro que el usado para disolver el EPS GY 785.
- Los agentes de sulfatación química se eligen preferiblemente entre los complejos de sulfato de piridina (libre o acoplado con un polímero), sulfato de trietilamina y sulfato de trimetilamina. En la subetapa b), el o los agentes de sulfatación química se añaden a la solución de EPS GY 785 en una cantidad en peso que representa preferiblemente de 4 a 6 veces aproximadamente, y aún más preferiblemente 5 veces aproximadamente, la masa de EPS GY 785 en solución.
- Se realiza entonces la reacción de sulfatación química con agitación durante un periodo comprendido entre 2 y 24 horas aproximadamente, según el grado de sulfatación deseado.
- Cuando se alcanza el grado de sulfatación deseado, se detiene la reacción de sulfatación, después del enfriamiento del medio de reacción:
- o bien mediante la adición de agua en una proporción preferiblemente igual a 1/10 del volumen de reacción y ajuste del pH del medio de reacción a 9 con un agente alcalinizante tal como, por ejemplo, sosa (3 M);
 - o bien preferiblemente mediante precipitación en presencia de acetona saturada de cloruro de sodio o metanol y después disolución del precipitado en agua.
- Según una forma de realización particular del procedimiento según la invención, la solución de EPS GY 785 sulfatado preferiblemente se dializa inmediatamente para eliminar las diferentes sales y después se liofiliza.
- La segunda etapa de despolimerización por vía radicalica del EPS GY 785 sulfatado obtenido a la terminación de la primera etapa se realiza preferiblemente mediante la adición a la mezcla de reacción que comprende EPS GY 785 sulfatado, en presencia de un catalizador metálico, de una solución de un agente oxidante, preferiblemente elegido entre peróxidos tales como peróxido de hidrógeno y perácidos tales como ácido peracético y ácido 3-cloroperbenzoico; efectuándose dicha adición en continuo y con agitación durante un periodo comprendido entre 30 minutos y 10 horas; manteniéndose preferiblemente la mezcla de reacción a un pH comprendido entre 6 y 8 mediante la adición continua de un agente alcalinizante tal como sosa, a una temperatura comprendida entre 30 y 70°C aproximadamente durante toda la duración de la reacción de despolimerización radicalica.
- En esta etapa, el agente oxidante es preferiblemente una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En este caso, la solución de agente oxidante se añade preferiblemente a un caudal comprendido entre $V1/1000$ y $V1/10$ ml/minuto, siendo $V1$ el volumen del medio de reacción que contiene el derivado sulfatado EPS GY 785 en el que se añade la solución de agente oxidante.
- Según otro modo de realización preferido de la presente invención, la solución de agente oxidante usada en la segunda etapa es una solución de peróxido de hidrógeno que presenta una concentración comprendida entre 0,1% y 0,5% en peso aproximadamente, preferiblemente del orden de 0,1 a 0,2% en peso, y que se añade a la mezcla de reacción a un caudal comprendido entre $V1/50$ y $V1/500$ ml/minuto, preferiblemente del orden de $V1/100$ ml/minuto.
- En esta segunda etapa de despolimerización, y según un modo de realización preferido de la presente invención, el EPS GY 785 sulfatado está presente en la mezcla de reacción a una concentración comprendida entre aproximadamente 2 y 10 mg/ml de mezcla de reacción.
- Los catalizadores metálicos utilizables en la etapa de despolimerización se eligen preferiblemente entre los iones Cu^{++} , Fe^{++} , Cr^{+++} y el anión $Cr_2O_7^{2-}$ tales como se describen especialmente en la solicitud de patente EP-A-0.221.977.

Según un modo de empleo preferido de la presente invención, el catalizador metálico está presente en la mezcla de reacción a una concentración comprendida entre 10^{-3} M y 10^{-1} M aproximadamente, y aún más preferiblemente a una concentración comprendida entre 0,001 y 0,05 M aproximadamente.

- 5 Cuando se termina la reacción, el procedimiento usado según la invención puede comprender, además, una etapa suplementaria de reducción de los derivados polisacarídicos obtenidos, con la ayuda de un agente reductor, de forma que se estabilicen las cadenas cuyos extremos reductores sean muy reactivos y especialmente para evitar la hidrólisis de las cadenas mediante la reacción llamada de "exfoliación".

La naturaleza de los agentes reductores utilizables con este fin no es crítica. Puede tratarse especialmente de borhidruro de sodio.

- 10 Cuando se terminan las reacciones, los derivados polisacarídicos resultantes de la despolimerización pueden recogerse mediante cualquier técnica apropiada bien conocida por el especialista en la materia tal como, por ejemplo, mediante ultrafiltración por membrana.

- 15 El procedimiento de despolimerización radicalica según la invención tal como se describe anteriormente permite obtener, en una sola etapa sin fraccionamiento preparativo mediante cromatografía de exclusión estérica y con un buen rendimiento, derivados polisacarídicos sulfatados muy homogéneos, de masa molecular inferior o igual a 25.000 g/mol.

- 20 En el marco de la exposición de la presente invención, se entiende por "derivado homogéneo" un derivado que, en cromatografía de exclusión estérica de alta resolución, presenta un solo pico principal que representa una población mayoritaria de cadenas polisacarídicas de tamaño homogéneo caracterizada por una M_c = masa cromatográfica o masa de pico cercana a 20.000 y un índice de polidispersidad (calculado tomando la relación M_p/M_n) inferior a 2 y, preferiblemente, comprendido entre 1,5 y 2.

Como se demuestra en los ejemplos siguientes, los derivados así obtenidos presentan actividad de modulación de la angiogénesis. Permiten en particular favorecer la reparación del endotelio vascular con un bajo efecto anticoagulante.

- 25 Las composiciones farmacéuticas que contienen los derivados polisacarídicos obtenidos según la invención pueden usarse además en asociación con uno o varios factores de crecimiento presentes en dicha composición farmacéutica o presentes en una composición farmacéutica distinta que se administrará entonces de forma separada, es decir, antes, al mismo tiempo o después que la administración de la composición farmacéutica que incluye los derivados polisacarídicos. Dichos factores de crecimiento pueden elegirse en particular entre FGF, VEGF, HGF ("factor de crecimiento de hepatocitos" y PGF ("factor de crecimiento de placenta").

Teniendo en cuenta sus propiedades de modulación de la angiogénesis, los derivados polisacarídicos tales como se definen anteriormente pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica de actividad proangiogénica, más particularmente destinada a la terapia cardiovascular, permitiendo especialmente dicha composición favorecer la revascularización y remodelación vascular y prevenir y/o tratar la isquemia.

- 35 Las composiciones farmacéuticas obtenidas según la invención se destinan preferiblemente a administrarse por vía genérica (oral, subcutánea o intravenosa). Igualmente, pueden administrarse localmente, en forma de geles, cremas, pomadas, lociones, etc...

Pueden administrarse igualmente *in situ* a través de sustratos, de dispositivos reabsorbibles o no tales como, por ejemplo, soportes de liberación retardada o esponjas de disgregación lenta.

- 40 La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda del complemento descriptivo siguiente, que se refiere (i) a un ejemplo de preparación de derivados polisacarídicos sulfatados a partir de EPS GY 785 (EPS SDR) producido por la bacteria marina de origen hidrotérmico *Alteromonas infernus*, empleando el procedimiento tal como se define anteriormente, (ii) a un ejemplo referente al efecto de un derivado de EPS SDR sobre la proliferación de células endoteliales inducida por FGF-2, (iii) a un ejemplo referente al efecto de un derivado de EPS SDR sobre la proliferación de células endoteliales inducida por VEGF, (iv) a un ejemplo de evidenciación del efecto de EPS SDR sobre la migración de células endoteliales inducida por FGF-2 o VEGF, (v) a ejemplos que estudian el efecto de EPS SDR sobre la diferenciación de células endoteliales inducida por FGF-2 o VEGF.

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE UN DERIVADO DE EPS GY 785 ALTAMENTE SULFATADO Y DE BAJA MASA MOLECULAR

- 50 1) Sulfatación química de EPS GY 785

Se disolvieron 500 mg de liofilizado de EPS GY 785 producido por la bacteria marina de origen hidrotérmico *Alteromonas infernus* según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 de la patente FR 2.755.142 en 100 ml de DMF anhidra con agitación suave (250 rpm) durante 2 horas a temperatura ambiente y después durante 2 horas a una temperatura de 45°C.

Cuando se completó la disolución, se añadieron 2,5 g de complejo de piridina-SO₃ comercializado con la referencia 84737 por la compañía Fluka (o sea 5 veces la masa del polisacárido GY 785) al medio de reacción. Se llevó enseguida la temperatura de la mezcla a 45°C y se mantuvo durante 2 horas con agitación. Se transfirió la mezcla de reacción a un vaso de precipitados. Se detuvo entonces la reacción mediante la adición de 40 ml de agua y después se llevó el pH a 9 con sosa 3 M. Se dializó entonces la mezcla de reacción en un tubo de diálisis que presentaba un umbral de corte comprendido entre 12.000 y 16.000 Da frente a agua del grifo (1 noche con agua corriente) y después 3 veces durante 24 horas frente a agua Milli-Q.

Después de la diálisis, se congeló la solución que contenía EPS GY 785 sulfatado y se liofilizó.

2) Despolimerización radicalica y reducción con borhidruro de sodio

Se disolvieron 400 mg de EPS GY 785 sulfatado obtenido anteriormente en la etapa anterior en 95 ml de agua. Después de la disolución, se añadieron 2 ml de una solución catalítica que contenía 36 mg de acetato de cobre monohidratado (10⁻³ M). Se lleva entonces la temperatura del reactor a 60°C y se ajusta el pH a 7,5 mediante la adición de sosa 1 M. Se añadió entonces una solución de peróxido de hidrógeno al 0,115 % (v/v) a un caudal de 1 ml por minuto, y se reguló el pH a alrededor de 7,5 mediante la adición de sosa 1 M. Se detuvo la reacción al cabo de 1 hora.

Se realiza la reducción al final de la despolimerización mediante la adición de borhidruro de sodio al reactor (270 mg de NaBH₄ disueltos en 10 ml de agua). La reducción se desarrolla con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se detiene la reacción mediante la adición de ácido acético 10 N que permite eliminar el exceso de NaBH₄ restante en forma de desprendimiento gaseoso de hidrógeno. Se filtró a continuación la solución por Büchner con filtros de microfibras de vidrio (3 mm de porosidad). Se eluyó la solución filtrada por una columna CHELEX® 20 (BIORAD) con el fin de eliminar el cobre residual. Se ultrafiltró a continuación la solución descontaminada con un módulo (umbral de corte de 1.000 Da) y después se liofilizó.

3) Caracterización del derivado sulfatado y después despolimerizado EPS GY 785 (EPS SDR); comparación con el EPS GY 785 nativo

Se determinaron las masas moleculares (Mc: masa molecular cromatográfica determinada en el máximo del pico; Mp y Mn) y la polidispersidad ($I = M_p/M_n$) del derivado sulfatado y después despolimerizado de EPS GY 785 obtenido anteriormente mediante cromatografía de exclusión estérica de alta resolución (HPSEC) en una cadena Kontron, en acetato de amonio acuoso 0,1 M a un caudal de 0,5 ml/min usando una columna Superdex® 200 (PHARMACIA). Se calibró la columna con los siguientes patrones polisacáridicos: pululanos: 853.000-5.800 g/mol (Polymer Laboratories, Interchim), dextrano: 1.500 g/mol; melecitosas: 522 g/mol (FLUKA), sacarosa: 342 g/mol; glucosa: 180 g/mol (SIGMA). Se analizan los resultados usando el software Aramis® (JMBS Développement, Le Fontanil, Francia).

Se determinó el contenido de osas neutras mediante el procedimiento de Tillmans y Philippi (*Analyt. Chem.*, 1929, 28, 350-) modificado por Rimington (*Biochem. J.*, 1931, 25, 1062-1071).

Se estableció el contenido de ácidos urónicos usando una modificación del procedimiento de m-hidroxidifenil-H₂SO₄ (Filisetti-Cozzi y Carpitta, *Anal. Biochem.*, 1991, 197, 157-162) y usando ácido glucurónico como patrón. Se evitó la interferencia de las hexosas naturales usando sulfamato de potasio y procediendo a controles que comprenden todos los reactivos a excepción del m-hidroxidifenilo.

Se determinaron los contenidos de osas neutras y ácidas mediante cromatografía en fase gaseosa. Se realizó el análisis de los residuos glucosídicos en forma de derivados trimetilsililados según el procedimiento de Kamberling *et al.* (*Biochem. J.*, 1975, 151, 491-495) y modificado por Montreuil *et al.* ("Glycoproteins" en: "Carbohydrate analysis, a practical approach", 1986, Chaplin M.F. y Kennedy J.F. (eds), IRL Press, Oxford, 143-204).

Se determinaron los contenidos de sulfatos totales (libres más ligados al derivado sulfatado y después despolimerizado de EPS GY 785 y a EPS GY 785 nativo) mediante análisis elemental del azufre (% de S) y aplicando la siguiente relación: porcentaje de grupos sulfato (%) = 3,22 x % de S. La tasa de sulfatos libres se cuantifica mediante cromatografía de intercambio de iones en un sistema Dionex® DX-500 ligado a un conductímetro y siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante Dionex. El resultado obtenido permite calcular la tasa de sulfatos realmente ligados al derivado de EPS, que es igual a la tasa de sulfatos totales (obtenida mediante análisis elemental) menos la tasa de sulfatos libres (obtenida mediante cromatografía de intercambio de iones).

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF) se realizó en un Vector 22 que poseía una resolución de 4 cm⁻¹. Los espectros infrarrojos de los polisacáridos se realizaron en pastillas de KBr (se mezclan 2 mg de polisacárido con 200 mg de KBr seco) y todos los espectros infrarrojos se registraron a entre 4000 y 400 cm⁻¹.

Se determinaron las actividades anticoagulantes del derivado sulfatado y después despolimerizado de EPS GY 785 y de EPS GY 785 nativo mediante la medida del tiempo de cefalina activada (TCA) usando el kit TCA (Organon

Teknika). Para hacer esto, se mezclan 100 µl de un tampón de control o de diluciones del derivado sulfatado y después despolimerizado de EPS GY 785 o de EPS GY 785 nativo (0 a 100 µg/ml) con 100 µl de plasma pobre en plaquetas (PPP) y 100 µl de reactivo TCA. Se incubó el conjunto durante 3 minutos a 37°C. Se mide el tiempo de formación del coágulo después de la adición de 100 µl de una solución de CaCl₂ 25 mM.

5 4) Resultados

Se reunieron los resultados obtenidos en la tabla I siguiente:

TABLA I

Características	Derivado sulfatado y despolimerizado de EPS GY 785 (EPS SDR)	EPS GY 785 nativo
Rendimiento (%)	70	-
Osas totales (g/100 g) ¹	31	58
Osas ácidas (g/100 g) ¹	20	29
Ramnosa ²	1,7	2,7
Manosa ²	1,6	2,8
Fucosa ²	0,5	1,3
Xilosa	0,2	0,3
Galactosa ²	7,3	12,7
Glucosa ²	9,4	17
Ácido galacturónico ²	1,5	3,2
Ácido glucurónico ²	2,3	6
-SO ₃ Na total (g/100 g) ³	40	10
SO ₃ Na ligado (g/100 g) ⁴	37	-
Mc (g/mol)	22430	>10 ⁶
Mp (g/mol)	20240	-
Mn (g/mol)	11240	-
I (Mp/Mn)	1,8	-
Actividad anticoagulante ⁵	10-20	Inactivo
¹ : Valoraciones colorimétricas ² : Valoración por cromatografía en fase gaseosa ³ : Valoración por análisis elemental ⁴ : Valoración por cromatografía de intercambio de iones ⁵ : Cantidad de polisacárido en mg/ml de plasma humano necesario para duplicar el tiempo de coagulación del control, TCA (tiempo del control: 40 segundos).		

Estos resultados muestran que se obtiene con un buen rendimiento el derivado sulfatado y después despolimerizado de EPS GY 785 y que los contenidos de osas son proporcionalmente equivalentes entre el derivado sulfatado y el EPS nativo naturalmente poco sulfatado. El contenido de azufre del producto sobresulfatado es 4 veces superior al del producto nativo. Mediante despolimerización radicalica, se obtiene en 1 hora un derivado de masa molecular (Mc y Mp) igual a 20.000 g/mol de tamaño homogéneo (I<2) a partir de EPS GY 785 sobresulfatado de muy alta masa molecular (>10⁶ g/mol). Solo el derivado sulfatado y después despolimerizado de EPS GY 785 es anticoagulante; duplica el tiempo de coagulación del control para una concentración cercana a 15 µg/ml. A modo comparativo, en las

mismas condiciones hace falta heparina de bajo peso molecular 4 µg/ml y heparina no fraccionada 1,5 µg/ml para obtener esta duplicación. Así, el derivado sulfatado y después despolimerizado de EPS GY 785 es respectivamente 4 y 10 veces menos anticoagulante que una heparina de bajo peso molecular o que una heparina no fraccionada.

5 EJEMPLO 2: EFECTO DEL DERIVADO DE EPS GY 785 ALTAMENTE SULFATADO Y DE BAJA MASA MOLECULAR SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDA POR FGF-2

Se comparó el efecto del derivado sulfatado y de bajo peso molecular de EPS GY 785 (EPS SDR) según la invención y el preparado anteriormente en el ejemplo 1 sobre la proliferación de células endoteliales extraídas de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) con el del derivado nativo despolimerizado (EPS DR), es decir, que se había obtenido mediante despolimerización radicalica.

10 a) Preparación de EPS DR

Se prepararon estos derivados a partir de liofilizado de EPS GY 785 producido por la bacteria marina *Alteromonas infernus* según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 de la patente FR 2.755.142.

Se preparó el EPS DR según un procedimiento que solo emplea la etapa de despolimerización radicalica como se describe anteriormente en el párrafo 2) del ejemplo 1.

15 Se determinaron las características de los derivados de EPS DR según los procedimientos descritos anteriormente en el ejemplo 1 y se resumen en la tabla II siguiente:

TABLA II

Características	EPS DR
Osas totales (g/100 g) ¹	51
Osas ácidas (g/100 g) ¹	38
-SO ₃ Na total (g/100 g) ²	10
Mc (g/mol)	7800
Mp (g/mol)	17300
Mn (g/mol)	6000
I (Mp/Mn)	2,8
Actividad anticoagulante ³	Inactivo
¹ : Valoraciones colorimétricas ² : Valoración por análisis elemental ³ : Cantidad de polisacárido en µg/ml de plasma humano necesario para duplicar el tiempo de coagulación del control, TCA (tiempo del control= 40 segundos) nd: no determinado	

20 El derivado EPS DR está menos sulfatado que el derivado SDR. El análisis por HPSEC indica que el derivado EPS DR es de tamaño menos homogéneo que el derivado EPS SDR, con una polidispersidad de 2,8 frente a 1,8. Las cadenas polisacáridicas que componen el derivado EPS DR son mayoritariamente menores (Mc = 7800) que las del derivado EPS SDR (Mc= 22430). El derivado DR no tiene ninguna actividad coagulante, mientras que el derivado EPS SDR tiene una actividad coagulante para duplicar el tiempo de coagulación del control, TCA (tiempo del control= 40 segundos) de 10-20 µg de producto/ml de plasma.

25 b) Protocolo

30 Se siembran células HUVEC en pocillos recubiertos de gelatina al 0,5%. Después de 24 horas de incubación, se cambia el medio de cultivo: medio de control solo (medio de cultivo M199 (1 volumen) + RPMI 1640 (1 volumen) comercializados por la compañía Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, Francia, suplementado con 5% de suero fetal de ternero comercializado por la compañía ATGC, Noisy-le-Grand, Francia) o enriquecido en FGF-2 5 ng/ml (comercializado por la compañía AbCys SA, París, Francia) o en derivados de EPS solos (10 µg/ml) o en FGF-2 5 ng/ml + derivados de EPS (1 o 10 µg/ml). Se renueva el medio cada 2 días. Después de 3 días de tratamiento, se separan las células y se cuentan con la ayuda de una célula de Malassez.

c) Resultados

Se presentan los resultados en la tabla III siguiente:

TABLA III

Factores de crecimiento y/o polisacáridos	Aumento de la proliferación celular (en % con relación al FGF-2)
Control (sin FGF-2)	66,8 ± 5,3****
FGF-2	100
FGF-2 + EPS SDR (1 µg/ml)	107,3 ± 1,4
FGF-2 + EPS SDR (10 µg/ml)	120,9 ± 5,2*
FGF-2 + EPS DR (1 µg/ml) ⁶	89,6 ± 2,9
FGF-2 + EPS DR (10 µg/ml) ⁶	112,8 ± 6,9
⁶ : polisacáridos que no forman parte de la invención	
*: p < 0,05 y ****: p < 0,0001	

- 5 En la tabla III anterior, cada valor representa la media ± la desviación típica de cinco determinaciones. Para cada experimento, se expresan los resultados en %, correspondiendo 100% a las células tratadas con FGF-2 5 ng /ml solo.

Estos resultados muestran que, en comparación con el control (ausencia de factor de crecimiento y polisacárido) y con la adición de FGF-2 solo, se observa un aumento significativo de la proliferación celular en presencia de FGF-2 y EPS SDR a una concentración de 10 µg/ml.

EJEMPLO 3: EFECTO DEL DERIVADO DE EPS GY 785 SDR SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDA POR VEGF

Se estudió igualmente el efecto del derivado de EPS GY 785 tal como se sintetiza anteriormente en el ejemplo 1 sobre la proliferación de células endoteliales inducida por VEGF (comercializado por la compañía AbCys SA, París, Francia) según el mismo protocolo usado anteriormente en el ejemplo 2.

En este ejemplo, se usó VEGF a una concentración de 10 ng/ml y se separaron las células HUVEC y se contaron después de 6 días de tratamiento.

Se presentan los resultados obtenidos en la tabla IV siguiente:

TABLA IV

Factores de crecimiento o polisacárido	Aumento de la proliferación celular (en % con relación al VEGF)
Control (sin VEGF)	59,5 ± 4,9****
VEGF	100
VEGF + EPS SDR (10 mg/ml)	137,6 ± 10,7**
: p < 0,01 y **: p < 0,0001	

En la tabla IV anterior, cada valor representa la media ± la desviación típica de 4 determinaciones. Para cada experimento, se expresan los resultados en %, correspondiendo 100% a las células tratadas con VEGF 10 ng/ml solo.

EJEMPLO 4: EVIDENCIACIÓN DEL EFECTO DE EPS SDR SOBRE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDA POR FGF-2 O VEGF

1) Protocolo

En este ejemplo, se usó el derivado EPS SDR tal como se prepara anteriormente en el ejemplo 1.

Los factores de crecimiento angiogénicos tales como FGF-2 y VEGF ejercen un efecto quimioattractor sobre las células endoteliales, lo que desencadena su migración. Se ha usado por los inventores un sistema que evidencia la migración orientada de las células endoteliales inducida por el factor angiogénico. Se trata del sistema de cámara de Boyden. Este sistema comprende dos compartimentos: una cámara superior o inserto que contiene un medio de cultivo (medio de cultivo idéntico al que se describe en b) del ejemplo 2 anterior) pobre en factores angiogénicos (FGF-2: 1 ng/ml y VEGF: 1 ng/ml) y una cámara inferior o pocillo que contiene un medio de cultivo idéntico al de la cámara superior pero rico en factores angiogénicos (FGF-2: 10 ng/ml y VEGF: 10 ng/ml), estando separadas estas dos cámaras por una membrana porosa. Se depositan células endoteliales sobre la cara superior de la membrana porosa que separa las dos cámaras. Bajo el efecto del gradiente de concentraciones de factor angiogénico así creado entre los dos compartimentos, se arrastran las células endoteliales hacia el compartimento más concentrado en factor angiogénico (cámara inferior).

Se evaluó el efecto del derivado de EPS SDR 10 µg/ml, añadido o no en los dos compartimentos de la cámara de Boyden, sobre la migración orientada de células endoteliales.

Gracias a esta migración orientada, y después de 6 horas de incubación, se localiza una parte de las células sobre la cara inferior de la membrana. Se ensayó cada condición 3 veces por duplicado cada vez. Se fijan y colorean solo las células que migraron (localizadas sobre la cara inferior) con vistas a un recuento por microscopía óptica.

2) Resultados

En presencia de factores de crecimiento solos (FGF-2 o VEGF), es decir sin derivado de EPS SDR, aumentaba significativamente la migración de células un 40% ($p < 0,0001$) con relación al control (migración de células a partir de un medio de cultivo que no contiene ni factor de crecimiento ni derivado de EPS). La adición de derivado EPS SDR 10 µg/ml al FGF-2 disminuye significativamente un 20% ($p < 0,05$) la migración de células con relación a la inducida por FGF-2 solo. La adición del mismo derivado a la misma concentración de VEGF no modifica la migración de células con relación a la observada en presencia de VEGF solo.

EJEMPLO 5: EFECTO DE EPS SDR SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDA POR FGF-2. COMPARACIÓN CON EPS DR

En este ejemplo, se usó EPS SDR tal como se prepara anteriormente en el ejemplo 1, así como EPS DR tal como se prepara anteriormente en el ejemplo 2.

1) Protocolos

a) Angiogénesis *in vitro* sobre Matrigel®

A partir de un modelo de angiogénesis *in vitro*, se mostró que el fucano (polisacárido sulfatado de alga marrón), al contrario que la heparina no fraccionada, potencia el efecto angiogénico del FGF-2 sobre las células endoteliales humanas de macrovasos (Matou *et al.*, 2002, anteriormente citado).

Se usó en este ejemplo el mismo sistema experimental que el usado en el artículo de Matou *et al.* para el estudio del efecto de EPS frente a FGF-2.

Este sistema consiste, en un primer momento, en tratar células endoteliales HUVEC con FGF-2 en presencia del derivado de EPS (EPS SDR, EPS DR) durante 72 horas. Para ello, se siembran las células en pocillos recubiertos de gelatina al 0,5%. La concentración de FGF-2 usada es 5 ng/ml, la concentración más usada en los modelos *in vitro* de angiogénesis y la de EPS es de 10 µg/ml.

Se separan entonces las células así tratadas con Versène® (Gibco) y colagenasa al 0,01% y se depositan (en ausencia de polisacáridos y/o de factor angiogénico) sobre una membrana basal reconstituida denominada Matrigel® (comercializada por la compañía Becton Dickinson, Bedford, MA, EE.UU.); este sistema permite evaluar el efecto del EPS ensayado sobre la diferenciación de células endoteliales inducida por FGF-2.

En contacto con esta membrana basal, las células endoteliales van a organizarse (o no) en una estructura tubular, según su grado de diferenciación. Después de 18 horas de incubación a una temperatura de 37°C, se fijan las células con glutaraldehído y se colorean después con Giemsa.

Se cuantifica la longitud de los tubos vasculares mediante análisis de imagen gracias a un software de medida (Mesurim® proporcionado por la Universidad de Amiens, <http://www.ac-amiens.fr>). Para cada pocillo, se efectúa una numeración de 5 campos (4 cuadrantes y el centro).

b) Sobreexpresión de las subunidades de integrina α6

Se ha mostrado anteriormente que el efecto de un polisacárido sulfatado (familia de los fucanos) sobre la diferenciación de HUVEC estaba acompañado de la sobreexpresión de la subunidad de integrina α6 (Matou *et al.*, 2002, anteriormente citado). Se cuantificó la sobreexpresión de la subunidad de integrina α6 en la superficie de células endoteliales HUVEC cultivadas sobre gelatina en ausencia o presencia de FGF-2 y con o sin derivado de

EPS SDR, y se separaron como se describe anteriormente. Se realizó la cuantificación mediante citometría de flujo. Se incubaron las células durante 30 minutos a una temperatura de 4°C con el anticuerpo anti- $\alpha 6$ (comercializado por la compañía BD Biosciences & Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU. con la referencia 555736). Se analizaron después las células mediante inmunofluorescencia con un citómetro de flujo FACSCalibur® (BD Biosciences).

5 2) Resultados

Se reseñan los resultados obtenidos en la tabla V siguiente:

TABLA V

Factores de crecimiento y/o polisacáridos	Diferenciación celular inducida por FGF-2 (en % con relación al FGF-2)
Control (sin FGF-2)	Ningún tubo formado
FGF-2	100
FGF-2 + EPS SDR (10 μ g/ml)	156,2 $\pm$ 4,1**
FGF-2 + EPS DR (10 μ g/ml) ^b	109,6 $\pm$ 13,2
^b : derivado que no forma parte de la invención	
** : p<0,01.	

Cada valor representa la media $\pm$ la desviación típica de 3 determinaciones.

- 10 Estos resultados muestran que, en ausencia de factor de crecimiento y de derivados de EPS (control), las células no forman tubos vasculares después de 18 horas en Matrigel®. En presencia de FGF-2 solo, las células se organizan en tubos vasculares para formar una red tridimensional vascular de tipo capilar. El FGF-2 y el derivado EPS SDR añadidos conjuntamente al cultivo celular permiten aumentar significativamente la densidad de la red. Efectivamente, mediante la adición de un derivado polisacárido obtenido según un procedimiento tal como se usa según la
- 15 presente invención a células tratadas con FGF-2, la longitud total de las estructuras tubulares aumenta significativamente un 56% (p<0,01) con relación a la obtenida en presencia de FGF-2 solo.

A modo comparativo, no se obtuvo ningún aumento significativo de la formación de tubos vasculares inducida por el FGF-2 con los derivados EPS DR obtenidos según procedimientos que no forman parte de la invención.

- 20 En lo que se refiere a la expresión de las subunidades de integrina $\alpha 6$, se ensayó solo el derivado de EPS SDR obtenido según el procedimiento empleado según la invención. El tratamiento de células con FGF-2 solo induce una sobreexpresión significativa (p<0,0001) de las subunidades de integrina $\alpha 6$; esta expresión es 4 veces superior a la del control (células no tratadas). Añadido al FGF-2, el derivado EPS SDR según la invención aumenta significativamente un 72% (p<0,001) la expresión de la subunidad de integrina $\alpha 6$ con relación a la observada en presencia de FGF-2 solo. El derivado EPS SDR no tiene ningún efecto en ausencia de FGF-2.

- 25 El conjunto de estos resultados muestra que solo el derivado EPS SDR obtenido según el procedimiento de preparación usado según la invención, es decir en el que la etapa de sulfatación química precede a la etapa de despolimerización radicalica, potencia el efecto angiogénico de FGF-2 de forma significativa y reproducible.

EJEMPLO 6: EFECTO DE EPS SDR SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDA POR VEGF

30 1) Protocolos

a) Angiogénesis *in vitro* en Matrigel®

- El VEGF, otro factor angiogénico igualmente muy importante, es conocido por ser más específico de células endoteliales que FGF-2. El sistema de estudio dispuesto para evaluar el efecto de FGF-2 sobre la diferenciación de células endoteliales en Matrigel® y tal como se describe anteriormente en el ejemplo 5 no permite observar una
- 35 formación de tubos vasculares en presencia de VEGF.

Se ha previsto por tanto el cambio del soporte proteico y se ha elegido colágeno de tipo I (extraído de cola de rata, comercializado por la compañía Biogenesis, Poole, RU) para reemplazar a la gelatina del sistema descrito en el ejemplo 5. Desde el día siguiente a la siembra de las células HUVEC, se cambia el medio de cultivo por medio enriquecido o no en VEGF (10 ng/ml) con o sin EPS SDR a razón de 10 μ g/ml).

Después de 6 días de este tratamiento, se separan las células con Versène® (Gibco) y colagenasa al 0,1% y después se depositan en Matrigel®. Se observan estructuras tubulares como se describe en el ejemplo 5 anterior.

b) Sobreexpresión de las subunidades de integrina $\alpha 6$

- 5 Se efectuó una cuantificación de la subunidad de integrina $\alpha 6$ mediante citometría de flujo como se describe anteriormente en el ejemplo 5.

2) Resultados

Sobre Matrigel®, las células no tratadas con VEGF en presencia o no del derivado EPS SDR no forman estructura tubular. En presencia de VEGF solo, las células forman una red tridimensional vascular parcial. La adición del derivado EPS SDR al VEGF aumenta la densidad de esa red.

- 10 El tratamiento de células con VEGF aumenta significativamente la expresión de la subunidad de integrina $\alpha 6$ por un factor de 2 ($p < 0,001$), en comparación con células no tratadas. La adición del derivado EPS SDR a este tratamiento con VEGF aumenta significativamente un 54% ($p < 0,001$) la expresión de la subunidad de integrina $\alpha 6$ con relación a la observada en presencia de VEGF solo.

- 15 El conjunto de estos resultados muestra que el derivado EPS SDR obtenido según un procedimiento de preparación en el que la etapa de sulfatación precede a la etapa de despolimerización puede usarse para la preparación de un medicamento destinado a modular la angiogénesis.

REIVINDICACIONES

1. Uso de derivados polisacarídicos sulfatados que presentan una masa molecular inferior o igual a 25.000 g/mol, un índice de polidispersidad inferior a 2 y una tasa de sustitución en grupos sulfato inferior o igual a un 45%, obteniéndose dichos derivados según un procedimiento de preparación que comprende al menos las etapas siguientes:
5
- una primera etapa de sulfatación química que comprende:
 - a) una primera subetapa de disolución, en un disolvente anhidro, de un polisacárido liofilizado GY 785 producido por la bacteria marina *Alteromonas infernus* y
 - 10 b) una segunda subetapa de adición, a una temperatura comprendida entre 45 y 60°C, de al menos un agente de sulfatación química en una cantidad suficiente para conducir a derivados polisacarídicos sulfatados que presentan una tasa de sustitución en grupos sulfato inferior o igual a un 45% en peso en base al peso total del polisacárido GY 785 sulfatado;
- una segunda etapa de despolimerización radicalica del polisacárido sulfatado obtenido en la etapa anterior para conducir a un polisacárido sulfatado que presenta una masa molecular inferior o igual a 25.000 g/mol y un índice de polidispersidad inferior a 2,
15
- para la preparación de una composición farmacéutica destinada a una actividad proangiogénica para la terapia cardiovascular.
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque**, desde la primera etapa, se usa EPS GY 785 liofilizado en estado nativo o en forma de sal de adición con una base.
3. Uso según la reivindicación 2, **caracterizado porque** se usa EPS GY 785 liofilizado en forma de una sal de adición con una base fuerte o débil elegida entre piridina, trietilamina, tributilamina, hidróxido de tetrabutylamonio y sosa.
20
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el disolvente anhidro se elige entre dimetilformamida, dimetilsulfóxido y formamida.
5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la cantidad de EPS GY 785 presente en el disolvente anhidro está comprendida entre 1 y 10 mg/ml.
25
6. Uso según la reivindicación 5, **caracterizado porque** la cantidad de EPS GY 785 presente en el disolvente anhidro está comprendida entre 1 y 5 mg/ml.
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque**, en la subetapa a), la disolución de EPS GY785 en el disolvente anhidro se realiza con agitación a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas y después a una temperatura comprendida entre 40 y 50°C durante 2 horas en atmósfera de argón con tamiz molecular.
30
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el o los agentes de sulfatación química usados en la subetapa b) se eligen entre los complejos de sulfato de piridina, sulfato de trietilamina y sulfato de trimetilamina.
35
9. Uso según la reivindicación 8, **caracterizado porque**, en la subetapa b), el o los agentes de sulfatación química se añaden a la solución de EPS GY 785 en una cantidad ponderada que representa de 4 a 6 veces la masa de EPS GY 785 en solución.
10. Uso según la reivindicación 9, **caracterizado porque** la reacción de sulfatación química se conduce con agitación durante un periodo comprendido entre 2 y 24 horas.
40
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la reacción de sulfatación química se detiene después del enfriamiento del medio de reacción:
 - o bien mediante la adición de agua en una proporción igual a 1/10 del volumen de reacción y ajuste del pH del medio de reacción a 9 con un agente alcalinizante;
 - 45 - o bien mediante precipitación en presencia de acetona saturada de cloruro de sodio o metanol y después disolución del precipitado en agua.
12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la segunda etapa de despolimerización radicalica se realiza mediante la adición a la mezcla de reacción que comprende EPS GY 785 sulfatado en presencia de un catalizador metálico de una solución de agente oxidante; efectuándose dicha adición en continuo y con agitación durante un periodo comprendido entre 30 minutos y 10 horas.
50

13. Uso según la reivindicación 12, **caracterizado porque** la mezcla de reacción se mantiene a un pH comprendido entre 6 y 8 mediante la adición continua de un agente alcalinizante, y a una temperatura comprendida entre 30 y 70°C, durante todo el periodo de reacción de despolimerización radicalica.
- 5 14. Uso según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, **caracterizado porque** el agente oxidante se elige entre los peróxidos y los perácidos.
15. Uso según la reivindicación 14, **caracterizado porque** el agente oxidante es una solución de peróxido de hidrógeno que se añade a un caudal comprendido entre V1/1000 y V1/10 ml/minuto, siendo V1 el volumen del medio de reacción que contiene el derivado sulfatado de EPS GY785 al que se añade la solución de peróxido de hidrógeno.
- 10 16. Uso según la reivindicación 14, **caracterizado porque** la solución de agente oxidante usada en la segunda etapa es una solución de peróxido de hidrógeno que presenta una concentración comprendida entre 0, 1% y 0,5% en peso y que se añade a la mezcla de reacción a un caudal comprendido entre V1/50 y V1/500 ml/minuto.
- 15 17. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque**, en la segunda etapa de despolimerización, el EPS GY 785 sulfatado está presente en la mezcla de reacción a una concentración comprendida entre 2 y 10 mg/ml de mezcla de reacción.
18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, **caracterizado porque** los catalizadores metálicos utilizables en la etapa de despolimerización se eligen preferiblemente entre los iones Cu^{++} , Fe^{++} , Cr^{+++} y el anión $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$.
- 20 19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, **caracterizado porque** el catalizador metálico está presente en la mezcla de reacción a una concentración comprendida entre 10^{-3} M y 10^{-1} M.
20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el procedimiento de preparación comprende una etapa suplementaria de reducción de los derivados polisacarídicos obtenidos con la ayuda de un agente reductor.
- 25 21. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la composición farmacéutica se usa en asociación con uno o varios factores de crecimiento.
22. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado porque** dicha composición farmacéutica está destinada a prevenir y/o tratar la isquemia.
- 30 23. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado porque** dicha composición farmacéutica está destinada a favorecer la revascularización y remodelación vasculares.