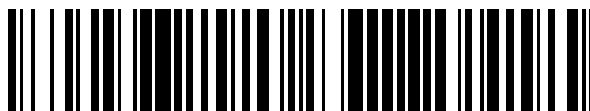


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 697**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)
A61K 35/56 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A23L 1/307 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2003 E 03782560 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1613662**

54 Título: **Procedimiento de obtención de ácido condroitinsulfúrico y sus usos**

30 Prioridad:

15.11.2002 FR 0214348

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

23.04.2014

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ LA BIOCHIMIE APPLIQUÉE SA
(SOLABIA) (100.0%)
29 RUE DELIZY
93500 PANTIN, FR**

72 Inventor/es:

JOSSET, GÉRARD

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 456 697 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 de obtención de ácido condroitinsulfúrico y sus usos

La presente invención hace referencia al campo de la química y más particularmente al de la química terapéutica.

5 Se refiere más precisamente a un procedimiento de producción y purificación de derivados poliglucurónicos que permite llegar en condiciones ventajosas a productos biológicos de alto grado de pureza.

Hace referencia igualmente a los subproductos formados en el transcurso de este procedimiento que encuentran uso en la preparación de medios de cultivo bacteriológicos. Estos subproductos permiten igualmente obtener aminoácidos que encuentran un amplio uso en alimentación, dietética y para reactivos de laboratorio.

10 La invención tiene específicamente como objeto un procedimiento de producción y purificación de ácido condroitinsulfúrico a partir de tejidos de origen animal, y principalmente de origen porcino o bovino, que consiste en someter a tejidos cartilaginosos, y especialmente las tráqueas de estos animales congeladas, a una trituración y después una hidrólisis enzimática por una hidrolasa específica y después una filtración y a continuación a varias diálisis frente a agua, a separación de aminoácidos y de péptidos pequeños y por último precipitación por un alcohol para obtener el ácido condroitinsulfúrico en forma de sal de sodio.

15 Las fases más importantes del procedimiento según la invención consisten por ello por un lado en la hidrólisis enzimática y por otro lado en la sucesión de operaciones de diálisis. La hidrólisis enzimática se efectúa con la ayuda de una proteasa alcalina de tipo serina obtenida a partir de cultivos de *Bacillus licheniformis*, y más particularmente a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis* comercializada con la denominación PROLYVE 1000 por la compañía LYVEN.

20 La proteasa producida a partir de esta cepa es activa y estable en solución en una amplia zona de pH que se extiende de 8,0 a 11,0. Sin embargo, su actividad óptima se sitúa entre 9,0 y 10,5. Su temperatura óptima de actividad se sitúa entre 55 y 60 °C según la duración de la hidrólisis. La enzima es totalmente inactiva después de 10 a 15 minutos de calentamiento a 90 °C.

25 Aparte de su actividad endopeptidasa, esta enzima de *Bacillus licheniformis* presenta una acción esterasa pronunciada que permite la hidrólisis de sustratos sintéticos.

Los agentes quelantes no tienen efecto sobre la enzima de *Bacillus licheniformis* que, por otro lado, se inhibe por agentes de acilación como el fluoruro de fenilmetano sulfonilado y el fosfofluoruro de diisopropilo.

La enzima de *Bacillus licheniformis* no se inhibe por el inhibidor de tripsina de soja, pero es sensible al inhibidor de patata y al inhibidor de ciertos cereales.

30 La enzima de *Bacillus licheniformis* manifiesta una alta actividad endopeptidasa. Tiene ya amplias aplicaciones en el campo de la hidrólisis de las proteínas animales o vegetales. Su actividad conduce sobre todo a la formación de péptidos pequeños hidrosolubles. Por el contrario, solo produce bajas concentraciones de aminoácidos libres.

35 La acción óptima se sitúa hacia 10, como se ha indicado, según el tipo de proteína para hidrolizar. Ha sido necesario, no obstante, en el caso preciso que se considera, ajustar el pH para encontrar la acción óptima para el sustrato considerado. En el caso de cartílagos de tráquea según la invención, este pH óptimo se sitúa entre 8 y 9 y preferiblemente a 8,5. La temperatura de hidrólisis enzimática se sitúa hacia 60 °C para perfeccionar la hidrólisis de proteínas evitando que se ataque el ácido condroitinsulfúrico.

40 Después de la hidrólisis enzimática, se procede a una termólisis de la enzima a pH 6,0 y a 97 °C durante 20 a 60 minutos, preferiblemente durante 30 minutos. Debido a las condiciones físicas moderadas, el ácido condroitinsulfúrico no experimenta degradación.

La diálisis o ultrafiltración está precedida por una etapa de filtración. Conduce a la eliminación de aminoácidos y oligopéptidos formados en la hidrólisis de proteínas que pasan al ultrafiltrado.

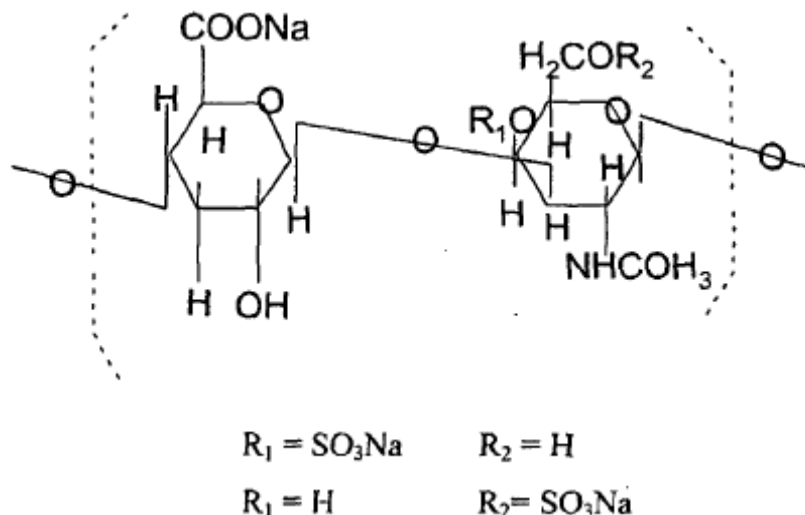
El ácido condroitinsulfúrico así obtenido se aísla por precipitación en medio ácido (pH 3,0) y etanólico con la ayuda de etanol de pureza etanólica del orden de 96 % (p/v).

45 Finalmente, se seca el producto en un aparato de secado industrial. El procedimiento es perfectamente reproducible cualesquiera que sean las variaciones en la calidad de los materiales de partida. El procedimiento se ha ensayado con 17 lotes, 14 lotes de origen bovino y 3 lotes de origen porcino, y ha conducido a lotes de ácido condroitinsulfúrico de muy alta pureza que se sitúan por norma general por encima de 97 % de ácido condroitinsulfúrico en seco por 100 gramos.

50 La sal de sodio del ácido condroitinsulfúrico (ACSNa) es un polímero cuyos monómeros, en proporciones no definidas, son las sales disódicas de los isómeros 4 o 6 del ácido condroitinsulfúrico, disacárido constituido por ácido

β -glucurónico y *N*-acetilgalactosamina (enlace $\beta 1 \rightarrow 3$). El ACSNa está constituido por ello por ésteres sulfúricos en 4 o 6 de *N*-acetilgalactosamina del monómero, está dihidratado y responde a la fórmula $C_{14}H_{19}O_{14}NNa_2S \cdot 2H_2O$.

La estructura del monómero se define como sigue:



5 El producto es una mezcla de dos polisacáridos cuyos monómeros son: ácido β -D-glucurónico y 4-sulfato de *N*-acetilgalactosamina ligados en $\beta(1 \rightarrow 3)$

En los tejidos, los polímeros de ácido condroitinsulfúrico están ligados de manera covalente con cadenas proteicas para formar proteoglicanos. La bibliografía enseña ya que el ácido condroitinsulfúrico puede obtenerse a partir de materias primas de orígenes variados como cartilagos de animales tales como bovinos, ovinos, porcinos, equinos, tiburones, peces e incluso ballenas o escamas de peces.

Una de las fuentes principales de ácido condroitínico es la extracción de órganos cartilaginosos de origen bovino o porcino y especialmente de tráqueas de origen bovino o porcino.

Sin embargo, los desarrollos recientes, relativos en particular a contaminaciones por virus o priones, han planteado problemas de inocuidad y han conducido a considerar otras fuentes de materias primas de origen aviar, es decir, exentas de cualquier enfermedad propia de los bovinos.

Esta consideración ampliamente descrita en la patente francesa 2.756.828 se ha atenuado notablemente y ya no presenta el mismo problema de urgencia.

El procedimiento según la invención pretende una hidrólisis enzimática específica para desembarazar al ácido condroitinsulfúrico de las glucoproteínas a las que está asociado en el estado natural. La enzima responsable de esta hidrólisis debe presentar una actividad específica que impida el ataque a la molécula de ácido condroitinsulfúrico o sus polímeros, de manera que se evite el fraccionamiento irreversible de la molécula.

La bibliografía proporciona ya un cierto número de referencias relativas a la producción de ácido condroitinsulfúrico a partir de diferentes materias primas animales. Es así que un cierto número de patentes describen un procedimiento de hidrólisis enzimática que utiliza proteasas (patente francesa CTPP 2.804.022, Hokkaido IP 2000/273102, Pierre Fabre BF2.756.828, Biomed Research USP 4.302.577, Agency of Ind-Sci and Technology USP 6.342.367).

La bibliografía describe igualmente procedimientos de ultrafiltración que utilizan membranas variadas (Hokkaido JP2000/2731 02, Pierre Fabre 2.736.828) o diálisis (CTPP BF2.804.022, Sanrit Sutsu KK JP73/27632).

Esta multiplicación de técnicas de producción, y sobre todo la descripción de la patente francesa 2.756.828, indica claramente que ninguno de los procedimientos actualmente descritos es plenamente satisfactorio ni conduce a compuestos de calidad regular o satisfactoria. Según la última patente 2.756.828, el ácido condroitinsulfúrico obtenido se define por un peso molecular comprendido entre 20 y 21.000 Da. Los datos de la bibliografía reseñan habitualmente un valor de 8.000 a 50.000.

Los ensayos han mostrado que era difícil obtener un ácido condroitinsulfúrico de buena calidad. El procedimiento según la invención permite precisamente resolver este problema.

35 El producto obtenido según el procedimiento de la presente invención se caracteriza por un peso molecular medio que se gradúa de 5.000 a 30.000 Da.

Los procedimientos de valoración efectuados rutinariamente permiten definir los criterios de pureza:

- descripción del aspecto del producto, su hidrosolubilidad y el tamaño máximo de las partículas (97 % < 500 µm),
- 5 – identificación por caracterización del anión del ácido condroitinsulfúrico (espectro IR y reacción con cloruro de cetilpiridinio) y del catión sodio (reacción b de la Farmacopea europea 2.3.1.),
- verificación de una salificación suficiente para la medida del pH (en solución acuosa al 1 %),
- 10 – determinación de la pérdida por desecación que cubre las dos moléculas de agua del monómero e higroscopicidad del polímero, característica que explica la amplitud de las especificaciones, 10 a 13 %, mientras que el agua de hidratación solo representa aproximadamente 6,3 %. La determinación de esta pérdida por desecación es indispensable para que los resultados de las determinaciones cuantitativas se refieran al producto desecado para volverlos significativos,
- contenidos límites de impurezas: metales pesados, sulfatos libres, cloruros,
- valoraciones ligadas a la fórmula molecular (resultados referidos al producto desecado),
- 15 – valoración del azufre total que cubre esencialmente el átomo de azufre del ACSNa, pero también el de los sulfatos libres,
- valoración del nitrógeno total, que cubre esencialmente el átomo de nitrógeno del ACSNa, pero también el de las impurezas proteicas,
- determinación de las cenizas sulfúricas que representan esencialmente los dos átomos de sodio del ACSNa, pero también de impurezas metálicas,
- 20 – determinación del contenido de ACSNa anhidro, referido al producto desecado.

Otro objeto de la invención se basa en la obtención de peptonas en el transcurso de la hidrólisis enzimática. El interés presentado por la hidrólisis enzimática se basa en el hecho de que diversas proteínas, y en particular glucoproteínas, se degradan a moléculas pequeñas tales como peptonas e incluso aminoácidos.

25 Las peptonas son productos sólidos o granulados, de color blanco amarillento y de sabor ligeramente amargo. Son hidrosolubles e insolubles en alcohol concentrado. Las peptonas están constituidas por polipéptidos de bajo peso molecular y por aminoácidos.

Puede ser importante separar los aminoácidos, especialmente por pasada por una resina intercambiadora de iones y elución por una solución amoniaca.

30 Las peptonas encuentran empleo como fuente de nitrógeno y elemento nutritivo para caldos de cultivo, especialmente peptona gelosada.

Los aminoácidos que se pueden separar consisten esencialmente en arginina, lisina y tirosina. Después de la purificación, constituyen materias primas valiosas en dietética, farmacia o cosmética.

El ácido condroitinsulfúrico encuentra un uso importante en terapia en el tratamiento de artrosis y en el tratamiento de afecciones oculares.

35 El procedimiento según la invención se define como sigue a la vista de los ejemplos.

Etapa 1

Trituración de las tráqueas congeladas

Se recogen las tráqueas usadas de mataderos admitidos. Se procede a una verificación visual de las tráqueas congeladas y después se procede a una trituración en una picadora de cuchillas. Se usan 3.000 kg por lote.

Etapa 2

Hidrólisis enzimática

40 Se trabaja en tanque termostatzado a 60 °C introduciendo los 3.000 kg de triturado de tráqueas y agua (4.500 l) y después una solución de proteasa alcalina (Prolyve 1000) de título mayor de 3.000 U/mg. Se ajusta el pH a 8,5 mediante la adición de una solución de hidróxido de sodio 10 M. Se deja efectuar la hidrólisis durante 5 horas a esa temperatura.

Etapa 3

Termólisis de la enzima

Se lleva a 12 el pH del caldo de hidrólisis mantenido a 60 °C añadiendo ácido clorhídrico, y después se calienta durante 30 minutos a 97 °C. El calentamiento produce al mismo tiempo que la hidrólisis una descontaminación del medio.

5 **Etapa 4**

Filtración y ultrafiltración

Se dejan enfriar los caldos de hidrólisis termolisados, se procede a una decantación y después a una filtración por filtro prensa.

10 Se procede a una ultrafiltración de los caldos filtrados por membrana PW120 PO, que tiene un umbral de corte de aproximadamente 20.0000 Da. Esta operación permite concentrar la solución eliminando los aminoácidos y péptidos pequeños. Se puede efectuar en este caso previamente un tratamiento alcalino para las tráqueas de origen bovino. Se mantiene 1 hora a entre 20 y 25 °C.

15 Se envía el producto mediante una canalización dedicada hasta el tanque de lanzamiento. El caldo de hidrólisis tiene un título de aproximadamente 12 % del extracto seco. La temperatura es de 60 °C y el pH de 9. Se usa un volumen (V1) de 5.000 l

Concentración

Esta etapa permite concentrar el producto eliminando los elementos no deseados tales como proteínas, sales minerales...

Caudal de ultrafiltración de aproximadamente 1.000-1.500 l/h

20 El pH se mantiene a 9 y la temperatura a 60 °C

El volumen final de elución (V1) es de 3.000 l.

Primera diálisis

(Diálisis automática- diálisis bruta)

25 Se envía agua purificada a 60 °C continuamente, procediendo a una ultrafiltración. El volumen del tanque de lanzamiento permanece constante.

Volumen total de agua añadida: 3.600 l.

Caudal de ultrafiltración: aproximadamente 1.500 l/h.

pH 9

volumen final (V1): 2.200 l.

30 **Segunda diálisis**

Se efectúa la diálisis con la totalidad de las soluciones acuosas. Se trata por ello de una diálisis fina.

Se envía agua purificada a 60 °C de una sola vez para favorecer una dilución alta, de forma que se consiga una viscosidad menor y una mejor dilución de los electrolitos. Esta etapa permite eliminar más fácilmente las proteínas.

Volumen total de agua añadida: 3.600 l.

35 La temperatura del medio es de 50 °C.

El caudal de ultrafiltración es de 1.500 a 2.000 l/h.

El valor de pH es del orden de 9.

El volumen final es de 2.200 l.

Tercera diálisis

40 Se efectúa la diálisis con la totalidad del eluido. Se procede como para la segunda diálisis.

Volumen total de agua añadida: 2.000 l.

ES 2 456 697 T3

La temperatura es de 50 °C.

El caudal de ultrafiltración es de 1.500 a 2.000 l/h. El valor de pH es de 9.

El volumen final es de 2.000 l.

El caudal del producto de ultrafiltración es de 1.500 a 2.000 l/h. El pH del medio es de 9.

5 El volumen final es de 2.200 l.

Se procede a continuación a una precipitación con etanol. Se añade ácido clorhídrico 12 M hasta pH 3,0 y después cloruro de sodio hasta una concentración final de 80 g/l. Después de la filtración, se recoge una solución transparente en el tanque de precipitación y se añade etanol a razón de 1,3 veces el volumen de filtrado. Se trasiega el sobrenadante hidroalcohólico y se transfiere el precipitado de ácido condroitinsulfúrico a otro tanque.

10 Se decanta y elimina el sobrenadante y después se recoge el precipitado, que se purifica por 3 lavados sucesivos con la ayuda de etanol diluido de concentraciones crecientemente progresivas (70°, 75° y 80°).

Se escurre a continuación el producto y se aclara 2 veces con etanol.

Se seca a continuación el producto en un desecador equipado con una bomba a vacío y una regulación térmica hasta la obtención de una pérdida por secado comprendida entre 10 y 13 %.

15 Se efectúa el secado a 60 °C a vacío.

El ácido condroitinsulfúrico obtenido en estas condiciones se presenta en forma de un polvo blanco a blanco roto hidrosoluble.

El tamaño de las partículas obtenidas por tamizado muestra que hay un 97 % de partículas <500 µm.

20 El pH en solución acuosa al 1 % es de 5,5 a 7,5. Los datos espectrales están ajustados a los de un patrón (espectro IR en pastillas de BrK comparable al de un patrón, bandas características a 930-920 cm⁻¹, 860-850 cm⁻¹ y 730-710 cm⁻¹ para ácido condroitinsulfúrico y a 1.660-1.600 cm⁻¹ y 1.250-1270 cm⁻¹ para ácido condroitino-6-sulfúrico).

El contenido de azufre varía de 5,0 a 7,0 % referido al producto desecado.

El nitrógeno total varía de 2,5 a 4,5 % referido al producto desecado.

El índice de proteínas es inferior al 2 % determinado por el procedimiento de Lowry.

25 Las cenizas sulfúricas varían de 20 a 30 %.

La valoración titulométrica del ácido condroitinsulfúrico indica un contenido de 95 a 102 % referido al producto desecado.

La determinación de la contaminación bacteriana indica un número de gérmenes aeróbicos viables totales inferior a 1.000 UFC por gramo.

30 La tabla I siguiente resume las normas obtenidas para los 17 lotes diferentes, mostrando la perfecta reproducibilidad de los ensayos

TABLA

Nº de lote	Fecha de producto	Tamaño del lote en kg	Origen de las tráqueas	Porcentaje de pérdida de secado	pH en sol. al 1 %	ABC identific.	Porcentaje de azufre/seco 5,0 a 7,0	Porcentaje de nitrógeno total/seco 2,5 a 4,5	Porcentaje de proteínas $\leq 2,0$	Porcentaje de cenizas sulf. /seco (20-30)	Porcentaje de cloruros $\leq 1,0$	Porcentaje de valor ACS/seco 95 a 102
8A746	01/98	534,8	Bovino	11	5,5	+++	5,4	2,9	0,9	26	0,5	97
8B916	02/98	1000,0	Bovino	10	6,0	+++	5,1	2,9	0,8	27	0,5	96
8B999	02/98	1010,6	Bovino	10	5,2	+++	5,7	2,7	0,8	26	0,6	97
8C201	03/98	1007,0	Bovino	11	6,1	+++	5,6	3,3	1,1	27	0,5	98
8C359	03/98	1010,5	Bovino	12	6,5	+++	5,2	2,8	1,4	27	0,3	96
8D569	04/98	1018,9	Bovino	12	7,3	+++	5,2	3,1	1,3	28	0,4	97
8E760	05/98	1033,5	Bovino	10	7,1	+++	5,2	3,0	1,3	28	0,5	99
SE833	06/98	400,0	Porcino	10	7,0	+++	5,0	3,1	1,7	26	0,7	98
8F926	06/98	1011,3	Bovino	11	6,1	+++	5,1	3,1	0,9	27	0,5	98
8G066	07/98	1005,7	Bovino	12	6,0	+++	5,0	3,0	1,9	27	0,5	98
8G098	07/98	1013,5	Porcino	11	5,2	+++	5,0	3,2	1,4	26	0,6	98
8G166	07/98	1029,5	Bovino	10	5,6	+++	5,5	3,2	2,3	25	0,4	97
8H300	08/98	1021,1	Bovino	11	6,1	+++	5,1	3,2	1,4	26	0,2	100
8J425	09/98	1001,1	Porcino	11	7,0	+++	5,1	3,3	1,6	24	0,3	99
8J454	09/98	1018,2	Bovino	11	6,0	+++	5,4	3,2	1,7	25	0,2	98
8J578	10/98	1014,1	Bovino	10	6,7	+++	5,0	3,2	1,4	26	0,3	98
8K650	10/98	1012,6	Bovino	10	6,2	+++	5,1	3,2	1,4	26	0,3	99

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción y purificación de ácido condroitinsulfúrico en el que se someten tejidos cartilagosos de origen animal a una hidrólisis enzimática y, después de neutralización, a una ultrafiltración y una diálisis, en el que se precipita el ácido condroitinsulfúrico por adición de un alcohol hidrosoluble, caracterizado porque se efectúa la hidrólisis enzimática de tejidos cartilagosos de origen bovino o porcino mediante una proteasa alcalina extraída de *Bacillus licheniformis* y después la termólisis de la enzima en caliente en medio ácido, la concentración del ácido condroitinsulfúrico por ultrafiltración y diálisis repetidas y la precipitación del ácido condroitinsulfúrico por adición de un volumen determinado de etanol, y porque el ácido condroitinsulfúrico obtenido presenta un peso molecular medio que se gradúa de 15.000 a 30.000 Da.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteasa extraída de *Bacillus licheniformis* es el producto comercializado por la compañía Lyven.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado porque, para el sustrato considerado, la acción enzimática óptima se sitúa a un pH comprendido entre 8 y 9.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la acción óptima se sitúa a un pH de 8,5.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la hidrólisis enzimática se efectúa a una temperatura cercana a 60 °C.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes en el que se efectúa una termólisis de la enzima a pH 6,0 y a 97 °C.
7. Procedimiento según la reivindicación 6 en el que la termólisis se efectúa durante 20 a 60 minutos.
8. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que se procede a tres diálisis sucesivas para concentrar el medio en ácido condroitinsulfúrico y obtener un producto que presenta una pureza superior al 95 %.
9. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que se precipita ácido condroitinsulfúrico por adición de un volumen de etanol en cantidad igual a 1,3 veces el volumen de solución filtrada.
10. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que, después de purificación y secado se obtiene un ácido condroitinsulfúrico de calidad farmacéutica.
11. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que se separa la fracción que contiene los péptidos pequeños constituidos por peptonas y aminoácidos después de la diálisis.