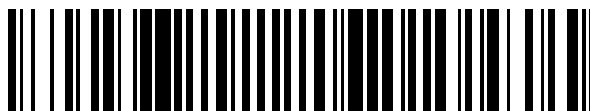


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 189**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

C08B 37/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2003 E 03740278 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1572749**

54 Título: **Procedimiento para la despolimerización física de glucosaminoglucanos y productos obtenidos a partir de los mismos**

30 Prioridad:

21.06.2002 IT MI20021372

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.04.2013

73 Titular/es:

**LABORATORI DERIVATI ORGANICI S.P.A.
(100.0%)
VIA M. BAROZZI, 4
20122 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**DE AMBROSI, LUIGI;
IANNACONE, NICOLA;
GONELLA, SERGIO;
VISMARA, ELENA;
NESTI, SOLITARIO y
TORRI, GIANGIACOMO**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 401 189 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la despolimerización física de glucosaminoglucanos y productos obtenidos a partir de los mismos

5

Estado de la técnica

[0001] Los glucosaminoglucanos son productos naturales de gran interés farmacéutico. Entre los más ampliamente usados se pueden mencionar heparina, dermatán, sulfato de heparán y condroitinas.

10

[0002] El peso molecular de los productos naturales varía considerablemente y normalmente varía entre 5 y 40 kDa. Sin embargo, se sabe que para ciertas aplicaciones unos pesos moleculares menores dan lugar a una mayor actividad farmacológica. El elevado peso molecular de estos compuestos a menudo hace imposible su administración oral. Adicionalmente se sabe que algunas actividades específicas de los glucosaminoglucanos están relacionadas con secuencias de sacáridos relativamente cortas. Por lo tanto, sería ventajoso despolimerizar los glucosaminoglucanos reduciendo el peso molecular sin perder los sitios de actividad presentes en la molécula. La despolimerización química de los glucosaminoglucanos es bien conocida en la técnica y da lugar a glucosaminoglucanos de menor PM pero también con un menor contenido en S.

15

[0003] El documento EP 394 971 describe un procedimiento de despolimerización enzimática o química. Los oligómeros de heparina obtenidos tienen un contenido en azufre menor del 9%.

20

[0004] El documento WO 90/04607 describe una despolimerización de heparina y sulfato de dermatán mediante el uso de H_2O_2 y Cu^{2+} . La relación SO_3^-/COO^- es ligeramente menor que en la heparina de partida. El documento US 4.987.222 describe un procedimiento para la despolimerización de la heparina mediante el uso de rayos gamma. Los ejemplos describen la preparación de heparina con un PM de aproximadamente 5.000 Da y un elevado contenido en S.

25

[0005] Los documentos KR 2000 012 173 A y KR 2000 036 332 A describen un procedimiento para disminuir el peso molecular de polisacáridos que comprende una etapa de exponer los polisacáridos (por ejemplo, heparina) en disolución a un haz de electrones u otros tipos de radiaciones.

30

Resumen de la invención

[0006] La presente invención se refiere a un procedimiento físico para la despolimerización de glucosaminoglucanos mediante el uso de una radiación de haz de electrones (EB). También se refiere a los glucosaminoglucanos obtenidos mediante este procedimiento.

35

Descripción detallada de la invención

40

[0007] La presente invención proporciona un procedimiento de despolimerización física que reduce el peso molecular de glucosaminoglucanos sin modificar sustancialmente la estructura química de los mismos.

[0008] El objetivo se consigue exponiendo una fina capa de una disolución acuosa de glucosaminoglucanos que fluye hacia una radiación de haz de electrones. Cuando se usa heparina como material de partida, este procedimiento da como resultado una heparina de peso molecular ultra bajo caracterizada por un elevado contenido en S.

45

[0009] Los materiales de partida que se van a usar en el procedimiento según la presente invención son glucosaminoglucanos naturales tales como heparina, sulfato de heparán, dermatano y condroitina. Otros materiales de partida adecuados son derivados de glucosaminoglucanos obtenidos mediante procedimientos conocidos. Por lo tanto, por ejemplo, los grupos N-acetilo o N-sulfato de los residuos de hexosamina pueden transformarse en grupos amino mediante reacciones de N-desulfatación o N-desacetilación, y los grupos sulfato de los ácidos urónicos pueden dar lugar a grupos epoxi a través de reacciones de desulfatación.

50

[0010] En otra forma de realización, es posible usar como material de partida para el procedimiento de la presente invención un glucosaminoglucano que ya ha experimentado un procedimiento de despolimerización química o enzimática. El uso de glucosaminoglucanos parcialmente despolimerizados es, por ejemplo, pertinente en el caso de la heparina que ha experimentado un tratamiento ácido que tiene como efecto secundario la despolimerización parcial, o cuando se están despolimerizando glucosaminoglucanos funcionalizados. Las condiciones usadas para la introducción de grupos funcionales también causan a menudo una reducción en el peso molecular del polisacárido.

60

[0011] Por lo tanto, no sólo es posible realizar ambas etapas mediante el uso de radiación de haz de electrones, sino que es posible realizar una primera etapa de despolimerización mediante el uso de una radiación de haz de

electrones seguido de una segunda etapa que usa una despolimerización química-enzimática, o para realizar una primera etapa de despolimerización química-enzimática seguida de una despolimerización con haz de electrones.

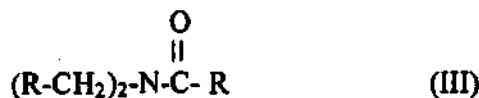
[0012] El procedimiento de la presente invención permite la reducción del peso molecular del glucosaminoglucano sin una modificación sensible de la estructura química del polisacárido.

[0013] La dosis de radiación usada en el procedimiento de despolimerización depende de varios factores, por ejemplo, del tipo de glucosaminoglucano, del PM final deseado, de la energía de la radiación. En general, la dosis de radiación variará en el intervalo de 400-8.000 kGy, preferiblemente de 800-6.000 kGy, más preferiblemente de 1.200-5.000 kGy.

[0014] Preferiblemente, la radiación de haz de electrones tiene una energía comprendida entre 100 y 1.000 keV, muy preferiblemente entre 100 y 500 keV.

[0015] El procedimiento de despolimerización puede realizarse en un amplio intervalo de temperatura, sin embargo se prefiere mantener la temperatura a entre 0 y 50°C, muy preferiblemente a entre 20 y 40°C.

[0016] El procedimiento de despolimerización según la invención se realiza en disolución acuosa, opcionalmente en presencia de un compuesto orgánico seleccionado del grupo que consiste en alcoholes, éteres, aldehídos, amidas y ácido fórmico. Preferiblemente, el compuesto orgánico se selecciona entre los compuestos de fórmula I, II y III.



en los que cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH, CHO, alquilo C₁-C₆ y acilo, opcionalmente sustituido con átomos de oxígeno; dos grupos R opcionalmente unidos entre sí para formar un anillo.

[0017] Algunos ejemplos preferidos de alcoholes son: metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, glicerol.

[0018] Algunos ejemplos preferidos de éteres son: tetrahydrofurano, dioxano, éter dietílico, tertbutilmetil éter, dioxolano.

[0019] Algunos ejemplos de aldehídos son formaldehído, glioxal, acetaldehído o formas estabilizadas de los mismos (trioxano, glioxal trimérico dihidratado).

[0020] Algunos ejemplos preferidos de amidas son: N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N,N-dietilformamida, N-metilpirrolidona.

[0021] La concentración de glucosaminoglucano en la disolución que se va a someter a radiación puede variar en un amplio intervalo. Preferiblemente está comprendida entre el 2 y el 25% p/v, más preferiblemente entre el 5 y el 15%.

[0022] Después de la radiación, las disoluciones se decoloran opcionalmente usando un tratamiento oxidante o haciéndolas pasar por las resinas apropiadas. Entonces generalmente la disolución se purifica mediante precipitación en un disolvente hidrófilo. La pasta obtenida puede redisolverse en agua y liofilizarse mediante destilación al vacío.

[0023] También es posible fraccionar el glucosaminoglucano intermedio despolimerizado mediante cromatografía de penetración en gel. Las fracciones que contienen los pesos moleculares deseados se recogen, se concentran mediante ultrafiltración y se liofilizan.

[0024] El procedimiento de la presente invención se realiza mediante el uso de un procedimiento de radiación dinámico.

[0025] Por el término "procedimiento de radiación dinámico" se entiende un procedimiento en el que la radiación se realiza sobre una fina capa de líquido que fluye frente a la ventana del haz de electrones. De esta forma se aumenta la eficacia del procedimiento de radiación.

[0026] El procedimiento puede realizarse por lotes o en modo continuo. El aparato está formado preferiblemente por un depósito desde el cual se mueve el líquido hacia el área de radiación. Seguidamente el líquido vuelve al depósito.

[0027] La exposición de la disolución a la corriente de electrones puede tener lugar de diferentes formas:

- frente a la ventana se coloca un plano inclinado sobre el que fluye una fina capa de disolución,
- frente a la ventana se coloca un sistema de tubos finos que permite la exposición de la disolución a los electrones,
- la disolución puede fluir directamente sobre la ventana.

[0028] Las condiciones óptimas de radiación se determinan mediante una dosimetría preliminar. La dosimetría se ha realizado considerando las condiciones típicas de radiación de la disolución en términos de:

a) propiedades relativas al haz de electrones, es decir

- energía del haz (medida en keV)
- corriente del haz (medida en mA);

b) propiedades relativas a la geometría de la radiación, es decir

- distancia entre la fuente del haz y la disolución que se va a procesar,
- presencia de posibles apantallamientos o de otro material cercano que pueda ser una fuente de radiación secundaria.

[0029] La dosimetría se realiza en cualquier caso durante un periodo limitado de tiempo, dado que la dosis administrada al material es directamente proporcional al tiempo de exposición, y se determina en condiciones estáticas, mientras que en realidad el procedimiento es dinámico.

[0030] En una posible forma de realización, la disolución es bombeada por una bomba desde un tanque externo hacia una zona (I). Durante esta transferencia, el líquido se enfría con un intercambiador de calor. Desde (I) la disolución cae por gravedad siguiendo una superficie (II), que es preferiblemente porosa, de forma que se garantice la formación de una película uniforme sobre su superficie. Un tubo conecta el área posterior de la película (II) con el tanque. La radiación tiene lugar sobre la película. El caudal de la bomba determina las características de la película (espesor, tiempo de residencia frente a la ventana de radiación).

Sección experimental

45 Caracterización de los productos

[0031] El peso molecular (PM) se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaños (Farmacopea Europea 4ª ed.: 2.2.30 y 2.2.46 para técnicas cromatográficas, y 01/2002: 0828 pág. 1297 para el procedimiento).

50 Radiación con rayos β

[0032] El procedimiento de radiación de la disolución tiene lugar dentro de un aparato de haz de electrones.

[0033] El haz es generado por un cátodo caliente, constituido por un filamento de tungsteno al que se le aplica un elevado voltaje.

[0034] El área de generación del haz se pone a vacío. Dicho vacío se obtiene combinando la acción de dos bombas, una mecánica y una turbomolecular.

[0035] La aspiración generada por estas dos bombas permite conseguir las condiciones ideales para la circulación libre de electrones que, de otro modo, estaría ralentizada por el aire presente alrededor del cátodo.

[0036] El haz alcanza la región exterior de la cámara donde se genera pasando a través de una película de titanio muy fina (espesor de 10 μm). Con su paso también se generan rayos X.

[0037] La disolución que se va a irradiar se coloca inmediatamente fuera de esta película de titanio, a una distancia convenientemente lo menor posible, de forma que el haz que sale de la película no esté significativamente atenuado, y por lo tanto el uso esté optimizado sin desperdicios inútiles.

5 **[0038]** La disolución que se va a irradiar se hace circular en las cercanías de la ventana por la que sale el haz y es directamente expuesta al mismo. El circuito de circulación está provisto con un sistema de bombeo externo. La disolución circula de forma continua por dentro y por fuera del área apantallada, y por lo tanto pueden tomarse muestras regularmente y puede añadirse disolución nueva para el procesado.

10 **Ejemplo 1**

[0039] Se preparó 1 l de solución de heparina sódica al 10%, exenta de metales pesados. La solución se transfiere al aparato y se inicia la circulación en fase móvil descendiente, sobre tejido de lana de vidrio poroso con un espesor de 1 mm, con un caudal de 10 l/h mediante el uso de una bomba peristáltica.

15

[0040] Cuando se inicia la radiación con el EB a 5 mA y 300 keV, se activa el sistema de refrigeración con objeto de mantener la temperatura entre 25 y 35°C. La despolimerización se controla recogiendo muestras a intervalos fijos en las que se determina el peso molecular de la composición. La variación con el tiempo se muestra en la Tabla 1.

20 **[0041]** El haz de electrones se detiene, la disolución recogida experimenta un secado por pulverización para obtener el producto intermedio, que se fracciona mediante penetración en gel.

Tabla 1

Minutos	> 10,000 Da	kGy	PM
0	30%	-	8,364
5	17%	134	5,941
10	12%	268	5,050
15	9%	402	4,523
30	4%	804	3,682
45	2%	1,206	3,240
60	1%	1,608	3,014

25 **Ejemplo 2**

[0042] El ejemplo se realizó en condiciones idénticas a las del ejemplo 1, pero con una intensidad de corriente de 10 mA.

30 **[0043]** Al final se detiene el haz de electrones y la disolución recogida experimenta un secado por pulverización para obtener el producto intermedio, que es fraccionado mediante penetración en gel.

Tabla 2

Minutos	> 10,000	kGy	PM
0	30%	-	8,364
5	12%	268	4,888
10	7%	536	4,053
15	4%	804	3,526
30	2%	1,608	3,040
45	1%	2,412	2,852
60	-	3,216	2,716

35 **Ejemplo 3**

[0044] El ejemplo se realizó en condiciones idénticas a las del ejemplo 1, pero con una energía del haz de 150 keV y una corriente de 5 mA. Los resultados se indican en la Tabla 3.

40

Tabla 3

Minutos	> 10,000	kGy	PM
0	30%	-	8,364
5	24%	161	7163
10	21%	322	6542
15	20%	483	6337
30	17%	966	5968
45	16%	1449	6333

ES 2 401 189 T3

60	13%	1932	5681
75	10%	2415	5235
90	8%	2898	4806

Ejemplo 4

[0045] El ejemplo se realizó en condiciones idénticas a las del ejemplo 1, pero con la adición de un 0,4% v/v de 5 isopropanol. La Tabla 4 indica los resultados obtenidos.

Tabla 4

Minutos	> 10,000 Da	kGy	PM
0	30%	-	8,364
5	20%	134	6265
10	16%	268	5653
15	12%	402	4851
30	5%	804	3760
45	3%	1,206	3298
60	1%	1,608	3018
75	1%	2010	2855
80	-	2144	2780

Ejemplo 5

10

[0046] El ejemplo se realizó en condiciones idénticas a las del ejemplo 2, pero con la adición de un 0,4% v/v de isopropanol. La Tabla 5 indica los resultados obtenidos.

Tabla 5

15

Minutos	> 10,000 Da	kGy	PM
0	30%	-	8,364
5	16%	268	5625
10	10%	536	4626
15	7%	804	4043
20	4%	1072	3559
25	3%	1,340	3289
30	3%	1,608	3261
45	1%	2412	2913
55	1%	2948	2921

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la despolimerización de una solución acuosa de glucosaminoglucanos **caracterizado por** exponer una fina capa de la solución que fluye a una radiación de haz de electrones.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1-2 en el que el glucosaminoglucano es heparina.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1-2 en el que la radiación de haz de electrones tiene una energía comprendida entre 100 y 1.000 keV.
- 10 4. Procedimiento para la despolimerización de glucosaminoglucanos según la reivindicación 1 en presencia de un compuesto orgánico representado por las fórmulas I, II y III:



- 15 en las que cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH, CHO, alquilo C₁-C₆ y acilo, opcionalmente sustituido con átomos de oxígeno; dos grupos R opcionalmente unidos entre sí para formar un anillo.
5. Procedimiento según la reivindicación 4 en el que el compuesto orgánico se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, glicerol, tetrahidrofurano, dioxano, éter dietílico,
- 20 tertbutilmetil éter, dioxolano, formaldehído, glioxal, acetaldehído, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N,N-dietilformamida, N-metilpirrolidona.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 4-5 en el que la cantidad de compuesto orgánico varía entre el 0,1 y el 5%.
- 25 7. Procedimiento según las reivindicaciones 1-5 en el que la cantidad de radiación usada está comprendida entre 400 y 8.000 kGy.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 394971 A [0003]
- WO 9004607 A [0004]
- US 4987222 A [0004]
- KR 2000012173 A [0005]
- KR 2000036332 A [0005]

10