

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: caveller@caveller.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72-35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 211-8650 (57) (1) 540-0860

206

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04129790 00000003 Folios: 124
Fecha (AND): 2005-11-11 17:18:13
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NDCI 329 COMPLEMEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Trámite : 011
Evento : 379
Actuación: 411

Referencia : Expediente No. 04.129.790
Asunto : Solicitud de patente para
PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE
DERIVADOS DE N-ACIL-(EPI)K5-AMINA-O-
SULFATO Y PRODUCTOS ASÍ OBTENIDOS
Solicitante : GLYCORES 2000 S.r.l.
Fecha de solicitud : 29 de Diciembre 2004

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto identificado en la referencia, atentamente presento junto con este escrito modificaciones voluntarias de la descripción y del capítulo reivindicatorio.

2. El solicitante justifica las modificaciones efectuadas de la siguiente manera:

2.1 Las modificaciones de la página 18 de la descripción permiten que la descripción de las Figuras 1 y 2 complementen los Ejemplos 1 y 2 de la siguiente manera:

- El ejemplo 1 ilustra una (epi) K5-amina-O-sobre sulfato presentando un grado de sulfatación de 3.55, y la figura 1 da

el espectro de H-NMR del (epi)K5-amina-0-sobre sulfato. Con la presente modificación, el nombre del producto es reportado correctamente y el grado de sulfatación dado en la página 18 concuerda con aquel planteado en el ejemplo 1.

- El ejemplo 2 ilustra un N-acil-(epi)K5-amina-0-sobre sulfato que presenta un grado de sulfatación DE 3.5, y la figura 2 da un espectro de H-NMR de dicha N-acil-(epi)K5-amina-0-sobre sulfato. La presente modificación muestra cómo el grado de sulfatación dado en la página 18 es consecuente con el valor reportado en el ejemplo 2.

2.2 Por otro lado, las modificaciones a las fórmulas (a), (b'), (II'b), (III'b), (b''), (IV'b), (b'') y (V'b) que se observan en los folios 55, 56, 59, 69, 70 y 74 así como en las reivindicaciones 37, 51, y 55, corrigen errores cometidos en el momento de la transcripción. Las presentes modificaciones muestran cómo la posición de los sustituyentes OR, OR' y OR'' concuerdan con las fórmulas correspondientes donde únicamente se muestra el disacárido en las fórmulas (II), (II'), (II'a), (III), (III'), (III'a), (IV), (IV'), (IV'a), (V), (V') y (V'a).

2.3 Otra modificación realizada en los folios 55, 59, 67, y 72 de la descripción es la sustitución de R'' por R, donde el significado del sustituyente no cambia debido a que R, R', y R'' representan hidrógeno o SO₃⁻ en todos los casos.

2.4 Finalmente con las presentes modificaciones, la reivindicación 11 que anteriormente mostraba dependencia con la reivindicación 5, muestra dependencia con la reivindicación 1 (folio 95). Este cambio se dio ya que el rango de peso molecular de la reivindicación 11 se encuentra dentro del rango medio de peso molecular de la reivindicación 1 que es mayor al de la reivindicación 5.

3. Junto con este memorial presento los siguientes documentos:

- 3.1 Formulario de modificaciones
- 3.2 Recibo de pago por valor de \$91.000
- 3.3 Folios que contienen las modificaciones de la descripción y las reivindicaciones descritas anteriormente

Atentamente solicito que se continúe con el trámite de la presente solicitud de patente teniendo en cuenta las modificaciones presentadas.

Bogotá,
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

2091

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

**FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-F03**

1		SOLICITUD DE:	
☐ Corrección de Error Material		☒ Modificación a una solicitud	
2 SOLICITANTE	Nombre: GLYCORES 2000 S.r.l sociedad constituida y existente bajo las leyes de Italia.		IDENTIFICACION
	Dirección: Via Mac Mahon, 43 I- 20155 Milán, Italia		
Nacionalidad o Domicilio: Milán, Italia.		C.C. ☐ NIT ☐	
Teléfono: 546 09 70 Fax: 547 31 70		C.E. ☐ Otro ☐	
E-mail: clientes@camyp.com		Número: _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: Emilio FERRERO		IDENTIFICACION
	Dirección: Carrera 4ª No. 72-35		
Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50		C.C. ☒ NIT ☐	
E-mail: caveller@caveller.com		C.E. ☐ Otro ☐	
Número: 438.019 TP 31.929			
4 Número de expediente: <u>04.129.790</u>			
5 Descripción de la corrección o modificación solicitada: <u>Presento modificaciones a la descripción y al capítulo reivindicatorio de la solicitud que buscan resaltar la patentabilidad de la presente invención. Las modificaciones no amplían el alcance de la invención.</u>			
6 Comprobante de pago No. <u>05-78.230</u> Fecha: <u>10 de Octubre 2005</u>			
7 Anexos			
☒ Comprobante de pago de la tasa por \$ 91.000			
☐ Poderes, si fuere el caso			
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.			
8			
NOMBRE: EMILIO FERRERO		FIRMA: 	
C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929			

Proceso para la preparación de derivados de
N-acil-(epi)K5-amina-O-sulfato-
y productos así obtenidos

Materia Objeto de la Invención

La presente invención se relaciona con nuevos derivados del polisacárido K5 con un alto grado de sulfatación, un proceso para su preparación, nuevos intermedios altamente o-sulfatados útiles en su síntesis y composiciones farmacéuticas que contienen dichos derivados de polisacáridos K5 como ingredientes activos, básicamente libres de actividad sobre la coagulación.

En particular, la invención se refiere a derivados de polisacárido K5 obtenidos partiendo con un polisacárido K5, previamente los N-desacetilados, N-sulfatados, opcionalmente despolimerizados u opcionalmente al menos 20 % C5-epimerizados y opcionalmente despolimerizados, mediante la O-sobresulfuración en condiciones adecuadas y la subsecuente N-acilación de la amina libre.

Antecedentes de la Invención

Los glicosaminoglicanos tales como la heparina, el sulfato de heparan, el sulfato de dermatan, el sulfato de condrotina y el ácido hialurónico son biopolímeros extraídos industrialmente de varios órganos animales.

En particular, la heparina, principalmente obtenida mediante la extracción de membranas de mucosa intestinal de cerdos o de el pulmón de bovinos, es un copolímero de polidispersado con una distribución de peso molecular de aproximadamente de 3000 a aproximadamente 30000 D que consiste de una mezcla de cadena que consiste básicamente de un ácido urónico (ácido glucurónico o ácido idurónico) y de un azúcar amino (glucosamina) ligado mediante enlaces α -1 $\rightarrow$ 4 o β -1 $\rightarrow$ 4. En la heparina, la unidad urónica puede ser O-sulfatada en la posición 2 y la unidad de glucosamina es N-acetilada o N-sulfatada, 6-O-sulfatada y 3-O-sulfatada en aproximadamente 0,5% de la unidades de glucosamina presentes.

Las propiedades y la biosíntesis natural de heparina en mamíferos ha sido descrita por Lindahl et al., 1986 en

lene, D. Y Lindahl, U. (editores) "heparin. Chemical and biological properties; clinical applications", Edward Arnold, London, pages 159-190, by Lindahl, U, Feingold D.S. and Rodén L, 1986 TIBS, 11, 221-225 y por Conrad H.E "Heparin Binding proteins", Chapter 2: Structure of Heparinoids. Academic Press, 1998. La biosíntesis de heparina ocurre partiendo con su precursor N-acetil-heparosan que consiste en una mezcla de cadenas que consisten de unidades de disacárido glucuronil- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetilglucosamina repetitivas. Dicho precursor sufre modificaciones enzimáticas que ionizan parcialmente el grupo N-acetilo, sustituyéndolo con un grupo SO_3 , epimeriza el carboxilo en la posición 5 de una parte de las unidades glucurónicas transformándolas en unidades idurónicas e introduciendo grupos O-sulfato para conseguir un producto del cual una vez extraído industrialmente tiene aproximadamente el doble del número de sulfato con relación a los grupos carboxy por unidad de disacárido. Estas modificaciones enzimáticas conducen, por ejemplo, a la formación de la región pentasacárido de un enlace de antitrombina III (ATIII), denominada pentasacárido activo, que es la estructura necesaria para la alta unión de afinidad de heparina al ATIII y

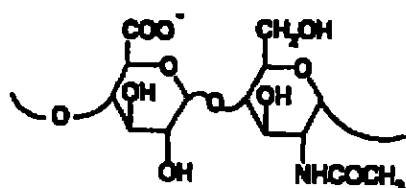
fundamental para la actividad anticoagulante y antitrombótica de la heparina misma. Este pentasacárido, presente solamente dentro de alguna de las cadenas las cuales forman heparina, contienen una unidad de glucosalina sulfatada en la posición 3 y un ácido glucurónico espaciado entre disacáridos que contienen ácidos idurónicos.

En la naturaleza, la formación de los pentasacáridos activos se hace posible por medio de la reacción de epimerización del carboxilo de una parte de las unidades glucurónicas en unidades idurónicas llevadas a cabo por glucuronil-C5-epimerasa (epimerización-C5) y mediante la sulfatación adecuada que también conduce a la introducción de un grupo sulfato sobre el hidroxilo de la posición 3 de la glucosamina. más particularmente, en la naturaleza la formación del pentasacárido activo se hace posible por en echo de que la epimerización C5 ocurre en grupos, es decir, sobre porciones de cadenas, y extensivamente la cual conduce a un producto que contiene más unidades idurónicas que aquellas glucurónicas. De echo, la heparina comercial contiene 70% de unidades idurónicas y 30 %.

A lo largo de las actividades anticoagulantes y antitrombóticas principales, la heparina también ejerce actividades antilipaémico, antiproliferativas, antivirales, antitumorosas, y antimestastáticas, pero su uso como una droga impedido por los efectos colaterales debidos a la acción anticoagulante que pueden originar sangrado.

TÉCNICA ANTERIOR

Es conocido que el polisacárido K5 capsular aislado de *Escherichia coli*, descrito por Vann W. F. Et al., en la revista Europea de bioquímica 1981, 116, 359-364 ("Vann 1981"), es consistente de una mezcla de cadena que consiste de la unidad de disacárido repetitiva glucuronil- β -1 $\rightarrow$ 4-N-acetil glucosamina y por lo tanto muestra la misma secuencia repetitiva (A)



(A)

Del precursor N-acetil-heparosan de la heparina. El polisacárido K5 capsular , denominado en lo sucesivo como "polisacárido K5" o más simplemente "K5", que químicamente modificado por Lormeau et al. Como se describió en la US 5,550, 116 y por Casu et al. Como se describió en Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284. Los K5-O-sulfatos que tienen actividades antitumorosas, antimetastáticas, antivirales, en particular anti-HIV son descritos en la EP 333243 y WO 98/34958. El K5 fue también química y enzimáticamente modificado con el fin de obtener productos que tienen actividad biológica in Vitro sobre la coagulación del mismo tipo que aquella de la heparina como se extrae de los órganos animales (heparina extractiva).

La obtención de los productos que tienen una actividad sobre la coagulación del mismo tipo como aquella de la heparina extractiva ocurre mediante procesos que imitan aquellos que ocurren en la naturaleza y prevé una etapa clave completa de la epimerización C5 con D-glucuronil C5 epimiraza.

Los procesos descritos en la IT 1230785, WO 92/17507, WO 96/14425 y WO 97/43317 utiliza K5 como el material de

partida. El K5 que se origina de la fermentación esta sometido a N-desacetilación seguida por N-sulfatación y sobre el K5-sulfato así obtenido epimerización C5 con epimerasa C5 en solución se desarrolla, obtenida mediante cromatografía de una solución de enzimas microsomales de mastositoma de ratón (IT 12030 785) o de hígado de bovino (WO 92/1750, WO 96/14425, y WO 97/43317).

La D-glucuronil C5 hepimerasa proveniente de hígado de bovino que se purifico por Campbell, P. et al. En J. Biol. Chem., 1994, 269/43, 26953-26958 ("Campbell 1994") quien también suministro su composición en amino ácidos y describió su uso y solución para la transformación de un K5-N-sulfato en el producto 30% epimerizado correspondiente, demostrando una formación de ácido idurónico mediante el método HPLC seguido por despolimerización nitrosa total a disacáridos.

El documento WO 98/48006 describe la secuencia de ADN que codifica para el D-glucuronil C5 epimerasa y un D-glucuronil C5 epimerasa recombinante, obtenido de un vector de expresión recombinante que contiene dicho AND, posteriormente purificado por Campbell et al. Como lo

212

mostró Shown by Jin-Ping L. Et al. In J. Biol. Chem. 2001, 276, 20069-20077 ("Jin-Ping 2001")

La secuencia completa de la epimerasa C5 se describió por Crawford B. E. Et al. In J. Biol.. Chem., 2001, 276(24), 21538-21546 (Crawford 2001)

El documento WO 01/72848 describe un método para la preparación de derivados de polisacáridos K5 N-desacetilados N-sulfatados al menos epimerizados el 40% de ácido idurónico con relación al total de los ácidos urónicos, que tienen un peso molecular desde 2.000 a 30,000, que contienen desde 25 hasta 50% de cadenas de alta afinidad para ATIII y que tienen un índice de actividad anticoagulante y antitrombótica expresada como HCII/antiXa de 1,5 a 4. Dicho documento describe la sobre sulfatación de K5-sulfato epimerizado 40-60% y muestra que el producto obtenido, cuyo ^{13}C -RMN es ilustrado, tiene un contenido de grupo sulfato por unidad de disacárido 2-3.5. Repitiendo la sobre sulfatación anteriormente mencionada en las condiciones descritas y examinando el ^{13}C -RMN se asegura que el producto obtenido es de hecho una amina libre cuyo contenido de 6-O-sulfato es de 80-95%,

de el 3-O-sulfato sobre el azúcar a 30%, pero cuyo grado de sulfatación es 3.2. También se establece que en las condiciones de sobre sulfatación descritas en la WO 01/72848 no se obtiene un grado de sulfatación de más de 3.2.

La solicitud de patente MI2001A/00397 (WO 02/068477), describe K5-n, O-sobresulfatado que tienen un grado de sobre sulfatación de más de 3.2, obtenido partiendo con un K5 libre de sustancias lipofílicas o una de sus porciones de peso molecular de aproximadamente de 5.000 mediante (a) N-desacetilación/N-sulfatación, (b) O-sobresulfatación y, opcionalmente, (c) N-resulfatación.

Ninguno de los documentos mencionados anteriormente describe el LMW-K5-N-sulfatos, opcionalmente 40-60% epimerizados en los cuales NH_2 o los grupos acetilo están virtualmente ausentes.

Con el fin de estandarizar la tecnología y hacer el texto más comprensible, en la presente descripción los términos convencionales y expresiones son utilizados en singular o en plural. En particular:

- por "K5" o "polisacárido K5" significa el polisacárido capsular de *Escherichia coli* obtenido por fermentación, es decir, una mezcla de cadenas que consiste de unidades de disacáridos (A) contienen opcionalmente un doble enlace en el extremo no reducido como si se mostraba anteriormente, en cualquier caso preparado y purificado de acuerdo con los métodos descritos en la literatura, en particular de acuerdo a Vann 1981, de acuerdo con Manzoni M. Et al., *Journal of Bioactive Compatible Polymers*, 1996, 11, 301-311 ("Manzoni 1996") de acuerdo con el método descrito en WO 01/72848 y en WO 02/068447; es obvio para una persona experta en la técnica que lo que se muestra en lo sucesivo se puede aplicar a cualquier N-acetilheparosan;
- - por "epimerasa C5" significa la D-glucoronil C-5 epimerasa, extraída o recombinante, en cualquier caso preparada, aislada y purificada, en particular, como se describió en Campbell 1994, en la WO 98/48006, en la Jin-Ping L. Et al. En J. Bio

Chem. 2001, 276, 20069-20077 (Jin-ping 2001) en Crawford 2001;

- -por amina K5 se significa al menos K5 N-desacetilada 95% pero generalmente en la cual los grupos acetilos son indetectables por un aparato RMN habitual;
- por "K5-N-sulfato" que significa al menos K5 N-desacetilada y N-sulfatada 95% como se describe en los sucesivo, pero en la cual los grupos acetilos son indetectables con un aparata de PMN normal;
- - por "epik5" significa que el K5 y sus derivados en los cuales 20-60% de las unidades glucurónicas son C5-epimerizadas a unidades idurónicas;
- - por "epik5-N-sulfato" que significa el K5-N-sulfato en el cual 20-60% de las unidades glucurónicas C5-epimerizadas a unidades idurónicas del tipo descrito en la WO 92/17507 o la WO 01/72848;

22

- - por "epik5-amina-O-sobresulfato" que significa una epik5-amina O-sulfatada con un grado de sulfatación de al menos 3.4;
- - por "N-acetil-epik5-amina-O-sobresulfato" que significa una épica5-amina O-sobresulfato, N-acilada, con un grado de sulfatación de al menos 3.4;
- por "K5-amina-O-sobresaturado" que significa una K5-amina O-sulfatada con un grado de sulfatación de al menos 2.2;
- por "N-acil-k5-amina-O-sobresulfato" que significa un K5-amina-O-sobresulfato N-acilada con un grado de sulfatación de al menos 2.2;
- además:
- los términos convencionales y expresiones definidos aquí anteriormente se refieren al K5 como aislado después de fermentación, generalmente con una distribución de peso molecular desde 1500 hasta

aproximadamente 50000 con un peso molecular medio de 10000-250000, ventajosamente de 15000-25000;

- - exceptuando la designación específica del peso molecular, los términos y expresiones convencionales de fluidos aquí anteriormente, cuando están presididos por el acrónimo "LMW" (bajo peso molecular), por ejemplo LMW-K5-N-sulfato, LMW-epik5-N-sulfato indican productos de bajo peso molecular, que tienen un peso molecular medio de hasta 12000;
- - los términos convencionales y expresión como se designo de la aquí anteriormente cuando son seguidos por el indicativo "bien derivado" como un todo tanto los derivados del K5 nativo como aquellos de el bajo peso molecular;
-
- el prefijo "(epi)", que precede a "K5" en términos convencionales y de expresiones como se diseñaron aquí anteriormente, indica como un todo tanto a los productos del K5 nativo como aquellos 20-60% epimerizados como se definió anteriormente, es

223

decir las mezclas de cadena todas consisten de ácido glucurónico, y 20-60% de ácido idurónico y se notan en las fórmulas por medio del símbolo " " ³

- por el término "aproximadamente" en referencia al peso molecular que significa el peso molecular [$\pm$ el peso teórico de una unidad de disacárido, incluyendo el peso del sodio, calculado como 461 en el caso de un (epi) K5-N-sulfato-derivado] medido mediante disco simetría de acuerdo a Johnson et al. Carb. Res. 1979, 51, 119-127 utilizando muestras cuyo peso molecular fue calculado mediante HPLC como el estándar;
- y ante la expresión "especies preponderantes", que significa el compuesto el cual, en la mezcla que constituye un Imw-(epi)K5-N-sulfato, o un Imw-(epi)K5-amina-O-sobresulfato, es el tipo más representado, determinado, por el pico de la curva del peso molecular medido mediante HPLC;
- a menos que se establezca específicamente otra cosa, el "grado de sulfatación" significa la

SO₃/COO, expresable también como el número de grupos sulfato por unidad de disacárido, medida con el método conducto métrico descrito por Casu B. Et al. En Carbohydrate Research, 1975, 39,, 168-176 (Casu 1975), el mismo utilizado en la WO 01/72848;

- por "condiciones de O-sobresulfatación" se significa una O-sulfatación extrema desarrollada por ejemplo de acuerdo con el método C descrito por B. Casu et al. En corbohydrare Research, 1994, 263, 271-284 (Casu 1994);
- por el termino "alquilo" que significa un alquilo lineal o ramificado, mientras que el termino "tetrabutylamino" indica el tetra-n-butylamonio.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se ha encontrado ahora que, partiendo de un epik5-N-sulfato, es posible obtener un epik5-amina-O-sulfato con un grado de sulfatación mayor que aquel de epik5-amina-O-sulfato descritos en la literatura, por ejemplo en la WO 01/72848, preparando la sal con una base orgánica

terciaria o cuaternaria de dicho derivado epik5-N-sulfato teniendo cuidado de permitirle a la mezcla de reacción permanecer durante un periodo de tiempo de 30-60 minutos manteniendo el pH a aproximadamente 7 con la misma base orgánica y luego tratando la sal obtenida con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobresulfatación. También un IMW-epik5-N-sulfato, cuando es sometido al mismo método de salificación y de O-sobre sulfatación, da un Imw-epik5-amina-O-sulfato con un extremadamente alto grado de sulfatación. En el caso de tales derivados epi-K5-amina-sobresulfato el grado de sulfatación es más de 3,2.

Similarmente, se encontró que aplicando las condiciones de O-sobre sulfatación descritas anteriormente a un Imw-K5-sulfato un Imw-K5-amina-O-sulfato se obtiene a un alto grado de sulfatación. También a K5-N-sulfato cuando es sometido al mismo método de salificación o de O-sobre sulfatación, da un K5-amina-O-sulfato con un alto grado de sulfatación. En el caso de tales derivados de K5-N-amina-O-sobre sulfato el grado de sulfatación es más de 22.

De echo, se encontró de manera sorprendente que, preparando la sal de tetrabutylamonio de un derivado (epi) K5-N-sulfato-derivado en las condiciones anteriormente dichas, la salificación se completaba y, durante la O-sobre sulfatación subsiguiente, se favorece en desplazamiento total del grupo sulfato desde el átomo de nitrógeno 2 en la glucosalina a los átomos de oxígeno de la glucosalina misma, en particular a el átomo de oxígeno en la posición 3, dando origen así a derivados de (epi)K5-amina-O-sulfato con un alto grado de sulfatación en el cual el grupo NH_2 es estrictamente libre. La diferencia cuantitativa en el grado de sulfatación del derivado de epik5 y K5 depende de su configuración que favorece la sulfatación de los derivados epimerizados.

También se a encontrado que sometiendo un derivado de (epi)K5-amina -O-sobre sulfato obtenido así a N-acilación, son obtenidos nuevos derivados de N-asil-(epi)K5-amina-O-sulfato libres de actividad sobre la coagulación y útiles para la preparación de composiciones farmacéuticas o cosméticas. Por este nuevo proceso versátil es posible así preparar de una manera reproducible derivados de epik5-O-sulfato, sus análogos N-acilo un K5-sulfato que tiene un grado de preciso de

sulfatación y, por encima de todo, sus derivados de bajo peso molecular y sus N-acilos análogos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 muestra el espectro del protón NMR de (epi)K5-amina-0-sobre sulfato con una proporción sulfato/carboxi de 3.55 (obtenida de acuerdo al ejemplo 1);

La figura 2 muestra el espectro de protón RMN de epik5-N cetilato, O-sulfato con una proporción sulfato/carboxi de 3.5 (obtenida de acuerdo con el ejemplo 2);

La figura 3 muestra el espectro de protón RMN de K5-N acetilato, O-sulfato con la proporción de sulfato/carboxi de 2.87 obtenida de acuerdo al ejemplo 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Así, de acuerdo a uno de sus aspectos, la presente invención suministra un proceso para preparación de N-acil-(epi)K5-amina-0-sobre sulfato, caracterizados por

- (a) un derivado de (epi)K5-N-sulfato, y en forma ácida, es tratado con un base terciara u orgánica cuaternaria, permitiéndole a la mezcla de reacción permanecer durante un periodo de tiempo de 30-60 minutes, manteniendo el pH de la solución a un valor de aproximadamente 7 y su sal es aislada con dicha base orgánica;
- (b) dicha sal de base orgánica de dicho derivado (epi)K5-N-sulfato se trata con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobre sulfatación
- (c) el producto así obtenido es tratado con un derivado funcional de un ácido carboxílico (C_2-C_4), el derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobre sulfato así obtenido es aislado.

De manera general el derivado de N-acilo-(epi)K5-amina-O-sobre sulfato es aislado en forma de sal sodio y opcionalmente dicha sal de sodio es transformada en otra sal química o farmacéuticamente aceptable.

En este contexto, el termino "químicamente aceptable" se refiere a un catión utilizable en síntesis química, tal como los iones sodio, amonio, (C_1-C_4) o para la

purificación del producto, mientras "farmacéuticamente aceptable" es auto explicativo.

Los cationes ventajosos sin aquellos derivados de metales alcalinos, metales alcalinos tales como, amonio, tetraalquilamonio (C_1-C_4), aluminio y zinc. Los cationes preferidos son los iones de calcio, sodio y tetrabutylamonio.

De acuerdo con un procedimiento ventajoso, la etapa (a) es llevada a cabo al pasar una solución de la sal de sodio del derivado (epi)K5-N-sulfato, es decir, que el polisacárido K5, previamente viene bien N-desacetilado, N-sulfatado preferiblemente el 100% opcionalmente 20-60% C5-epimerizado y opcionalmente despolimerizado con ácido nitroso, teniendo un peso molecular medio aproximadamente 1.000 a aproximadamente 25.000 ventajosamente y aproximadamente 1500 a aproximadamente 25.000, a través de una resina de intercambio iónico ácido, por ejemplo del tipo IR-120H⁺, que recolecta el elevado que incluye también el agua de desperdicio de la resina y neutralizar el elevado con base orgánica terciaria o cuaternaria, preferiblemente con una solución acuosa de hidróxido de

tetrabutylamonio. La solución se le permite permanecer durante 1 hora, manteniendo su pH en aproximadamente 7 es decir (tratando de mantener la neutralidad) mediante la adición de la misma base orgánica terciaria o cuaternaria, preferiblemente una solución acuosa de hidróxido de tetrabutylamonio, y la sal así obtenida se recupera mediante liofilización.

En la etapa (b) la O-sobre sulfuración ocurre utilizando un exceso de agente O-sulfatante y trabajando a una temperatura de 20 a 70°C durante un periodo de tiempo de hasta 24 horas en un solvente polar aprótico.

Ventajosamente, la sal con una base orgánica terciaria o cuaternaria del derivado (epi)K5-N-sulfato, es decir, del polisacárido k5, previamente N-desacetilado, N-sulfatado preferiblemente 100%, u opcionalmente 20-60% C5-epimerizado y opcionalmente despolimerizado en ácido nitroso, tiene un peso molecular aproximadamente de 1500 a aproximadamente 25000 como se dio en la etapa (a), es disuelto en dimetilformamida y tratado con 2-10 moles de un reactivo de O-sulfatación para cada hidroxilo libre a una temperatura de 40-60°C durante 10-20 horas. Como el

reactivo de O-sulfatación es ventajosamente utilizada la piridina. SO_3 en una cantidad de 2.5-5 moles preferiblemente 2.5-4 moles por hidroxilo libre por sacárido y la reacción es ventajosamente llevada a cabo 50-60°C, preferiblemente a 55°C durante toda la noche. El producto obtenido luego de la terminación de la reacción es aislado mediante la adición de 0.1-1 un volumen de agua y neutralización, preferiblemente con el hidróxido de sodio, precipitación con solución de cloruro de sodio saturado en acetona, filtración y posible auto filtración.

El producto así obtenido es generalmente la sal de sodio de un derivado de (epi)K5-amina-O-sobre sulfato que tiene un contenido de ácidos glucurónico y idurónico como se mostró anteriormente. Cuando la reacción de sobre sulfatación es desarrollada sobre la sal de la base terciaria o cuaternaria, preferiblemente sobre la sal de tetrabutilamonio de un derivado de epik5-N-sulfato que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 25.000, ventajosamente desde aproximadamente 1.500 a aproximadamente 25.000 en el cual el ácido idurónico es 20-60% del total de los ácidos

urónicos, un derivado de epik5-amina-O-sobre sulfato se obtiene teniendo un peso molecular medio de aproximadamente 3.500 a aproximadamente 40.000, ventajosamente y aproximadamente 4.500 a aproximadamente 40000 y un grado de sulfatación de al menos 3,4, ventajosamente de al menos 3,5, más ventajosamente de más de 3,55 a 4, preferiblemente de 3,55 a 3,8.

Cuando la reacción de sobre sulfatación es desarrollada sobre la sal de la base terciaria o cuaternaria, preferiblemente sobre la sal de tetralbutilamonio de un derivado de K5-N-sulfato- que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1500 a aproximadamente 25000, se obtiene un derivado de K5-amina-O-sobre sulfato que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 3500 a 40000. Ventajosamente y aproximadamente de 4500 a aproximadamente 40.000 y un grado de sulfatación de al menos 2,2, ventajosamente de 2,2 a 3 o de 2,3 a 3 más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9. Preferiblemente, el producto así obtenido viene de un Imw-K5-amina-O-sulfato y es preferiblemente la sal de sodio de un Imw-K5-amina-O-sobre sulfato que tiene un grado de sulfatación de 2,3 a 3. El peso molecular medio

de tal producto puede ser aproximadamente 3.500 a aproximadamente 11.000.

La sal de sodio así obtenida se puede convertir en otra sal. Por vía de ejemplo, el intercambio iónico de calcio se puede desarrollar trabajando con una membrana de ultra filtración.

En la etapa (C) el derivado de (epi)K5-amina-O-sobre sulfato con un alto grado de sulfatación N-acilado utilizando los métodos conocidos en la literatura.

La N-acilación es desarrollada al elaborar el derivado (epi)K5-amina-O-sobre sulfato originado de la etapa (b) reacciona con un derivado funcional de un ácido mono o dicarboxílico que contiene de dos a cuatro átomos de carbono en solución hidroalcohólica a una temperatura de aproximadamente 4°C. Como derivados funcionales de dichos ácidos carboxílicos (C₂-C₄), previamente de ácido acético, propiónico, malónico, o succínico o de mono ésteres, en particular metílico o etílico, del último, uno puede utilizar el anhídrido, el cloruro, o una mezcla de anhídrido y un extractivo. El producto obtenido, un derivado de N-(C₂-C₄)acil-(epi)K5-amina-O-sobre sulfato,

es neutralizado con una dosis, preferiblemente hidróxido de sodio y luego aislado mediante ultra filtración y precipitación con una solución de cloruro de sodio saturado en acetona. Opcionalmente la etapa de N-acilación es repetida hasta que obtiene la sustitución total o sin embargo más del 95%. Son así obtenido en N-acil-(epi)K5-amina-O-sobre sulfatos, en particular el N-acetil, N-(2-carboxilo)acetil, N-(2-metoxycarbonil)acetil, N-(2-etoxycarbonil)acetil, N-propianil, N-(3-carboxi) propianil, N-(3-metoxycarbonil)propianil, N-(3-etoxycarbonil)propionil, - (epi)K5-amina-O-sobre sulfatos.

Los nuevos derivados de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobre sulfato así están generalmente en sus formas de sal de sodio. Dicha sal de sodio se puede convertir en otra sal química o farmacéuticamente aceptable. Las sales particularmente ventajosas son aquellas de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos, de amonio, el tetraaquilamonio (C₁-C₄), aluminio y zinc. Las sales de sodio, calcio y tetrabutilamonio son las preferidas.

A diferencia en los procesos descritos en la WO 98/34958, que consiste de una sulfatación de fase heterogénea de la sal de sodio K5 para obtener sulfatos K5-O- (de acuerdo con la tecnología utilizada aquí "N-acetil-K5-amina-O-sulfatos") formulados sulfatación de 0,5 a 4 y que tienen que concurrir al uso de ácido clorosulfónico para obtener derivados debajo peso molecular de una manera no controlada, el proceso de la presente invención es extremadamente versátil. De hecho, este permite la preparación de N-amina-K5-O-sobre sulfatados de cada tipo en cada alto rendimiento con reacciones fácilmente controlables. En particular, el proceso de la presente invención permite la preparación de N-acil-K5-amina-O-sobre sulfatos de otra manera no obtenibles, como los derivados C-5 epimerizados, los derivados N-acilados con un acilo diferente del acilo presente en el K5 nativo y los derivados de bajo peso molecular. Además, en el método descrito en la WO 98/34958, el proceso de la presente invención permite lograr los LMW-K5-O-sulfatos de manera controlada con el fin de obtener el peso molecular medio deseado y por encima de todo un grado de sulfatación bien definido que puede variar desde los 2,3 a 3 pero que puede regularmente ser 2,7-2,9. Finalmente todos los productos del proceso de la presente invención,

en particular las aminos intermedios libres y los N-acil-K5-amina-O-sobre sulfatos son ingredientes activos útiles para composiciones farmacéuticas o cosméticas.

Los materiales de partida (epi)K5-N-sulfato conocidos en la literatura o sus porciones, o LMN-(epi)K5-N-sulfatos preparados mediante despolimerización nitrosa de los sulfatos (epi)K5-sulfatos correspondientes.

Los derivados de partida (epi)K5-N-sulfato- tienen un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 25.000, ventajosamente desde aproximadamente 1.500 a aproximadamente 25.000. Preferiblemente, como material de partida se utiliza un (epi)K5-sulfato que tiene un peso molecular medio entre 10.000 o 25.000 o LMW-(epi)K5-N-sulfato que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 12.000, ventajosamente aproximadamente 1.500 a aproximadamente 8.000, preferiblemente aproximadamente 1.500 a 7.500.

Un IMWCepik5-N-sulfato que tiene un contenido de unidades idurónicas de aproximadamente 20% obtenidas mediante N-

desacetilación, N-sulfatación, y C5-epimerización de una porción de K5 que tiene un peso molecular de 5000 de describe en la WO 92/17507, en este producto contiene un alto porcentaje de grupos acetilo.

Un epik5-N-fulfato particularmente ventajoso como material de partida es aquel obtenido mediante la epimerización de un K5-N-sulfato virtualmente libre de grupos acetilo a su vez preparados de K5 particularmente puro, en particular que no contienen sustancias lipofílicas, descritas en la WO 02/068477.

K5-N-sulfatos C5-epimerizados de bajo peso molecular que tienen un mayor contenido de unidades idurónicas, en partículas 40-60%, preferiblemente 50-55% son al contrario nuevos productos particularmente ventajosos como materiales de partida en la preparación de derivados epik5-amina-O-sobre sulfatados N-sustituidos de la presente invención.

Los LMW-epik5-N-sulfatos, también se pueden obtener mediante la epimerización C5 de los correspondientes LMW-K5-sulfatos, preferiblemente cuando su peso molecular

medio es más de 4000. Los LMW-K5-N-sulfatos virtualmente libres de grupos acetilos son todos nuevos productos preparables por fraccionamiento o, preferiblemente, por despolimerización de un K5-N-sulfato libre de grupos acetilo. El K5-N-sulfato es bien conocido en la literatura y es descrito en el documento citado aquí anteriormente para ilustrar el estado de la técnica. El material de partida anteriormente mencionado es invariablemente obtenido mediante N-desacetilación de K5 y la subsiguiente N-sulfatación de la K5-amina si obtenida. Sin embargo, se halló que la preparación de un K5-N-sulfato virtualmente libre de acetilo en los grupos NH_2 se ayuda si el K5 del cual este es preparado es particularmente puro, en particular si este no contiene sustancias lipofílicas. Se prefiere por lo tanto de acuerdo a la presente invención, utilizar un K5-N-sulfato de partida preparado de un K5 purificado como se describió en la WO 02/068477. Dicho K5-N-sulfato, cuyo espectro ^{13}C -RMN no muestra tasas de N-acetilo o NH_2 también se describen en la WO 02/068477.

Los nuevo LMW-epiK5-N-sulfatos como se mostró anteriormente son preparados por un proceso caracterizado por que un K5-N-sulfato es sometido, en cualquier orden,

- (i) a epimerización C5 con una D-glucuronil C5-epimerasa que es aislada, purificada y en solución o inmovilizada sobre un soporte sólido, ha un PH de aproximadamente 7, a una temperatura de aproximadamente 30% y por un periodo de 12-24 en la presencia de al menos un ión bivalente seleccionado entre calcio, magnesio, bario, y manganeso; y
- (ii) a despolimerización nitrosa opcionalmente seguida por reducción, donde normalmente con boro hidruro de sodio.

La expresión (en cualquier orden) muestra que el proceso puede indiferentemente llevar a cabo tanto en la dirección (i)-(ii), es decir en la secuencia anteriormente indicada, como en la dirección inversa, es decir también en la dirección (ii)-(i), sometiendo a K5-N-sulfato a primero la reacción despolimerización nitrosa, opcionalmente seguida por la reducción con borohidruro de sodio y posteriormente a la epimerización C5 en la condiciones anteriormente mencionadas. El orden preferido es en la dirección (i)→(ii). La secuencia

(ii)-(i) es preferiblemente utilizada partiendo con LMW-K5-N-sulfatos que tienen un peso molecular medio de más 4.000, preferiblemente partiendo con aproximadamente 6.000. Por ejemplo, uno puede determinar las cantidades de nitrito de sodio el cual, partiendo con un grama de epiK5-N-sulfato, permite lograr un Lmw-epiK5-N-sulfato con un peso molecular de más de 4.000, en partícula de al menos 6.000, con el fin de obtener intermedios útiles para la preparación de LMWepiK5-N, O-sobre sulfatos. De hecho, en este caso en la etapa (ii) se obtiene el porcentaje de epimerización óptima.

De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, la epimerasa C5 se inmoviliza sobre un soporte sólido inerte.

La epimerasa C5, preferiblemente recombinante, aislada, y purificada por ejemplo de acuerdo a Campbell 1994, Wo 98/48006, Jin-Ping 2001 o Crawford 2001, de inmoviliza sobre un soporte inerte en la presencia del sustrato, es decir, en la presencia del derivado de partida K5-N-sulfato o en la presencia LMW-K5-N-sulfato, que ventajosamente tiene un peso molecular medio de más de 4.000, preferiblemente de al menos 6.000. La

inmovilización de desarrolla de acuerdo a métodos convencionales, por ejemplo, como se describió en la WO 01/72848.

La reacción de epimerización C5 es llevada a cabo al circular 20-1000 ml de una solución de 25 mM de HEPES a un PH de aproximadamente de 7 que contiene 0.001-10 g de sustrato (K5-N-sulfato o LMW-K5-N-sulfato, preferiblemente con un peso molecular de más de 4000, en partícula de al menos de 6000) y un catión seleccionado entre calcio, magnesio, bario y manganeso a una concentración entre 10 y 60 mM a través de una Columna que contiene de 1.2×10^7 a 3×10^{11} cpm de la enzima desmovilizada, manteniendo el pH aproximadamente 7 a aproximadamente 30°C, en un flujo 30-220ml/hora durante un periodo de 12-24 horas, ventajosamente de 15-24 horas.

Preferiblemente la dicha solución es recirculada en un flujo de aproximadamente 200 ml/hora durante la noche (15-20 horas). El producto obtenido se purifica y se separa de acuerdo a métodos conocidos, por ejemplo, mediante micro filtración y precipitación con el calor. El producto así obtenido está comprendido o de epiK5-N-sulfato (y en tal caso es disuelto en agua y sometido a

despolimerización) o de LMW-epik5-N-sulfato (en tal caso este constituye el producto final). El porcentaje de epimerización, en la práctica en la cantidad de unidades idurónicas con relación a aquellas glucurónicas, se calculan con ^1H -RMN de acuerdo al método descrito en WO 96/4425.

La reacción de despolimerización nitrosa se lleva acabo de acuerdo a métodos conocidos mediante la despolimerización de heparina, por ejemplo de acuerdo al método descrito en la EP 373119, en la WO 82/03627 o de acuerdo al método mediante la despolimerización de un K5-N-sulfato descrito en la EP544592, pero partiendo con un K5-N-sulfato o un epik5-N-sulfato que contiene de 0 a no más de un 10% preferiblemente a no más del 5% de grupos acetilo. Preferiblemente, la despolimerización, desarrollada con nitrilo de sodio y acido clorhídrico sobre un epik5-N-sulfato virtualmente libre de grupos acetilo, es seguida por reducción in situ con boro hidruro de sodio.

En la practica, una solución acuosa fría de epik5-N-sulfato es llamada a un PH acido (aproximadamente 2) con

ácido clorhídrico y, aún fría tratada con nitrilo de sodio manteniendo la temperatura (aproximadamente 4°C) y el PH (aproximadamente 2) constante y, luego de la terminación de la despolimerización (aproximadamente 15-30 minutos) la solución se neutraliza con hidróxido de sodio y se trata a una temperatura aproximadamente 4°C, con una solución acuosa de boro hidruro de sodio. Luego de la terminación de la reducción (aproximadamente 4 horas) el exceso de borohidruro de sodio se destruye con ácido clorhídrico, la solución se neutraliza con hidróxido de sodio y se despolimeriza (y se reduce) el producto es aislado de acuerdo con métodos conocidos por ejemplo mediante precipitación directa con etanol o acetona. El producto obtenido luego de la terminación de la despolimerización puede ser un Lmw-K5-N-sulfato (en tal caso este constituye el producto final) o un Lmw-K5-N-sulfato (en tal caso es directamente sometido a epimerización C5 como se mostró aquí anteriormente, después del aislamiento o también en solución sin ser previamente aislado), en particular cuando este tiene un peso molecular medio de las de 4000, preferiblemente de algunos 6000, o se utiliza para preparar LMN-K5-N, O-sobresulfatado de actividad antiangiogénica y anti viral. Mediante la reacción de despolimerización apropiadamente

controlante, en particular utilizando diferentes cantidades de nitrilo de sodio/acido clorhídrico, LMW-K5-N-sulfatos o los LMW-epiK5-N-sulfatos son obtenidos teniendo un peso molecular medio en intervalo completo de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 12.000, ventajosamente desde aproximadamente 1.500 a aproximadamente 10.000, preferiblemente desde aproximadamente 1.500 a aproximadamente a 7.500, calculado en el espectro ^{13}C -RMN ha traves de la integración de la señal atribuida a C2 del 2,5-anhidromanitol con aquel del carbono anomérico de la glucosamina dentro de la cadena de polisacáridos.

De acuerdo con un procedimiento general partiendo por ejemplo con un gramo de K5-N-sulfato a de epiK5-N-sulfato, el producto de partida es disuelto en 100-200 ml de agua desionizada y termo establecida a 4°C. Luego una cantidad de nitrilo de sodio se agrega con el fin de obtener el peso molecular medio deseado, por ejemplo de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 4.000. Por lo tanto, partiendo de un epiK5-N-sulfato que tiene un peso molecular de 20.000 medido con el método HPLC equipada con una columna BioRad BioSil 250 y utilizando un estándar de heparina de peso molecular conocido, se

requerirá la adición de 330 a 480 mg de nitrilo de sodio disuelto en una solución acuosa al 0,2%. La solución que contiene el epik5-N-sulfato y el nitrilo de sodio, mantenida a 4°C, es llevada a un PH 2 a través de la adición de HCL 0,1 N enfriada a 4°C. Esta reacciona bajo agitación lenta durante 20-40 minutos, entonces es neutralizada con NaOH 0,1 N. el producto obtenido es llevado a temperaturas ambiente de cuarto y tratado con agente reductor tal como por ejemplo borohidruro de sodio (250-500 mg disueltos en 50-100 ml de agua) y echa a reaccionar durante 4-8 horas, el exceso de borohidruro de sodio se elimina elevando el PH a 5-5,5 con HCL 0,1 N y se le permite permanecer durante 2-4 horas adicionales. Al final este es neutralizado con NaOH 0,1 N y el producto es recuperado mediante precipitación con acetona o etanol después de haber concentrado el producto a través de evaporación a presión reducida.

Generalmente, las cantidades de nitrito de sodio se pueden determinar las cuales, partiendo con 1 g de K5-N-sulfato o de epik5-N-sulfato, permiten el logro de un Lmw-K5-N-sulfato o un Lmw- epik5-N-sulfato con un peso molecular medio de aproximadamente 4.000 a

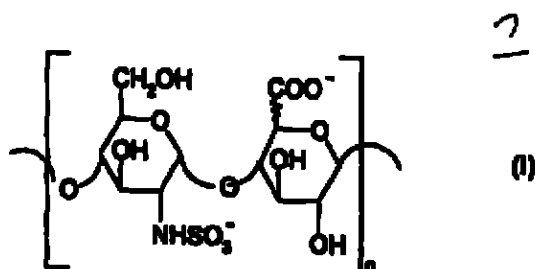
aproximadamente 12.000, ventajosamente desde aproximadamente 4.000 a aproximadamente 7.500, en particular de 6.000-7.500.

Los LMW-epiK5.N-sulfatos así obtenidos, con un contenido de ácido idurónico desde 20 a 60% ventajosamente desde 40 a 60% preferiblemente de 50-55% y virtualmente libre de grupos NH₂ y N-acetilo, que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1500 a aproximadamente 12.000, ventajosamente desde aproximadamente 1.500 a aproximadamente 10.000, preferiblemente desde aproximadamente 1.500 a aproximadamente 7.500 y sus sales químicamente o farmacéuticamente aceptables constituyen nuevos productos útiles como materiales de partida en la preparación de LMW-epiK5-N, O-sobre sulfatos particularmente interesantes, pero también ellos mismos útiles como ingredientes activos de composiciones farmacéuticas o cosméticas y constituye un aspecto adicional de la presente invención.

Ventajosamente los materiales de partida en la preparación de derivados de N-aceti-(epi)K5-amina-O-sobre sulfato de la presente invención son derivados de

242

(epi)K5-N-sulfato que consisten de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula 1.



En la cual la proporción de unidades glucurónicas/unidades idurónicas es de 100/0 a 40/60, n es un entero de 2 a 100, ventajosamente de 3 a 100, y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

En particular dichos derivados de (epi)K5-N-sulfato de partida son consistentes de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula 1 anteriormente mencionada, con un contenido de unidades glucurónicas de 100 a 40%, ventajosamente con un contenido de ácido glucurónico de 100% u 80 - 40% de ácido glucurónico y 20 - 60% de ácido idurónico, n es un entero 2 a 100, ventajosamente de 3 a 100, y el catión correspondiente es químicamente aceptable.

Preferiblemente, el contenido de ácido glucurónico es 100% del total de ácidos urónicos 40-60% es ácido glucurónico y 60-40% es ácido idurónico.

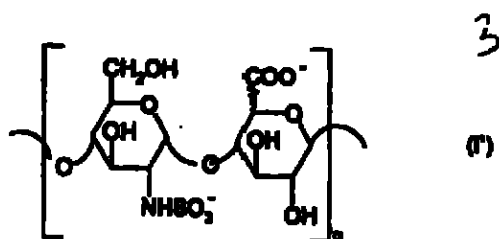
Los materiales de partida preferidos son LMW-(epi)K5-N-sulfatos que consisten de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula I en la cual las unidades urónicas son todas consistentes de ácido glucurónico o son 40-60% comprendidas, preferiblemente 50-55%, de ácido idurónico, n es un entero de 2 a 20, ventajosamente de 3 a 15 y el catión correspondiente es químicamente aceptable. Los epiK5-N-sulfatos preparados mediante epimerización C5 de epiK5-N-sulfatos son bien conocidos y ampliamente descritos en la literatura. Su preparación mediante epimerización C5 de la unidad glucurónica de K5-N-sulfato con un C5 D glucuronil epimerasa se describió en los documentos citados aquí anteriormente para ilustrar el estado de la técnica, por ejemplo, en la WO 92/17507, WO 98/14425, WO 97/43317, WO 01/72848 y US 2002/0062019. sin embargo de acuerdo a una manera preferencial del procedimiento, mediante la epimerización se utiliza un K5-N-sulfato obtenido de un K5 libre de sustancias lipofílicas como se describió en la WO 02/068477 y la epimerización C5 es

desarrollada con un D-glucuronil C5 epimerasa aislado, purificado e inmovilizado sobre un soporte sólido, a un pH de aproximadamente 7, a una temperatura de aproximadamente 30° C y durante un periodo de tiempo de 12 - 24 horas en la presencia de al menos un ión bivalente seleccionado entre calcio, magnesio, bario y manganeso, como se mostró anteriormente. También el K5-N-sulfato fue mostrado aquí anteriormente.

Los (epi)K5-N-sulfatos N-sulfatados de bajo peso molecular, en particular aquellos en los cuales las unidades urónicas están todas en el ácido glucurónico y aquellas que tienen un contenido de unidades idurónicas de 40-60%, preferiblemente 50-55% son al contrario todos nuevos productos particularmente ventajosos como materiales de partida en la preparación de derivados de N-acil-(epi)K5-amino-O-sobresulfato de acuerdo con la presente invención. Dichos materiales de partida son LMW-(epi)K5-N-sulfatos que tienen un contenido de ácido idurónico de 0% a 40-60% con relación al total de los ácidos urónicos y un peso molecular medio de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 12.000, ventajosamente de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 8.000, preferiblemente de aproximadamente 1.500 a

aproximadamente 7.500; y sus sales química o farmacéuticamente aceptables. La distribución puede variar desde aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000.

Dicho LMW-(epi)K5-N-sulfatos son ventajosamente consistentes de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula I'

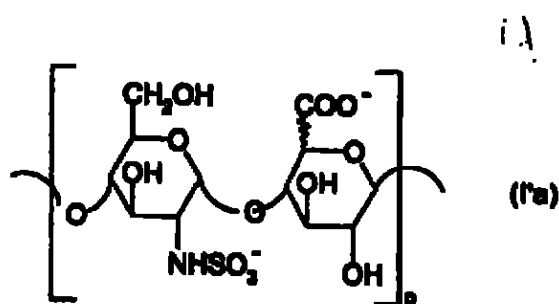


En la cual las unidades urónicas son 100% consistentes de ácido glucurónico o de 60-40% de ácido glucurónico y 40-60% de ácido idurónico, q es un entero de 2 a 20 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

En este contexto, el término "químicamente" se refiere a un catión utilizable en síntesis química, tal como iones de sodio, amonio, tetralquilamonio (C₁-C₄), o para la purificación del producto.

Los cationes ventajosos son aquellos derivados de los metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio, tetralquilamonio (C_1-C_4), aluminio y zinc. Los cationes preferidos son los iones de sodio, calcio y tetrabutylamonio.

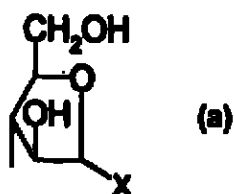
Los materiales de partida preferidos son los nuevos LMW-(epi)K5-N-sulfatos consistentes de una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes tienen la fórmula I'a



En la cual las unidades urónicas son 100% consistentes de ácido glucurónico o 60-40% glucurónico y 40 a 60% de ácido idurónico, p es un entero de 4 a 8, el peso molecular medio de estos productos va de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 4.000 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

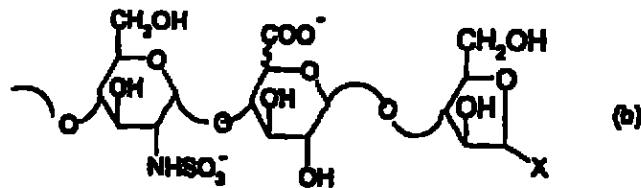
En particular los nuevos LMW(epi)K5-N-sulfatos son materiales de partida útiles que consisten de una mezcla de cadena en la cual al menos el 95% de dichas cadenas tienen la fórmula I' mostrada aquí anteriormente obtenida por despolimerización nitrosa del correspondientes (epi)K5-N-sulfatos mostrados anteriormente y la subsecuente posible reducción por ejemplo con borohidruro de sodio.

El origen de estos (epi)K5-N-sulfatos provenientes de una etapa de despolimerización nitrosa involucra, en el extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dicha mezcla de cadena, la presencia de una unidad de 2,5-anhidromanosa o, en el caso de reducción con por ejemplo sodio boro hidruro, de 2,5-anhidromanitol de estructura (a)



En la cual X representa un grupo formilo o un grupo hidroximetilo. Por lo tanto, el extremo reductor de la

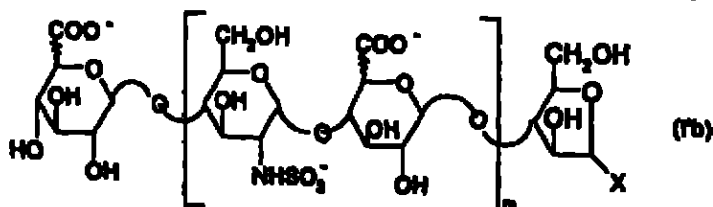
mayoría (60 - 70%) de las cadenas está actualmente representada por la estructura (b)



En la cual X es como se definió anteriormente.

La presencia de la estructura (a) no tiene ninguna influencia sobre las características químicas de los (epi)K5-N-sulfatos y sus derivados en razón a que cualquiera situaciones involucrarían una posible introducción de 1 o 2 grupos sulfato lo cual sin embargo no cambiaría significativamente el grado de sulfatación de los derivados O-sulfatados. Adicionalmente, la presencia de la estructura (a) no influencia la actividad biológica de los productos, como se demostró por (Østergaard 1987) P.B. et al. en Trombosis Research, 1987, 45, 739-749 (Østergaard 1987) para heparinas de bajo peso molecular.

Los LMW(epi)K5-N-sulfatos particularmente ventajosos de acuerdo con la presente invención son consistentes de mezclas de cadena en los cuales las especies preponderantes son un compuesto de fórmula I'b



En la cual X es formilo o hidroximetilo, m es 4, 5, o 6, el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable. Las unidades urónicas son todas de ácido glucurónico o las unidades glucurónicas e idurónicas están presentes alternativamente, partiendo con una unidad glucurónica o idurónica, en tal caso la proporción glucurónica/idurónica va de 45/55 a 55/45 es decir aproximadamente 50/50.

Todos los LMW(epi)K5-N-sulfatos aquí mostrados anteriormente son nuevos productos que constituyen un objeto adicional de la presente invención.

Los LMW-(epi)K5-N-sulfatos, es decir los LMW-K5-N-sulfatos, mostrados anteriormente y, a diferencia de otros epoK5-N-sulfatos, por ejemplo como se indicó en la WO 92/17507, también los LMW-(epi)K5-N-sulfatos de la presente invención, estando virtualmente libres de grupos N-acetilo, no tienen actividad anticoagulante y tienen una interesante actividad contra los radicales libres. Gracias a su baja toxicidad, los nuevos LMW-K5-N-sulfatos, y los LMW-(epi)K5-N-sulfatos son ingredientes activos para la preparación de composiciones farmacéuticas utilizables como adyuvantes en el tratamiento de cardiopatía isquémica y para el tratamiento de dermatitis por radiación o de composiciones útiles como antienvejecimiento de la piel.

Cuando los LMW-(epi)K5-N-sulfatos mostrados anteriormente son utilizados como materiales de partida para la reacción de O-sobresulfatación, se prefiere en cualquier caso que, en su preparación por despolimerización nitrosa como se mostró anteriormente, dicha despolimerización sea seguida por la reducción por ejemplo con borohidruro de sodio para dar el LMW-K5-N-sulfatos caracterizados por unidades terminales (a) en las cuales X es hidroximetilo, en razón a que de acuerdo con el proceso de la presente

invención dichos LMW-(epi)K5-N-sulfatos son sometidos a reacciones de sulfatación y acilación cuya influencia, del radical 2,5-anhidromanosa de la estructura (a) es desconocida sobre el grupo formilo, en el cual X representa formilo.

Dichos materiales de partida son preferiblemente utilizados en forma de sal de sodio, a menos que una sal ya esté disponible con una base terciaria u orgánica cuaternaria preparada de acuerdo con la etapa (a) mostrada anteriormente, preferiblemente la sal de tetrabutilamonio.

De acuerdo con la presente invención, los derivados de (epi)K5-N-sulfato de partida, preferiblemente 100% N-sulfatados, son sometidos a las etapas anteriormente mencionadas (a) y (b), luego de la terminación de la cual son aislados los correspondientes nuevos derivados de (epi)K5-amino-O-sobresulfato, en los cuales la amina no es sustituida, normalmente en la forma de sal de sodio, la cual se puede transformar en otra sal química o farmacéuticamente aceptable.

Así, de acuerdo con otros de sus aspectos, la presente invención se refiere a nuevos derivados de (epi)K5-amino-O-sobresulfato y sus sales química o farmacéuticamente aceptables obtenibles mediante un proceso caracterizado porque (a) un derivado de (epi)K5-N-sulfato, en forma ácida, es tratada con una base terciaria u orgánica cuaternaria que permite que la mezcla de reacción permanezca durante un periodo de 30-60 minutos, manteniendo el pH de la solución en un valor de aproximadamente 7 mediante la adición de dicha base terciaria u orgánica cuaternaria y su sal se aisle con dicha base orgánica; (b) dicha sal de base orgánica de dicho derivado (epi)K5-N-sulfato es tratado con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobresulfatación y el derivado de (epi)K5-amino-O-sobresulfato es aislado.

El derivado así obtenido es generalmente un derivado de (epi)K5-amino-O-sobresulfato que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 40.000, aislado en forma de sal de sodio que se puede transformar en otra sal química o farmacéuticamente aceptable. Las sales particularmente ventajosas son aquellas de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, de amonio,

tetraalquilamonio (C_1-C_4) aluminio y zinc, y entre estos, las sales de sodio, calcio y tetrabutilamonio son las preferidas.

Como ya se mostró aquí anteriormente, el grado de sulfatación de los derivados de (epi)K5-amino-O-sobresulfato como se obtuvieron anteriormente dependen de la configuración del derivado de (epi)K5-N-sulfato de partida, en razón a que el volumen de la cadena de disacárido del derivado K5-N-sulfato en la cual las unidades urónicas están comprendidas exclusivamente de ácido glicurónico, permiten una sobresulfatación que es menor de aquella que ocurre con el derivado de (epi)K5-N-sulfato, especialmente si el grado de epimerización del último es 40-60% de ácido glucurónico y 60-40% de ácido idurónico.

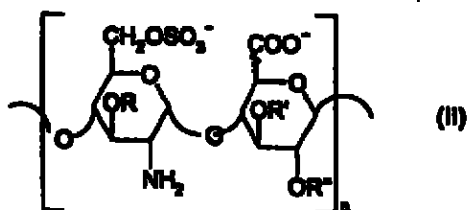
De hecho se ha hallado que, sometiendo un derivado de K5-N-sulfato a las etapas anteriormente mencionadas (a) y (b) un derivado de K5-amina-O-sobresulfato se obtiene teniendo un grado de sulfatación de 2,2 a 3, ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9.

Sometiendo a un derivado de epiK5-N-sulfato a las etapas anteriormente mencionada (a) y (b) en las cuales el contenido de ácido idurónico es 20 - 60% preferiblemente 40 - 60% del total de los ácidos urónicos, se obtiene un derivado de epiK5-amina-O-sobresulfato que tiene un gado de sulfatación de al menos 3,4, ventajosamente de al menos 3,5, más ventajosamente de 3,55 a 4, preferiblemente de 3,55 a 3,8.

Estos derivados de (epi)K5-amina-O-sobresulfatado son productos útiles como intermedios en la preparación de sus derivados N-(C₂-C₄)acilados y como ingredientes activos básicamente libres de actividad sobre los parámetros de coagulación pero que tienen otras propiedades farmacológicas interesantes, útiles para la preparación de composiciones farmacéuticas. Para el uso de los derivados de (epi)K5-amina-O-sobresulfato de la presente invención como ingredientes activos de composiciones farmacéuticas, es ventajoso preparar tanto los derivados de bajo peso molecular, con un peso molecular medio de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 11.500, preferiblemente desde aproximadamente 4.500 a aproximadamente 8.500, con una distribución de peso molecular de entre aproximadamente

1.000 y aproximadamente 15.000, preferiblemente entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 10.000 y derivados de alto peso molecular, que se originan de un K5 no fraccionado, con un peso molecular medio de aproximadamente 15.000 a aproximadamente 45.000, preferiblemente entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 45.000, con una distribución de peso molecular desde aproximadamente 2.000 a aproximadamente 70.000.

Así, de acuerdo con otros de sus aspectos la invención suministra nuevos ingredientes activos de composiciones farmacéuticas que consisten de derivados de (epi)K5-amina-O-sobresulfato que consisten de mezcla de cadena en las cuales al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II



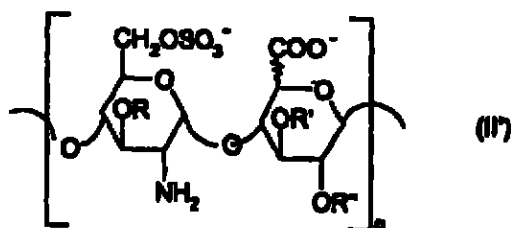
En la cual n es un entero de 2 a 100, preferiblemente de 3 a 100, R, R' y R'' son hidrógeno o SO₃⁻, las unidades

urónicas son todas de ácido glucurónico para un grado de sulfatación de al menos 2,2, ventajosamente de 2,2 a 3 o de 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9, o son 20-60% consistentes de ácido idurónico, para un grado de sulfatación de al menos 3,4, ventajosamente de al menos 3,5, más ventajosamente de 3,55 a 4, preferiblemente de 3,55 a 3,8 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

Los derivados de (epi)K5-amina-O-sobresulfatados ventajosos de grado extremadamente alto de sulfatación son consistentes de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II en la cual las unidades urónicas son 40-60% consistentes de ácido idurónico, n es un entero de 2 a 100, preferiblemente de 3 a 100, con un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 40.000 ventajosamente de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 40.000, R es al menos 40% preferiblemente 50-80% SO_2^- , R' y R'' son ambos SO_2^- o uno es hidrógeno y el otro es 5-10% SO_3^- , en ácido monosulfato glucurónico y 10-15% SO_3^- en ácido monosulfato idurónico, el grado de sulfatación es

más de 3,4 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

Los derivados preferidos de epiK5-amina-O-sobresulfatados de muy alto grado de sulfatación son los lmw-epiK5-amina-O-sobresulfatos que consisten de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula II'

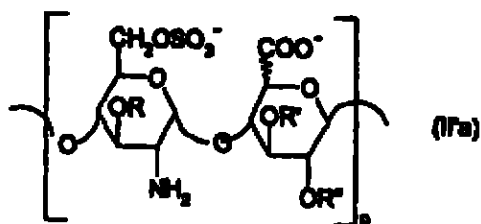


En la cual q es un entero de 2 a 20, R , R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- , las unidades urónicas están 20 - 60% comprendidas, preferiblemente 40-60%, de ácido idurónico para un grado de sulfatación de 3,55 a 4, y el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable.

Son particularmente interesantes las mezclas de cadena de la fórmula II' en las cuales las unidades urónicas están 40-60% comprendidas, preferiblemente 50-55% de ácido

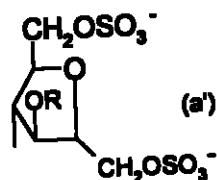
idurónico, Res al menos 40%, ventajosamente 50 - 80%, preferiblemente aproximadamente 65% SO_3^- , R' y R'' son ambos SO_3^- o uno es hidrógeno y el otro 5 - 10% de SO_3^- en ácido glucurónico y 10 - 15% de SO_3^- en ácido idurónico, N es un entero de 3 a 15, con un peso molecular medio de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 8.000 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

Entre estos Lmw(epi)K5-amina-O-sobresulfatos, son preferidos aquellos que consisten de una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes tienen la fórmula II'a



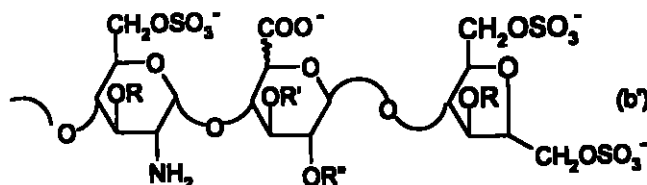
En la cual p es un entero de 4 a 8, R, R' , y R'' son como se definió anteriormente, el grado de sulfatación va de 3,55 a 4 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

El origen del nuevo LMW-epik5-amina-O-sobresulfatado proveniente del LMW-epik5-N-sulfatos provenientes de los mediante despolimeración nitrosa y subsecuente reducción con, por ejemplo, borohidruro de sodio, involucra, en el extremo reductor de las mayorías de las cadenas en dicha mezcla de cadena, la presencia de una unidad 2,5-anhidromanitol sulfatada de la estructura (a').



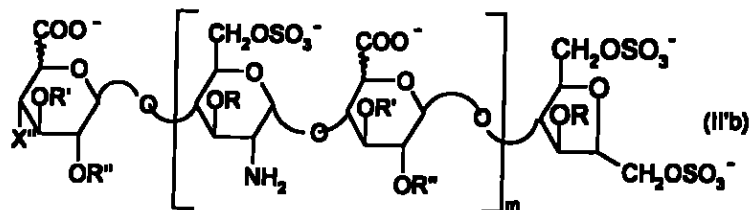
En la cual R representa hidrógeno SO_3 .

El extremo reductor de la mayoría de las cadenas el dicha mezcla de cadenas está representado por la estructura (b').



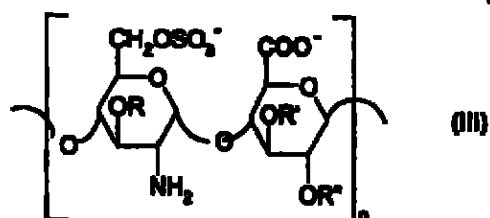
En la cual la unidad urónica puede ser glucurónica o hidrónica.

Entre los nuevos LMW-epik5-amina-O-sobresulfatados anteriormente mencionados, se prefieren aquí los que consisten de mezclas en los cuales las especies preponderantes son un compuesto de fórmula II'b.



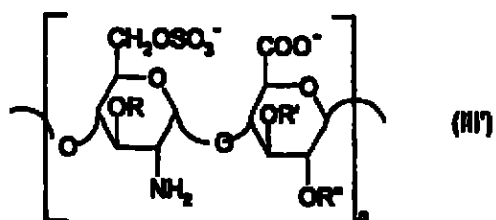
En el cual R, R' y R'' son hidrógeno o SO₃⁻, X'' es OH o OSO₃⁻, m es 4,5 o 6, las unidades urónicas son 40-60% consistentes de ácido idurónico, para un grado de sulfatación de 3,5 a 4, las unidades idurónicas estando presente alternativamente, partiendo con una unidad glucorónica o idurónica, y el catión correspondiente es uno química o farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro de sus aspectos la invención suministra nuevos derivados de K5-amina-O-sobresulfato que consisten de mezclas de cadena de los cuales al menos el 920% de dichas cadenas tiene la fórmula III



En las cuales n es un entero de 2 a 100, preferiblemente de 3 a 100, R , R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- , el grado de sulfatación es al menos 2,2, ventajosamente de 2,2 a 3 o desde 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente 2,7 a 2,9 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

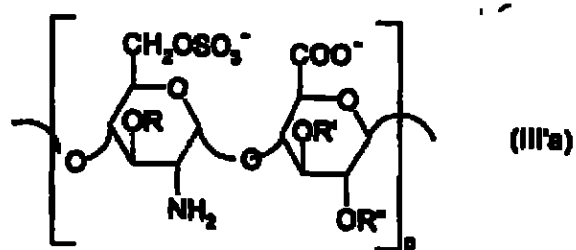
Los K5-amina-O-sobresulfatos preferidos son los LMW-K5-amina-O-sobresulfatos que consisten de mezcla de cadenas de los cuales al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula III'



En la cual q es un entero de 2 a 20, R , R' y R'' representan hidrógeno o un grupo SO_3^- , para un grado de

sulfatación de al menos 2,2, ventajosamente de 2,2 a 3 o 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9 y el catión correspondiente es un ión químicamente o farmacéuticamente aceptable.

Entre estos LMW-K5-amina-o-sobresulfatos son preferidos aquellos que consisten de una mezcla de cadena en los cuales las especies preponderantes tienen la fórmula III'a



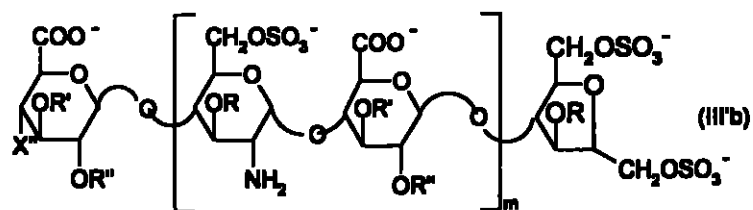
En la cual p es un entero de 4 a 8, R, R' y R'' son como se definió anteriormente, el grado de sulfatación es al menos 2,2, ventajosamente de 2,2 a 3 o 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9 y el catión correspondiente es químicamente o farmacéuticamente aceptable.

El origen del nuevo LMW-K5-amina-O-sobresulfatado proveniente del LMW-k5-sulfatos obtenidos mediante

despolimerización nitrosa y la subsecuente reducción como ejemplo, borohidruro de sodio, involucra en el extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dicha mezcla de cadena, la presencia de una unidad de 2,5 -anhidromanitol sulfatada de estructura (a') como se mostró anteriormente, en la cual R representa hidrógeno p SO_3^-

Así, el extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dicha mezcla de cadena que representa mediante la estructura (b') como se mostró anteriormente, en la cual la unidad urónica es todavía de ácido glucurónico.

Entre los nuevos LMW-K-amina-O-sobresulfatos anteriormente mencionados, son preferidos aquí los que consisten de mezclas en la cuales las especies preponderantes son un compuesto de fórmula III'b



En la cual R, R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- , X'' es OH o OSO_3 , para un grado de sulfatación es al menos 2,2,

ventajosamente de 2,2 a 3 o 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9, m es 4, 5 o 6 y el catión correspondiente es un ión químicamente o farmacéuticamente aceptable.

El LMW-K5-amina-O-sobresulfados son nuevos productos útiles como intermedios en la preparación de sus derivados N-sulfatados o N-acilados pero ellos mismos tienen propiedades farmacológicas interesantes, en particular como radicales antilibre microbiocidas y, como tales, constituyen nuevos ingredientes activos o composiciones farmacéuticas que constituyen por lo tanto un aspecto adicional de la presente invención.

En particular, de acuerdo con otro de sus aspecto, la invención se relaciona con el uso de los derivados de (epi)K5-amina-O-sobresulfato anteriormente mencionados con un alta grado de sulfatación para la preparación de nuevos derivados de epiK5-amina-O-sobresulfatos N-sustituídos.

Los derivados de N-acil-(epe)K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la presente invención son obtenidos al

someter los derivados de (epi)K5-amina-O-sobresulfato a la etapa © del proceso de la presente invención.

Así, de acuerdo con uno de sus aspectos adicionales, la presente invención suministra nuevos N-acil(epi)k5-amina-O-sobresulfato obtenibles mediante un proceso caracterizado por que

(a) un derivado de (epi)K5-N-sulfato, en forma ácida como es tratado con una base orgánica terciaria o cuaternaria, permitiendo que la mezcla de reacción permanezca durante un periodo de tiempo de 30-60 minutos, manteniendo el pH de la solución en un valor de 7 mediante la adición de dicha base orgánica terciaria o cuaternaria y su sal es aislada con dicha base orgánica;

(b) dicha sal de la base orgánica de dicho derivado de (epi)K5-N-sulfato es tratado con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobresulfatación

(c) el producto así obtenido es tratado con un derivado funcional de un ácido carboxílico (C₂-C₄), el derivado de N-acilo-(epi)K5-amina-O-sobresulfato así obtenido es aislado. Generalmente el derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato es aislado en forma de sal de sodio

y opcionalmente dicha sal de sodio es transformada en otra sal química o farmacéuticamente aceptable.

Como ocurre para los derivados de (epi)-K5-amina-O-sobresulfato, también el grado de sulfatación de los derivados N-acil-(epi)k5-amina-O-sobresulfato como se obtuvieron anteriormente depende de la configuración del derivado de (epi)K5-N-sulfato de partida, en razón a que el volumen en la cadena de disacárido del derivado de K5-N-sulfato, en la cual las unidades urónicas están comprendidas exclusivamente de ácido glucurónico, permiten una sobresulfatación que es menor que la que ocurre con el derivado de epiK5-n-sulfato, especialmente si el grado de epimerización del último es 40-60% de ácido glucurónico y 60 y un 40% de ácido idurónico.

De hecho, se ha hallado que, sometiendo el derivado de K5-N-sulfato a las etapas anteriormente dichas (a)-(c) se obtiene un N-acil-k5-amina-O-sobresulfato se obtiene un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato teniendo un grado de sulfatación de 2,2 a 3, ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9. m es 4, 5 o 6 y el catión correspondiente es un ión químicamente o farmacéuticamente aceptable.

Sometiendo a un derivado de epiK5-N-sulfato a las etapas anteriormente dichas (a), (b) y (c) en la cual el contenido de ácido idurónico es 20-60% del total de los ácidos urónicos, los derivados de N-acil-epiK5-amina-sobresulfato son obtenidos teniendo un grado de sulfatación de al menos 3,4, ventajosamente de al menos 3,5, más ventajosamente de 3,55 a 4, preferiblemente de 3,55 a 3,8.

Así, de acuerdo con otros de sus aspectos, la presente invención suministra nuevos derivados de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato en el cual el acilo es un ácido carboxílico (C_2-C_4), que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 45.000, preferiblemente entre aproximadamente 4.500 y aproximadamente 40.000, un grado de sulfatación como se indicó anteriormente, dichos derivados estando básicamente inactivos sobre los parámetros de coagulación pero los ingredientes activos útiles de las composiciones farmacéuticas o cosméticas.

Para uso de los derivados de N-acil-epiK5-amina-O-sobresulfato de la presente invención como productos

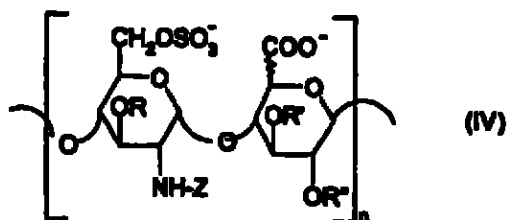
farmacéuticos o cosméticos es ventajoso preparar tanto derivados de bajo peso molecular con un peso molecular medio de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 11.500, preferiblemente de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 8.500, con una distribución de peso molécula de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 15.000, preferiblemente entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 10.000 y derivados de alto peso molecular, que se originan de un K5 no fraccionado, con un peso molecular medio de aproximadamente 15.000 a aproximadamente 45.000, preferiblemente entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 45.000, con una distribución de peso molecular de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 70.000.

En los derivados de N-acil-epiK5-amina-O-sobresulfato de la presente invención, grado de sulfatación es muy alto, en razón a que sobre los 4 hidroxilos libres disponibles por unidad de disacárido, al menos 3,4, preferiblemente de 3,5 a 3,8, son sulfatados mientras el nitrógeno de la glicosamina es virtualmente 100% acilado. Además, los derivados de N-acil-epiK5-amina-O-sobresulfato son 100% 6-O-sulfatados se encuentra en un 80% 3-O-sulfatados en sus unidades glucosalina, 5-10% 3-O-monosulfatados en

unidades glucurónicas, 10-15% O-monosulfatados en unidades idurónicas y 2,3-di-O-sulfatados en las unidades de urónicas restantes, que consideran que el grado de sulfatación es al menos 3,4.

Los derivados de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato que, como se indicó anteriormente, tienen un grado de sulfatación de 2,2 a 3, son al menos 90% 6-O-sulfatados.

De acuerdo con otro de sus aspectos, la invención suministra nuevos derivados de N-acil-epiK5-amina-O-sobresulfato que consisten de mezclas de cadena en las cuales al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula IV

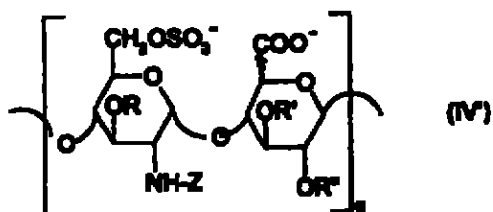


En la cual las unidades urónicas son 20-60% consistentes del ácido idurónico, n es un entero de 20 a 10, preferiblemente 3 a 100, R, R' y R'' son hidrógeno o SO₃-, Z es acilo (C₂-C₄), el grado de sulfatación es al menos

3,4, ventajosamente de al menos 3,5, más ventajosamente de 3,55 a 4, preferiblemente de 3,55 a 3,8 y el catión correspondiente químicamente farmacéuticamente aceptable.

Los derivados N-acil-epiK5-amina-O-sobresulfato ventajosos de grado extremadamente alto de sulfatación son consistentes de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadena tiene la fórmula IV en la cual las unidades urónicas son 40-60% consistentes de ácido idurónico, n es un entero de 2 a 100, preferiblemente de 3 a 100, con un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 a 45.000, ventajosamente desde aproximadamente 4.500 a aproximadamente 45.000, R es al menos 40% preferiblemente 50-80% SO_3^- , R' y R'' son ambos SO_3^- o uno es hidrógeno y el otro es 5-10% SO_3^- en ácido monosulfato glucurónico y 10-15% SO_3^- en ácido monosulfato idurónico, el grado de sulfatación es más de 3,4 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

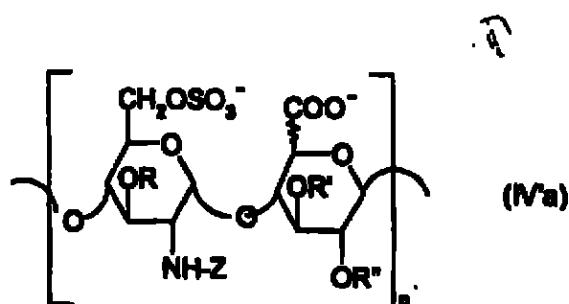
Los derivados de N-acil-epiK5-amina-O-sobresulfato de extremadamente alto grado de sulfatación de particular interés son N-acil-LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos que consisten de una cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadena tienen la fórmula IV'



En la cual q es un entero de 2 a 20, R , R' y R'' representan hidrógeno o un grupo SO_3^- para un grado de sulfatación de 3,55 a 4, Z es acilo ($\text{C}_2\text{-C}_4$) y el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable.

Las mezclas de cadena de la fórmula IV en la cual las unidades urónicas son 40-60% comprendidas, preferiblemente 50-55%, de ácido idurónico, es al menos 40%, ventajosamente se encuentre en un 80%, preferiblemente aproximadamente 65% $\text{SO}_3\text{-R}'$ y R son ambas SO_3^- o uno es hidrógeno y el otro 5-10% de SO_3^- en ácido glucurónico y 10-15% SO_3^- en ácido idurónico, q es un entero de 3 a 15, con un peso molecular medio de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 9.000 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable son los preferidos.

N-acil-LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos particularmente interesantes son aquellos de muy bajo peso molecular que consisten de una mezcla de cadena en la cual las especies de ponderantes son un compuesto de fórmula IV'a

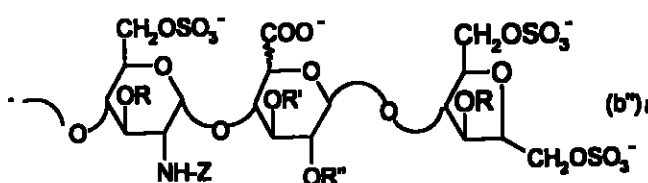


En la cual p es un entero de 4 a 8, R , R' y R'' representan hidrógeno o un grupo SO_3^- para un grado de sulfatación de 3,55 a 4, Z es acilo ($\text{C}_2\text{-C}_4$), y el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable.

El origen de los nuevos N-acil-LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos proveniente de LMW-epiK5-sulfatos obtenidos mediante despolimerización nitrosa y la subsecuente reducción con, por ejemplo, borohidruro de sodio, involucran, en el extremo reductor de la mayorías de las cadenas en dicha mezcla de cadena, la presencia de una unidad de 2,5-anhidromanitol sulfatada de estructura (a')

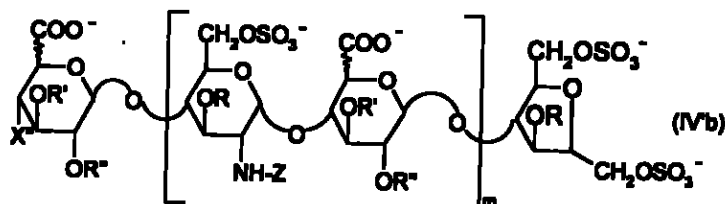
definida anteriormente, en la cual R'' representa hidrógeno o SO_3^- .

Así, el extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dichas mezclas de cadenas es representado por la estructura (b'')



En la cual Z representa acilo ($\text{C}_2\text{-C}_4$) y la unidad urónica puede ser glucurónica o idurónica.

Entre los nuevos N-acil-LMWepiK5-amina-O-sobresulfatos anteriormente dichos son preferidos aquellos que consisten de métodos en los cuales la especie preponderante es un compuesto de fórmula IV'b



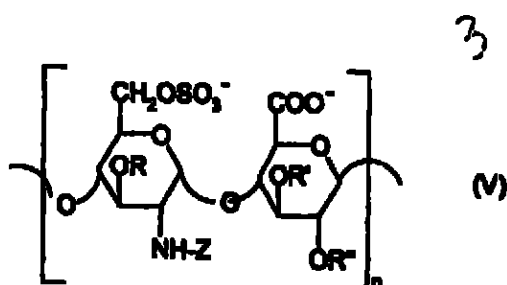
En la cual R, R' y R'' son hidrógeno o SO₃⁻ Z es acilo (C₂-C₄), x'' es OH o SO₃⁻, m es 4, 5 o 6, para un grado de sulfatación de 3,55 a 4, las unidades urónicas están presentes alternativamente, partiendo con una unidad glucurónica o idurónica y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

Dichos cationes son ventajosamente aquellos de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, de amonio, tetralquilamonio (C₁-C₄), aluminio y zinc y, entre estos, preferiblemente las sales de sodio, calcio y tetrabutylamonio.

En todos los N-acil-epiK5-amina-O-sobresulfatos mostrados anteriormente, en particular aquellos de la fórmula IV, IV', IV'a, IV'b como también en la estructura b'', el grupo acilo (Z) es preferiblemente una acilo (C₂-C₄) seleccionado del anterior grupo que consiste de acetilo, (2-carboxy)acetilo, (2-metoxicarbonil)acetilo, (2-

etoxycarbonil) acetilo, propenilo, (3-carboxi)propionilo, N-(3-metoxycarbonil)propionilo y (3-etoxycarbonil)propionilo.

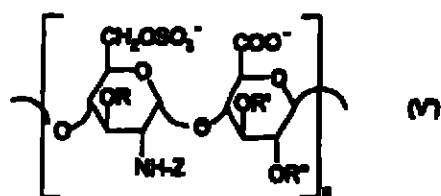
De acuerdo con otro de sus aspectos, la invención suministra nuevos derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadena tiene la fórmula V



En la cual n es un entero de 2 a 100, preferiblemente de 3 a 100, Z es acilo (C₂-C₄), R, R' y R'' son hidrógeno o SO₃⁻, el grado de sulfatación es al menos 2,2, ventajosamente de 2,2 a 3 o de 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9 y el catión correspondiente es química y farmacéuticamente aceptable.

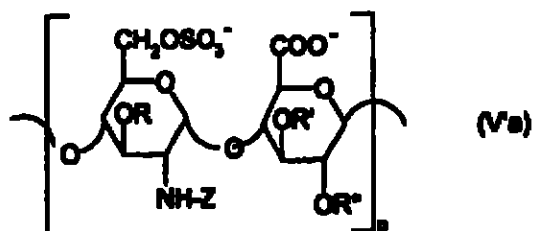
Particularmente interesantes son los nuevos N-acil-LMW-K5-amina-O-sobresulfatos que consisten de una mezcla de

cadena en las cuales al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula V'



En la cual q es un entero de 2 a 20, Z es acilo (C₂-C₄), R, R' y R'' representan hidrógeno o un grupo SO₃⁻ para un grado de sulfatación de al menos 2,2. Ventajosamente de 2,2 a 3 o de 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9 y el catión correspondiente es ion química y farmacéuticamente aceptable.

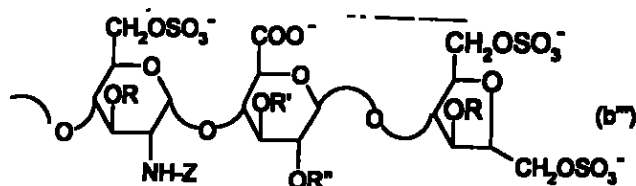
Entre estos N-acil-LMW-K5-amina-O-sobresulfatos son preferidos aquellos que consisten de una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes tienen la fórmula V'a



En la cual p es un entero de 4 a 8, Z es acilo (C_2-C_4), R , R' y R'' son como se definió anteriormente, el grado de sulfatación es de al menos 2,2, ventajosamente de 2,2 a 3 o de 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

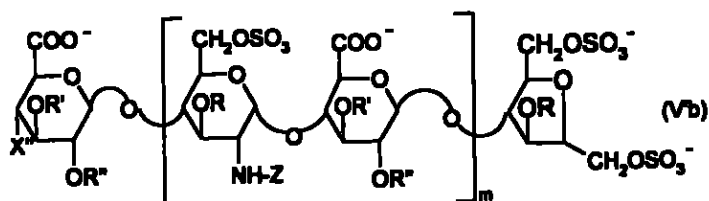
El origen de los nuevos N-acil-LMW-epiK5-amina-O-sobresulfatos proveniente de LMW-epiK5-sulfatos obtenidos mediante despolimeración nitrosa y la subsecuente reducción con, por ejemplo, borohidruro de sodio, involucran, en el extremo reductor de la mayorías de las cadenas en dicha mezcla de cadena, la presencia de una unidad de 2,5-anhidromanitol sulfatada de estructura (a') como se mostró anteriormente, en la cual R'' representa hidrógeno o SO_3^- .

Así, el extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dichas mezclas de cadenas es representado por la estructura (b''')



En la cual Z, R, R' y R'' son como se definió anteriormente.

Entre los nuevos N-acil-LMW-K5-amina-O-sobresulfatos, anteriormente mencionados, son preferidos aquellos que consisten de mezclas en las cuales las especies preponderantes son un compuesto de fórmula V'b



En la cual Z es acilo (C_2-C_4), R, R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- , X'' es OH o OSO_3^- para un grado de sulfatación de al menos 2,2, ventajosamente de 2,2 a 3 o de 2,3 a 3, más ventajosamente de 2,5 a 3, preferiblemente de 2,7 a 2,9, m es 4, 5 o 6 y el catión correspondiente es un ion química o farmacéuticamente aceptable.

En todos los N-acil-K5-amina-O-sobresulfatos mostrados anteriormente, en particular aquellos de la fórmula V, V', V'a, V'b, como también en la estructura de b''', el grupo acilo (Z) es preferiblemente un acilo (C₂-C₄) seleccionado de entre el grupo que consiste de acetilo, (2-carboxi)acetilo, (2-metoxycarbonil)acetilo, (2-etoxycarbonil)acetilo, propionilo, (3-carboxi)propionilo, N-3-metoxycarbonil)propionilo y (3-etoxycarbonil)propionilo.

Particularmente interesantes son los N-acil-K5-amina-O-sobresulfatos mostrados anteriormente en los cuales Z es un acilo (C₂-C₄) diferente acetilo. También interesante y particularmente activos son los N-acil-K5-amina-O-sobresulfatos mostrados anteriormente, en los cuales Z es acetilo, que tiene un grado de sulfatación de 2,7-2,9 preferiblemente de aproximadamente 2,8.

Los nuevos derivados de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato, especialmente en su forma de sales, son productos altamente aniónicos capaces de capturar los radicales libres. Estos pueden ser utilizados en la industria de cosméticos como coadyuvantes contra la pérdida de pelo o para preparar cremas "anti-

envejecimiento", pero son todos los anteriores útiles en la industria farmacéutica, como productos para el tratamiento de dermatitis y como microbiocidas.

Así, de acuerdo con uno de sus aspectos adicionales, la presente invención suministra composiciones farmacéuticas que incluyen como uno de sus ingrediente activos, una cantidad farmacológicamente activa de un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato como se mostró anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con excipiente farmacéutico.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, subcutánea, intravenosa, intradérmica o tópica, los ingredientes activos son preferiblemente administrados en la forma de unidades de dosis, en mezcla con excipientes o vehículos farmacéuticos clásicos. El régimen de dosis puede variar ampliamente dependiendo de la edad, el peso y la condición de salud del paciente. Este régimen de dosis incluye la administración de una dosis de 1 a 1000 mg, ventajosamente de 10 a 750 mg, preferiblemente 250 a 500 mg de una a tres veces por día mediante administración intravenosa, subcutánea, oral, transdérmica, o tópica

La presente invención también suministra una composición cosmética que incluye una cantidad efectiva de un derivado N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfatado o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con un excipiente cosmético.

Además, la presente invención suministra una composición farmacéutica que incluye, como uno de sus ingredientes activos un derivado (epi)K5-amina-O-sobresulfato obtenido de acuerdo con las etapas (a) y (b) del proceso descrito anteriormente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y mezcla con un excipiente farmacéutico. Ventajosamente, dicho derivado de (epi)K5-amina-O-sobresulfato es consistente de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadena tiene la fórmula II, II', III o III' o en las cuales las especies preponderantes tienen un compuesto de fórmula IIa, II'a, III'a o III'b. el ingrediente activo preferido es el LMW-K5-amina-O-sobredulfato que tienen un grado de sulfatación de 2,2 a 3, ventajosamente tiene un peso molecular medio y aproximadamente 3.500 a aproximadamente 11.000, más ventajosamente de aproximadamente 3500 a

aproximadamente 5.200 y básicamente libre de grupos N-acetil y N-sulfato.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral subcutánea, intravenosa, transdérmica o tópica, los derivados de (epi)K5-amina-O-sobresulfatos ingredientes activos son preferiblemente administrados en la forma de unidades de dosis, en mezcla con los excipientes o vehículos farmacéuticos clásicos. El régimen de dosis puede variar ampliamente dependiendo de la edad, el peso y la condición de salud del paciente. Este régimen de dosis incluye la administración de una dosis de un derivado de (epi)K5-amina-O-sobresulfato de 1 a 1.000 mg, ventajosamente de 10 a 750 mg, preferiblemente 250 a 500 mg de 1 a 3 veces al día mediante administración intravenosa, subcutánea, oral, transdérmica o tópica.

La composición farmacéutica que incluye un derivado de (epi)K5-amina-O-sobresulfato tal como aquí mostrados anteriormente son formulados con los excipientes clásicos adecuados para diferentes forma de administración. Particularmente ventajosas son las formulaciones en la forma de cremas como ungüentos, linimentos, geles,

espumas, bálsamos, supositorios vaginales, supositorios, soluciones o suspensiones adecuadas para administración local. Finalmente, la presente invención suministra una composición farmacéutica que contiene, como uno de sus ingredientes activos, una cantidad farmacéuticamente activa de un LMW-(epi)K5-N-sulfato, es decir, de un LMW-K5-N-sulfato o de un LMW-epiK5-N-sulfato como se mostró anteriormente o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con excipiente farmacéutico.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, subcutánea, intravenosa, transdérmica o tópica, los ingredientes activos son preferiblemente administrados en la forma de unidades de dosis, en mezcla con excipientes o vehículos farmacéuticos clásicos.

El régimen de dosis puede variar ampliamente dependiendo de la edad, peso y condición de salud del paciente. Este régimen de dosis incluye la administración de una dosis de 1 a 1.000 mg, ventajosamente de 10 a 750 mg, preferiblemente 250 a 500 mg de 1 a 3 veces al día mediante administración intravenosa, subcutánea, oral, transdérmica o tópica.

De acuerdo con otro de sus aspectos la presente invención también suministra una composición cosmética que contiene como uno de sus ingredientes activos una cantidad efectiva de LMW-K5-N-sulfato o LMW-(epi)K5-N-sulfato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con un excipiente cosmético.

Ventajosamente, dicho derivado de LMW-(epi)K5-N-sulfato es consistente de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadena tiene la fórmula I, I', o en las cuales las especies preponderantes son un compuesto de fórmula Ia, I'b. El ingrediente activo preferido es el derivado LMW-(epi)K5-N-sulfato que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1 a aproximadamente 12.000, ventajosamente de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 8.000, preferiblemente de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 7.500 y básicamente libre de grupos N-acetilo.

Una sal seleccionada del grupo que consiste de sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, de amonio, tetraalquilamonio (C₁-C₄), aluminio o zinc, en particular la sal de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio o

zinc constituyen un ingrediente activo efectivo de las composiciones de la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin embargo limitarla.

PREPARACIÓN I

LMN-epiK5-N-sulfato

a) Epimerización de K5-N-sulfato

2 g de K5 N-sulfato, obtenido como se describió en el ejemplo 1, estas etapas (i) y (ii), de la WO02/068477, son disueltos en 120 ml de 25 ml de un amortiguador HEPES, pH 7, que contiene 50 mM de CaCl_2 . La solución obtenida se hace recircular a través de una columna de 50 ml llenada con la resina que contiene la enzima inmovilizada obtenida como se describió en la WO 96/14425. Esta operación es llevada a cabo a 30° C con un flujo de 200 ml/h durante 24 horas. El producto obtenido es purificado a través de ultrafiltración sobre una membrana de 1.000 D el paso sobre una columna de intercambio iónico 1R 120 H^+ , neutralizando el eluado con

291

NaOH 1N. La muestra es recuperada mediante precipitación con etanol o acetona.

Un producto epimerizado se obtiene con una proporción de ácido idurónico / ácido glucurónico de 55/45 contra una promoción de 0/100 de producto o partida. El porcentaje de epimerización se calculó con ^1H -RMN de acuerdo con el método descrito en la WO 96/14425. El rendimiento, calculado mediante la revisión del contenido de ácidos urónicos contra un estándar con el método de carbazol (Bitter y Muir Anal. Biochem. 39, 88-92-1971) es 90%.

b) Despolimerización del epi-K5-N-sulfato

1 g del producto obtenido en la etapa (a) se despolimeriza mediante el método de degradación con ácido nitroso y la subsecuente reducción del aldehído que forma. En particular uno continua disolviendo el producto del 25 ml y agua destila y agregándola con 230 mg de nitrito de sodio disuelto en 115 ml de agua destilada. Las solución es luego llevada a 4° C y al pH 2 con HCl 0,1 N y mantenida durante 30 minutos. Al final de la reacción la solución es llevada a temperatura ambiente de

con NaOH 0,1 M. la solución es luego agregada con 450 mg de NaBH_4 y se hace reaccionar durante 4 horas. El producto es recuperado por precipitación con tres volúmenes de acetona a 4° C, filtración con un embudo de filtración y secada a 40° C en un horno de vacío, 900 mg del LMW-epiK5-N-sulfato son obtenidos con una distribución de peso molecular medida con el método HPLC que varia desde 1.000 a 4.000 y con un contenido unidad glucurónica de 45% y contenido de idurónica de 55%.

PREPARACIÓN II

LMW-K5-N-sulfato

El producto obtenido como se describió en el ejemplo 1, etapas (i) y (ii), de la WO02/068477 se despolimeriza mediante el método de degradación con ácido nitroso y la subsecuente reducción del aldehído que forma. Uno continua disolviendo un 1 g de K5-N-sulfato en 200 ml de agua destilada y agregándola con 480 mg de nitrito de sodio disuelta en 240 ml de agua destilada. La solución es luego llevada a 4° C y el pH a 2 con HCl 0,1 M y mantenida durante 30 minutos. Al final de la reacción la

solución es llevada a pH 7 con NaOH 0,1 M y luego a temperatura ambiente de cuarto. La solución es luego agregada con 450 mg de NaBH₄ y se hace reaccionar durante 4 horas. El exceso de NaBH₄ se elimina con HCl llevando el pH a 5-6. El producto neutralizado con NaOH 0,1 M es recuperado por precipitación con tres volúmenes de acetona a 4° C, filtración con un embudo de filtración y secada a 40° C en un horno de vacío. Son obtenidos 900 mg del LMW-K5-N-sulfato con peso molecular medio de aproximadamente 2.000, que consiste de una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes son un compuesto de fórmula I'b en la cual m es 4 y las unidades urónicas son aquellas de ácido glucurónico.

PREPARACIÓN III

a) Despolimerización del K5-N-sulfato

2 g de K5 N-sulfato, obtenido como se describió en el ejemplo 1, etapas (i) y (ii), de la WO02/068477 se despolimerizan como se describió en la PREPARACIÓN II, utilizando 100 mg de nitrito de sodio y 300 mg de

borohidruro de sodio. Son obtenidos 1,8 g de LMW-K5-N-sulfato con un peso molecular medio de 5.000

b) **Epimerización de LMW-K5-N-sulfato**

1 g de LMW-K5-N-sulfato obtenido en la etapa (a) se trata como se describió en la etapa (a) del ejemplo 1. Un producto epimerizado es obtenido con una proporción de ácido idurónico/ácido glucurónico de 44/56 contra una proporción de 0/100 del producto de partida, con una distribución de peso molecular de 2.000 a 10.000 y con un peso molecular medio de 5.000 D. El rendimiento calculado al medir el contenido de ácidos urónico contra un estándar con el método de carbazol (Bitter and Muir Anal. Biochem. 39,88-92-1971) es 90%.

PREPARACIÓN IV

Preparación del epiK5-N-sulfato

Una solución de 10 g de K5-N-sulfato se obtiene como describió en el ejemplo 1, etapas (i) y (ii), de la WO 02/068477 en 600 ml de 25 mM de un amortiguador HEDED a

pH 7, que contiene CaCl_2 a una concentración de 50 mM se hace recircular a través de una columna de 50 ml llena con resina 4B sefarosa que contiene 5g de la epimerasa C5-recombinante (WO 96/14425) inmovilizada como se describió en WO 01/72848. La reacción es llevada a acabo a 30° C a un pH 7 con un flujo de 200ml/h durante 24 horas. El producto obtenido se purifica mediante ultrafiltración y precipitación con etanol. Así se obtiene un epiK5-N-sulfato cuyo contenido de ácido idurónico es 54%.

PREPARACIÓN V

Preparación de LMW-epiK5-N-sulfato

Un 1 g del producto obtenido de la PREPARACIÓN IV se despolimeriza mediante el método de degradación con ácido nitroso y la subsecuente reducción del aldehído que forma. En particular uno continúa disolviendo el producto 25 ml de agua destilada y agregándola con 230 mg de nitrito de sodio disuelto en 115 ml de agua destilada. La solución es luego llevada a 4° C y el pH 2 con HCl 0,1 N y mantenida durante 30 minutos. Al final de la reacción

la solución es llevada temperatura de ambiente de cuarto y el pH a 7 con NaOH 0,1 M. La solución es luego agregada con 450 mg de NaBH₄ y hecha reaccionar durante 4 horas. El producto es recuperado mediante precipitación con tres volúmenes de acetona a 4° C, la filtración con un embudo de filtración y secada a 40° C en un horno de vacío. Son obtenidos 900 mg del LMW-K5-N-sulfato con una distribución de peso molecular medida con el método HPLC que varia desde 1.000 a 4.000.

EJEMPLO 1

EpiK5-amina-O-sobresulfato

a) Sal de Teterbutilamonio de epiK5-N-sulfato

Una solución de 400 mg de epiK5-N-sulfato con un contenido de ácido idurónico del 54% como se obtuvo en la preparación IV en 40 ml de agua es termoestablecido en 4° C, luego pasado sobre una resina de intercambio iónico 1R 120 H⁺ reacondicionada con agua a 4° C. El eluado obtenido consiste de 100 ml de una solución a pH 1,94, es neutralizada con una solución de 15% de hidróxido de

297

tetrabutylamonio y dejada a temperatura ambiente de cuarto durante 1 hora, manteniendo el pH en 7 mediante la adición de 15% de hidróxido de tetrabutylamonio y finalmente es liofilizado. Así se obtiene 805 mg de sal de tetrabutylamonio de epiK5-N-sulfato.

b) Epi-K5-amina-O-sobresulfato

A una solución que contiene 805 mg de la sal así obtenida en 30 ml de dimetilformamida se ajusta a 45° C y se trata con 30 ml de dimetilformamida que contiene 2,26 g del aducto piridina.SO₃. la reacción a 55° C se continua durante toda la noche y luego 60 ml de agua se agregan a la mezcla. Después de la neutralización con NaOH 1N, el producto especificado con tres volúmenes de acetona saturada con NaCl y ajustada a 4° C durante la noche. El precipitado se recupera mediante filtración sobre Duch G4 y luego ultrafiltrada con un sistema Millipore TFF de 1.000 D y secada a presión reducida. Se obtienen 550 mg de epi-K5-amina-O-sobresulfada que tiene un contenido de ácido idurónico del 54%, de glucosamina 6-O-sulfato del 100% de glucosamina 3-O-sulfato del 60% de ácido mosulfaro glucurónico del 10%, de ácido monosulfato y

idurónico del 15% el resto de las unidades urónicas son disulfatadas, con un grado de sulfatación de 3,55 medido con el método conductométrico de acuerdo con Casu et al. 1975.

EJEMPLO 2

N-acetil-epiK5-amina-O-sobresulfato

A una solución 250 mg de epi-K5-amina-O-sobresulfato obtenida del ejemplo 175 ml de y enfriado a 4° C se agrega 7,5 ml de etanol y 3,75 ml de anhídrido acético. La reacción es mantenida a 4° C durante 2 horas manteniendo el pH un valor de 7 con NaOH 5M. Después de ultrafiltración sobre una membrana de 1.000 D son agregados tres volúmenes de acetona saturada con cloruro de sodio y el precipitado se recupera mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos. Así se obtienen 249 mg de N-acetil-epiK5-amina-O-sobresulfatada con un no contenido de ácido idurónico del 54%, glucosalina-6-O-sulfato del 100%, N-acetil del 100%, glucosalina 3-O-sulfato del 30%, ácido monosulfato

299

glucurónico del 10%, ácido monosulfato idurónico del 15%, el resto de las unidades urónicas son disulfatadas, y cuyo grado de sulfatación es 3,5 medido con el método conductimétrico de acuerdo con Casu et al.1975.

EJEMPLO 3

N-acetil-K5-amina-O-sobresulfato

1 gr de K5 N,O sobresulfato obtenido en el Ejemplo 2 de la WO/020668477 se disuelven en 200 ml de agua y la solución es llevada a un pH 2 con HCl 1 N y termoestablecida a 50° C. La reacción es mantenida a 50° C durante 3 horas y luego enfriada a temperatura ambiente de cuarto y neutralizada con NaOH 1 N. la muestra es luego enfriada a 4° C y 20 ml de Me OH y 10 ml de anhídrido acético son agregados a la reacción que es dejada a 4° C durante 2 horas manteniendo el pH constantemente en 7. Al final de la reacción la muestra es purificada de sales mediante ultrafiltración sobre una membrana con una separación de 1.000 D y luego recuperada y secada a presión reducida. Se obtiene un producto 100%

N-acetilado, 100% 6-O sulfato, 30% monosulfato y 70% bisulfato sobre el ácido glucurónico.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la preparación de derivados N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato y de sus sales química o farmacéuticamente aceptables, caracterizados por que

(d) Un derivado derivado de (epi)K5-N-sulfato, en forma ácida, es tratado con un base orgánica terciara o cuaternaria, permitiéndole a la mezcla de reacción permanecer durante un periodo de tiempo de 30-60 minutes, manteniendo el pH de la solución a un valor de aproximadamente 7 y su sal es aislada con dicha base orgánica;

(e) Dicha sal de base orgánica de dicho derivado (epi)K5-N-sulfato es tratada con un reactivo de O-sulfatación en las condiciones de O-sobre sulfatación;

(f) El derivado (epi)K5-amina-O-sobresulfato así obtenido es tratado con un derivado funcional de un ácido carboxílico (C_2-C_4), el derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato es aislado.

2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho derivado de N-acilo-(epi)K5-N, O-sobre sulfato es aislado en forma de sal sodio y opcionalmente dicha sal de sodio es transformada en otra sal química o farmacéuticamente aceptable.
3. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que, en la etapa (a) se utiliza hidróxido de tetrabutilamonio como una base orgánica.
4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizados por que, en la etapa (b) O-sobresulfatación es llevada a cabo el dimetilformamida utilizando 2-4 moles de un reactivo de O-sulfatación por OH disponible por disacárido a una temperatura de 40-60° C durante 15-20 horas.
5. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que

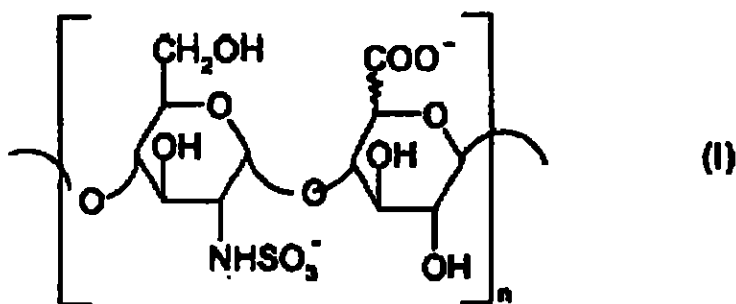
como material de partida es utilizado un (epi)K5-N-sulfato que tiene un peso molecular en medio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 25.000.

6. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dichos materiales de partida son 40-60% C5-epimerizados.
7. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicho material de partida tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 25.000.
8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que dicho material de partida tiene un peso molecular medio entre 10.000 y 25.000.
9. Proceso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que dicho material de partida

tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 12.000.

10. Proceso de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado por que dicho material de partida tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 8.000.

11. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que como material de partida se utiliza un derivado de (epi)K5-N-sulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula 1



En la cual la proporción de unidades glucurónicas/unidades idurónicas van de 100/0 a 40/60, n es un entero de 2 a 100 y el catión.

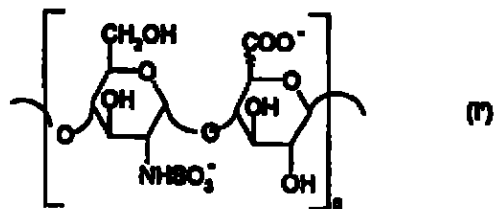
correspondiente es químicamente o farmacéuticamente aceptable.

12. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que dicho material de partida es consistente en una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula I, en la cual las unidades urónicas son 40-60% consistentes de ácido idurónico.

13. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que dicho material de partida es un LMN-(epi)K5-N-sulfato que consistente de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula I, en la cual las unidades urónicas son todas consistentes ácido glucurónico o son 40-60% consistentes de ácido idurónico, n es un entero de 3 a 15 y el catión correspondiente es químicamente aceptable.

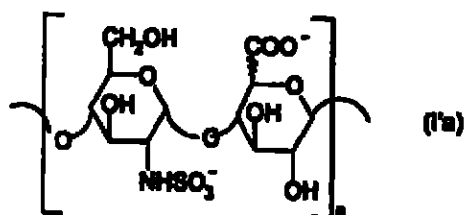
14. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que dicho material de partida es un LMW-(epi)K5-N-sulfato consistente de una

mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula I'



En la cual las unidades urónicas son 100% consistentes de ácido glucurónico o son 60-40% de ácido glucurónico y 40-60% de ácido idurónico, n es un entero de 2 a 20 y el catión correspondiente es químicamente o farmacéuticamente aceptable.

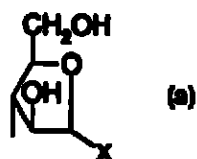
15. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que dicho material de partida es un LMW-(epi)K5-N-sulfato consistente de una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes tienen la fórmula I'a



En la cual las unidades urónicas son 100% consistentes de ácido glucurónico o son 60-40% glucurónico y 40-60% de ácido idurónico, p es un entero de 4 a 8.

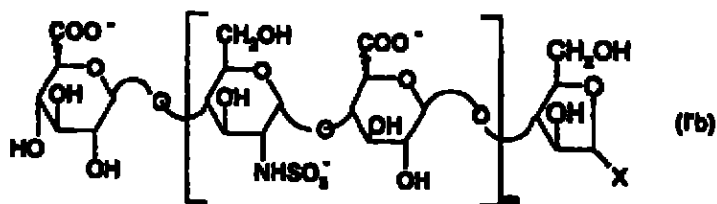
16. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, caracterizado por que dicho material de partida es un LMW-(epi)K5-N-sulfato obtenido mediante despolimerización nitrosa del correspondiente (epi)K5-N-sulfato y la subsecuente reducción.

17. Proceso de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado por que dicho LMW-(epi)K5-N-sulfato de partida contiene, en extremo reductor de la mayoría de las cadenas en dicha mezcla de cadena una unidad 2,5-anhidromano de estructura (a)



en la cual X representa un grupo hidroximetilo.

18. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, caracterizado por que como material de partida se utiliza un LMW-(epi)K5-N-sulfato que consiste de mezclas de cadenas en las cuales las especies preponderantes son un compuesto de fórmula I'b



En la cual X es hidroximetilo, m es 4, 5 o 6, el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable, las unidades urónicas son todas de ácido glucurónico o las unidades glucurónica e idurónicas están presente

alternativamente, partiendo con una unidad glucurónica o idurónica

19. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizada por que dicho derivado (epi)K5-N-sulfato de partida es utilizado en forma de sal de sodio.

20. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato obtenible de acuerdo al proceso de la reivindicación de la 1 a la 19.

21. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 20 en forma de sal de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo, de amonio, de tetralquilamonio (C₁-C₄) , aluminio o zinc.

22. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato en el cual el acilo es un acilo (C₂-C₄), que tiene un contenido de ácido idurónico de 20-60%, un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 a 45.000 y un grado de de sulfatación de al menos

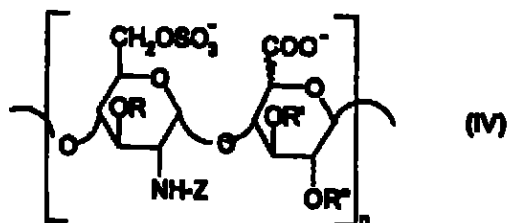
3,4, o una de sus sales química o farmacéuticamente aceptable.

23. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 22, cuyo peso molecular medio está entre aproximadamente 15.000 y aproximadamente 45.000.

24. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 22, cuyo peso molecular medio está entre aproximadamente 4.500 y aproximadamente 8.500.

25. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a 24, caracterizado por que dicho grado de sulfatación va 3,4 a 3,8.

26. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato que consiste de mezclas de cadena en las cuales al menos 90% de dichas cadenas tiene la fórmula IV

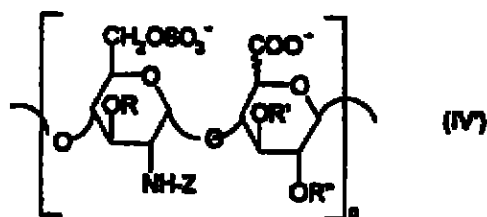


En la cual las unidades urónicas son 20-60% consistente de ácido idurónico, n es un entero de 2 a 100, R , R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- , Z es acilo ($\text{C}_2\text{-C}_4$), el grado de sulfatación es al menos 3,4, y el catión correspondiente es químicamente farmacéuticamente aceptable.

27. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 26 caracterizado por que este consiste de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula IV en la cual las unidades urónicas son 40-60% consistentes de ácido idurónico n es un entero de 3 a 100, con un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 45.000, R es al menos 40% SO_3^- , R' y R'' son ambos SO_3^- o uno es hidrógeno y el otro es 5-10% SO_3^- en ácido monosulfato glucurónico y 10-15% SO_3^- en

ácido monosulfato idurónico y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

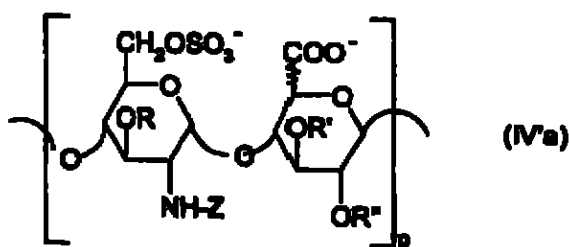
28. Un derivado de N-acil-(epi)K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 y 27, caracterizado por que un LMW-N-acilo-epiK5-O-sobresulfato que consistente de una mezcla de cadena de la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula IV'



En la cual q es un entero de 2 a 20, R, R' y R'' representan hidrógeno o un grupo SO₃⁻ para un grado de sulfatación de 3,55 a 4, Z es acilo (C₂-C₄) y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

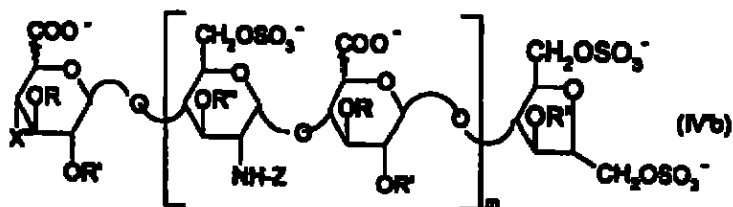
29. Un LMW-N-acil-(epi)K5-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 28, caracterizado por que en dicha mezcla de cadena de fórmula IV' las unidades urónicas son 50-55% consistente de ácido idurónico, R es al menos 40% SO_3^- , R' y R'' son ambas SO_3^- o uno es hidrógeno y el otro 5-10% de SO_3^- en ácido glucurónico y 10-15% SO_3^- en ácido idurónico, q es un entero de 3 a 15, con un peso molecular medio de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 9.000 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

30. Un lmw-N-acilo-epiK5-O-sobresulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29, caracterizado porque este consiste de una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes es un compuesto de fórmula IV'a



En la cual p es un entero de 4 a 8, R , R' y R'' son hidrógeno o un grupo SO_3^- para un grado de sulfatación de 3,55 a 4, Z es acilo ($\text{C}_2\text{-C}_4$), y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

31. Un $\text{lmw-N-acilo-epiK5-O-sobresulfato}$ de acuerdo con la reivindicación 30 caracterizado porque dichas especies preponderantes son un compuesto de fórmula IV'b

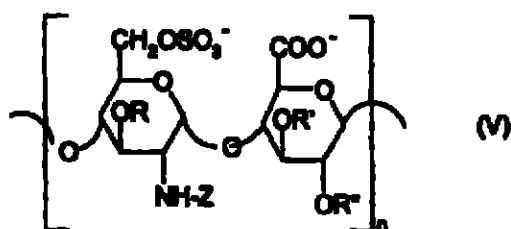


En el cual R , R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- , Z es acilo ($\text{C}_2\text{-C}_4$), X'' es OH o OSO_3^- , m es 4, 5 o 6, para un grado de sulfatación de 3,55 a 4, las unidades urónicas están presentes alternativamente, partiendo con una unidad glucurónica o idurónica, y el catión correspondientes es química o farmacéuticamente aceptable.

32. Un lmw-N-acilo-epiK5-O-sobresulfato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 31 en la cual el acilo (C_2-C_4) sustituyente es seleccionado del grupo que consiste de un acetilo, (2-carboxi) acetilo, (2-metoxycarbonilo)acetilo, (2-etoxycarbonil)acetilo, propionilo, (3-carboxi)propionilo, N-(3-metoxycarbonil)propionilo y (3-etoxycarbonil)propionilo.

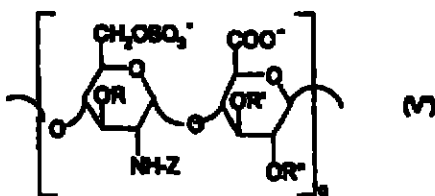
33. Un derivado lmw-N-acilo-epiK5-O-sobresulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 32, caracterizado porque dicha sal o un catión correspondiente es un metal alcalino o metal alcalinotérreo, y amoni, tetraalquilamonio (C_1-C_4), aluminio o zinc.

34. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tienen la fórmula V



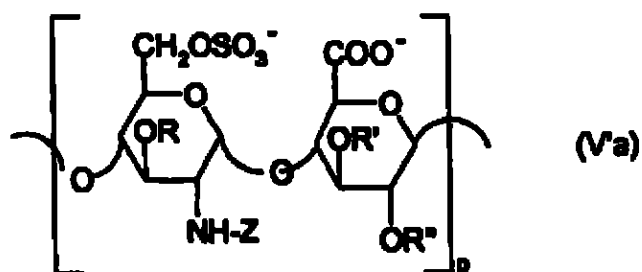
En la cual n es un entero de 2 a 100, Z es acilo ($\text{C}_2\text{-C}_4$), R , R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- el grado de sulfatación es al menos de 2,2, y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

35. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 34, caracterizado porque este es un lmw-N-acil-K5-amina-O-sobresulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula V'



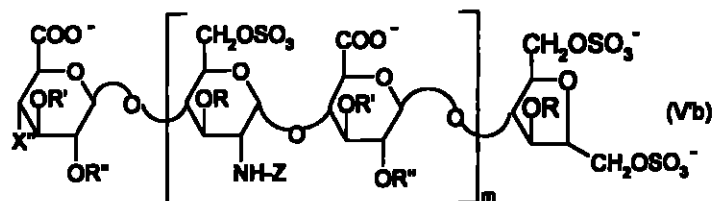
En la cual q es un entero de 2 a 20, Z es acilo(C_2-C_4), R , R' y R'' representan hidrógeno o un grupo SO_3^- para un grado de sulfatación de 2,2 a 3 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

36. Un lmw-N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 35, caracterizado porque este consiste en una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes son un compuesto de fórmula V'a



En la cual p es un entero de 4 a 8, Z es acilo (C_2-C_4), R , R' y R'' representan hidrógeno o un grupo SO_3^- para un grado de sulfatación de 2,2 a 3 y el catión correspondiente es química o farmacéuticamente aceptable.

37. Un 1mw-N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 36, caracterizado porque dichas especies preponderantes son un compuesto de fórmula V'b



En la cual Z es acilo (C_2-C_4), R, R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- , X'' es OH u OS_3^- , para un grado de sulfatación de 2,2 a 3 m es 4, 5 o 6 y el catión correspondiente es un ión química o farmacéuticamente aceptable.

38. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, caracterizado porque dicho grado de sulfatación es de 2,3 a 3.

39. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 38, caracterizado porque dicho grado de sulfatación va de 2,5 a 3.

40. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 39, caracterizado porque dicho grado de sulfatación va de 2,7 a 2,9.
41. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 34 a la 40, en la cual el sustituyente acilo (C_2-C_4) es diferente de acetilo.
42. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 34 a la 40, en la cual el sustituyente ha sido acilo (C_2-C_4) es acetilo, que tiene un grado de sulfatación de 2,7-2,9.
43. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con la reivindicación 42, que tiene un grado de sulfatación de aproximadamente 2,8.
44. Un derivado de N-acil-K5-amina-O-sobresulfato de acuerdo con una cualquiera de las

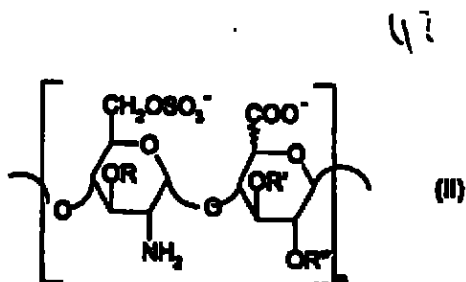
reivindicaciones de la 34 a la 43, caracterizado porque dicha sal o catión correspondientes es un metal alcalino o un metal alcalinotérreo, de amonio, tetraalquilamonio (C₁-C₄), aluminio de zinc.

45. Composición farmacéutica que incluye, como uno de sus ingredientes activos, un derivado de (epi) K5-amina-O-sobresulfato o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, obtenida por el proceso de acuerdo con las etapas (a) y (b) de la reivindicación 1, aislado en forma de sal de sodio y opcionalmente transformado en otra sal farmacéuticamente aceptable en mezcla con excipiente farmacéutico.

46. Composición de acuerdo con la reivindicación 45 caracterizada en que dicho ingrediente activo es un derivado de (epi)k5-amina-O-sobresulfato que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 40.000.

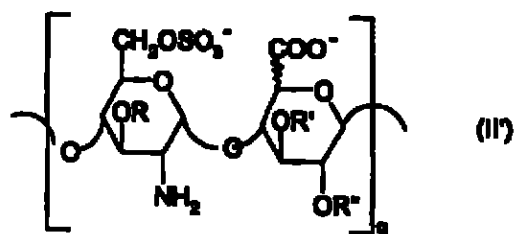
47. Composición farmacéutica de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 45 y 46, en la

cual dicho ingrediente activo es un derivado de (epi)k5-amina-O-sobresulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula II



En la cual n es un entero de 2 a 100, R, R', y R'' son hidrógeno o SO₃⁻, las unidades urónicas son todas de ácido glucurónico, para un grado de sulfatación de 2,2 a 3, o son 20-60% consistentes de ácido idurónico, para un grado de sulfatación de al menos 3,4, y el catión correspondiente es farmacéuticamente aceptable.

48. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 47, caracterizada porque dicho ingrediente activo es un LMW-epiK5-amina-O-sobresulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula II'

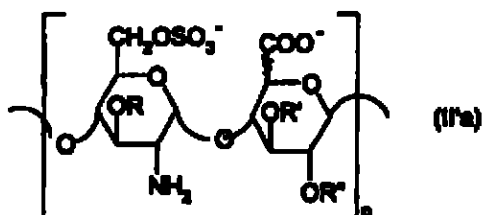


En la cual q es un entero de 2 a 20, R , R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- las unidades urónicas son 20-60% comprendidas, preferiblemente 40 - 60% de ácido idurónico, para un grado de sulfatación de 3,55 a 4.

49. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 48, caracterizada porque, en dicha mezcla de cadena de fórmula II', las unidades urónicas son 40-60% consistentes de ácido idurónico, R es al menos 40% SO_3^- , R' y R'' son ambos SO_3^- , o uno es hidrógeno y el otro es 5-10% SO_3^- en ácido glucurónico y 10-15% de SO_3^- en ácido idurónico, n es un entero de 3 a 15, con un peso molecular medio de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 8.000.

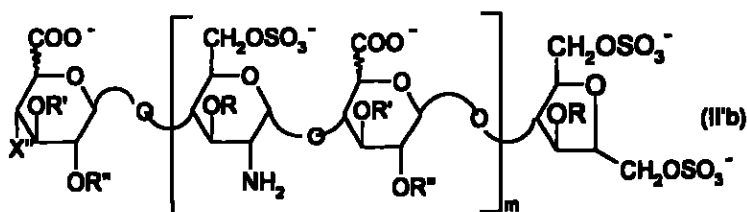
50. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 48 y 49,

caracterizado porque dicho LMW-epiK5-amina-O-sobresulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes tiene la fórmula II'a



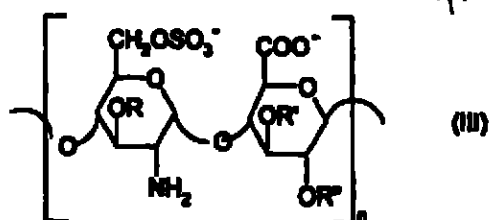
En la cual q es un entero de 4 a 8, R, R' y R'' son como se definió anteriormente, el grado de sulfatación va de 3,55 a 4 y el catión correspondiente es farmacéuticamente aceptable.

51. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 50, caracterizado porque dichas especies preponderantes es un compuesto de fórmula II'b



En la cual R, R' y R'' son hidrógeno o SO₃⁻, X'' es OH o OS₃⁻, m es 4, 5 o 6, las unidades urónicas son 40-60% consistentes de ácido idurónico, para un grado de sulfatación de 3,55 a 4, las unidades idurónicas están presentes alternativamente, partiendo con una unidad glucurónica o idurónica, y el correspondiente es un ión farmacéuticamente aceptable.

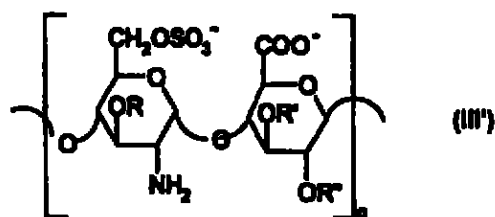
52. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 45, que incluye como uno de sus ingredientes activos un derivado de K5-amina-O-sobresulfato consistente de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula III



En la cual n es un entero de 2 a 100, R, R' y R'' son hidrógeno o SO₃⁻, y el grado de sulfatación es

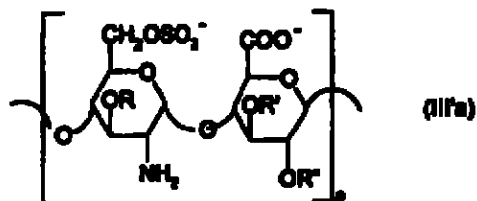
al menos 2,2, y el catión correspondiente es farmacéuticamente aceptable.

53. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 52, caracterizado porque dicho ingrediente activo es un lmw-K5-amina-O-sobresulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual al menos el 90% de dichas cadenas tiene la fórmula III'



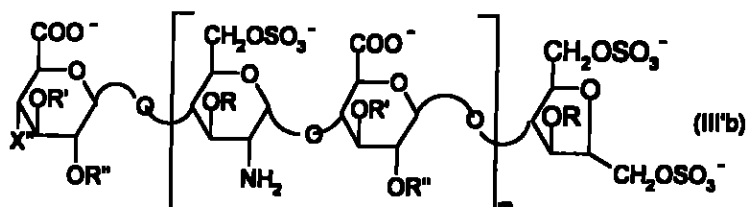
En la cual q es un entero de 2 a 20, R, R' y R'' representan hidrógeno o un grupo SO₃⁻ para un grado de sulfatación de al menos 2,2.

54. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 53, caracterizada porque dicho lmw-K5-amina-O-sobresulfato que consiste de una mezcla de cadena en la cual las especies preponderantes tienen la fórmula III'a



En la cual p es un entero de 4 a 8, R , R' y R'' son como se definió anteriormente, el grado de sulfatación es de 2,2 a 3.

55. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 50, caracterizado porque dichas especies preponderantes es un compuesto de fórmula III'b



En la cual R , R' y R'' son hidrógeno o SO_3^- , X'' es OH u OSO_3^- , para un grado de sulfatación de 2,2 a 3, m es 4, 5 o 6 y el catión correspondiente es un ión farmacéuticamente aceptable.

56. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 45 a 55 caracterizada porque dicha sal o catión farmacéuticamente aceptable son sodio, potasio, calcio, magnesio o zinc.
57. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 45 a 56 caracterizada porque este está en la forma de una crema, un ungüento, linimento, gel, espuma, bálsamo, supositorio vaginal, supositorio, solución o suspensión para administración local.
58. Una composición farmacéutica que contiene, como uno de sus ingrediente activos, una cantidad farmacológicamente activa de un $\text{lmw-(epi)k5-N-sulfato}$ básicamente libre de grupos acetilo, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con un excipiente farmacéutico.
59. Una composición cosmética que contiene una cantidad efectiva de un $\text{lmw-(epi)k5-N-sulfato}$ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10 y de 25 a 37, en la cual dicha sal o catión es farmacéuticamente aceptable, en mezcla con un excipiente cosmético.

RESUMEN

Se describe un nuevo método para la sobresulfatación de (epi)K5-N-sulfatos para obtener (epi)K5-amina-O-sobresulfatos a un grado extremadamente alto de sulfatación y para la transformación de estos intermedios en nuevos N-acil-(epi)K5-amino-O-sobresulfato básicamente libres de actividad sobre los parámetros de coagulación y útiles en el campo cosmético o farmacéutico. También se describen composiciones farmacéuticas que contiene, como uno de sus ingredientes activos, un (epi)K5-amina-O-sobresulfato.

329

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 78,230
FECHA : OCTUBRE 10 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31556192	10/10/2005	37,664,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	91,000.00
		TOTAL :	\$ 91,000.00

SON: NOVENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo 14594-841-002-5

339

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación N°	04-129790
	Solicitud Internacional	PCT/IB03/02339
	Fecha límite de inicio en fase nacional	18/01/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio N°	1627
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en el asunto, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486, de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y comercio, se envía el extracto de la solicitud a la oficina de comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo dispone el artículo 40 de la referida Decisión 486.

Cúmplase

Dado en Bogotá D.C., **16 DIC. 2005**


CLARA C. DE JAIMES
Jefe División de Nuevas Creaciones. (E)

202028

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES .

RADICACIÓN EXPEDIENTE No 04-129790

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

PCT FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No 562

DE FECHA 31 DE MARZO DEL 2006 EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR

LA LEY EXPIRA EL 05 DE JULIO DEL 2006

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI

NO **X**

Bogotá D.C, ENERO DE 2007