

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 393**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2011 E 11790737 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2638074**

54 Título: **Procedimiento de obtención de condroitina sulfatada en las posiciones 4 o 6 de restos de N-acetil galactosamina**

30 Prioridad:

11.11.2010 IT MI20102092

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

22.04.2015

73 Titular/es:

**ALTERGON S.A. (100.0%)
Via Dogana Vecchia 2
6900 Lugano, CH**

72 Inventor/es:

**BEDINI, EMILIANO;
DE ROSA, MARIO;
DE CASTRO, CRISTINA;
DI NOLA, ANNALIDA;
PARRILLI, MICHELANGELO;
RESTAINO, ODILE FRANCESCA y
SCHIRALDI, CHIARA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 534 393 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 condroitina sulfatada en las posiciones 4 o 6 de restos de N-acetil galactosamina

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los procedimientos para la modificación estructural de polisacáridos.

5 Estado de la técnica

El sulfato de condroitina pertenece a la familia más amplia de glicosaminoglicanos denominada GAG. Estos polisacáridos, unidos covalentemente a proteínas, tales como proteoglicanos, son constituyentes ubicuos de la matriz extracelular de todos los tejidos conectivos, en la que llevan a cabo numerosas funciones.

10 El sulfato de condroitina es un polisacárido lineal natural formando por restos alternantes de N-acetil-D-galactosamina β 1 \rightarrow 4 y D-glucuronato β 1 \rightarrow 3. En los vertebrados, la condroitina está presente en formas sulfatadas de diversa manera; los restos implicados en la sulfatación son los grupos hidroxilo 4 y 6 de la N-acetil-D-galactosamina, y en algunos casos también los grupos hidroxilo 2 y 3 del ácido glucurónico.

El peso molecular de la condroitina, y la cantidad y sitios de sulfatación, dependen de la especie, la edad y el tipo de tejido.

15 El sulfato de condroitina se utiliza como medicamento condrioprotector y antirreumático, con aplicaciones en el tratamiento de la osteoartritis tibiofibular de la rodilla y osteoartritis del cartílago de la articulación.

20 Actualmente, el sulfato de condroitina se obtiene mediante técnicas de extracción a partir de diversas fuentes animales, tales como cartílago de cerdo, cartílago de aleta de tiburón y de teleósteos. La escasez de la materia prima y la complejidad del procedimiento de purificación posterior restringe la disponibilidad de este principio activo a nivel mundial; su mercado está controlado por tanto por la imposibilidad de satisfacer la actual demanda de crecimiento. Además, las regulaciones cada vez más severas que controlan la seguridad de los medicamentos de origen animal que se aprueban frecuentemente pueden excluir del mercado farmacéutico en el futuro el sulfato de condroitina extraído.

25 En consecuencia existe un creciente interés en el desarrollo de estrategias de fabricación alternativas basadas en la biotecnología y en la síntesis química para obtener este tipo de polisacáridos o sus precursores.

30 La literatura científica (Rodríguez ML y col., Eur. J. Biochem., 1988, 177, 117-24; Manzoni M y col., Biotechnology Letters, 1996, 18, 383-6) y la literatura de patentes (documento WO 01/02597 A1) informan de la posibilidad de producir mediante fermentación, utilizando cepas de *E. coli* K4 naturales o recombinantes que producen un derivado de condroitina, el polisacárido K4, cuya estructura básica de carbono es idéntica a la de la condroitina, excepto por el injerto de ácido glucurónico procedente de restos de α -fructofuranosa en C3. La condroitina se puede obtener a partir del polisacárido K4 mediante hidrólisis ácida controlada de los restos de fructosa.

Los elevados rendimientos de fabricación, la simplicidad del procedimiento de purificación posterior desarrollado, los bajos costes globales del procedimiento y su bajo impacto ambiental hacen a dicha síntesis superior a las estrategias de biotecnología anteriormente descritas.

35 Dicho procedimiento de fermentación, si se suplementa adecuadamente por una estrategia de sulfatación química regioselectiva de la condroitina, puede por tanto hacer que el método biotecnológico sea competitivo en comparación con procedimientos convencionales para extraer sulfato de condroitina de materias primas de origen animal, que pueden quedar eliminadas del mercado farmacéutico por recientes desarrollos de la normativa relativa a la seguridad del producto.

40 La sulfatación de polisacáridos estructuralmente relacionados con la condroitina, tales como los polisacáridos K4 y K5, que están formados, como se ha indicado, por secuencias repetitivas de ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina en el caso de K5, y ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina en el caso de K4, en las que se han injertado restos de fructosa, en este caso, en la posición 2 del ácido glucurónico, se describe en una serie de artículos y patentes, pero ninguno de esos documentos implica procedimientos de sulfatación regioselectiva que produzcan un sulfato de condroitina con las mismas características estructurales que la variedad humana.

45 Un esquema de síntesis para la sulfatación regioselectiva de la condroitina que conduce a un modelo de sulfatación similar al característico de la condroitina humana, y de la condroitina de origen extractivo usada actualmente de forma amplia como un medicamento condrioprotector y antirreumático en el tratamiento de enfermedades de las articulaciones sigue siendo por tanto tópico, pero no resuelto.

50

Sumario

5 Se divulga un procedimiento que, por medio de la síntesis química, a partir de la condroitina obtenida mediante un procedimiento biotecnológico, produce un modelo de sulfatación similar al del que caracteriza a la condroitina humana y a la condroitina de origen extractivo, utilizando soluciones de síntesis compatibles con un escalado industrial.

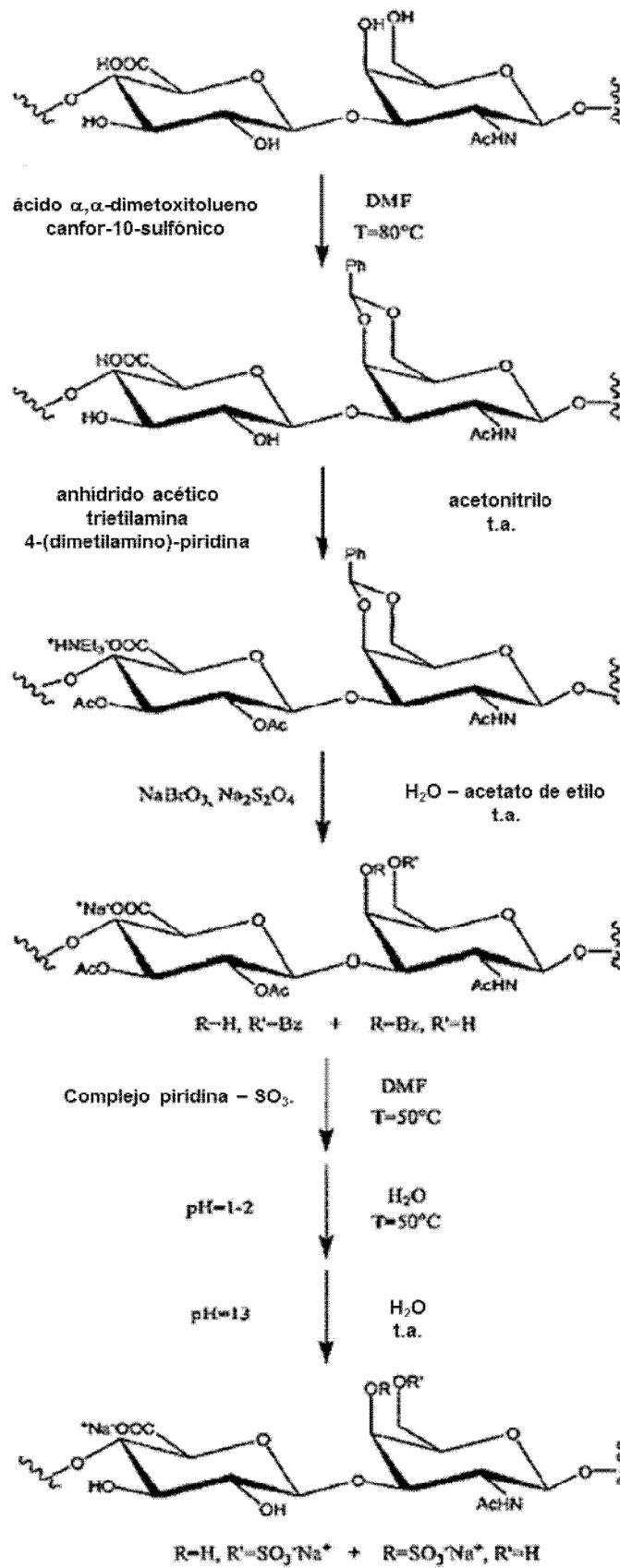
Descripción detallada de la invención

10 La presente invención, al eliminar los problemas presentes en los procedimientos conocidos de acuerdo con la técnica anterior, produce, mediante síntesis química, condroitina sulfatada en la que los restos de *N*-acetil-galactosamina están sulfatados en las posiciones 4 o 6 en la propia cadena de polisacárido, como se ha observado en el sulfato de condroitina humano y en el sulfato de condroitina obtenido actualmente mediante extracción a partir de fuentes naturales.

15 La presente invención se refiere en consecuencia a un procedimiento para la producción de sulfato de condroitina en el que están presentes restos de galactosamina sulfatados en las posiciones 4 o 6 en la propia cadena de polisacárido, caracterizado por las siguientes etapas: a) formación del correspondiente derivado de 4,6-bencilideno en los restos de la *N*-acetil-galactosamina de la condroitina en forma ácida; b) acilación de los grupos hidroxilo 2 y 3 de los restos de ácido glucurónico; d) apertura oxidativa del ciclo del bencilideno; d) sulfatación de los grupos hidroxilo 4 o 6 de los restos galactosamina; e) eliminación del grupo protector de benzoilo de las posiciones 4 o 6 de los restos de *N*-acetil-galactosamina y de los grupos protectores de acetilo en los hidroxilos 2 y 3 de los restos de ácido glucurónico; f) purificación de condroitina 4 o 6 sulfatada.

20 El procedimiento de acuerdo con la invención se ilustra esquemáticamente a continuación.

ESQUEMA



El elemento clave del procedimiento de síntesis de acuerdo con la invención es la apertura oxidativa del ciclo de bencilideno, que permite la protección selectiva de las posiciones 4 o 6 de la *N*-acetil-galactosamina con un grupo benzoílo. De esta forma, tras solo 3 etapas de protección, la cadena de polisacárido presenta unidades de disacáridos que tienen una única función alcohol aún libre, y solo en la posición 4 o 6 del resto *N*-acetil-galactosamina. La sulfatación completa de un polisacárido protegido de esta manera produce fácilmente un sulfato de condroitina, en el que los restos de *N*-acetil galactosamina sulfatada en las posiciones 4 o 6 están presentes en la misma cadena de polisacárido. La escisión hidrolítica de los grupos protectores produce un sulfato de condroitina con peso molecular y modelo de sulfatación característicos similares a los de la condroitina humana. El esquema de reacción reivindicado, caracterizado por un único procedimiento de purificación final basado en procedimientos de membranas que se puede escalar industrialmente de forma sencilla, produce sulfato de condroitina 4 o 6 con buenos rendimientos a costes compatibles con el escalado industrial.

Los ejemplos siguientes describen la producción de condroitina sulfatada, en la que los restos de *N*-acetil-galactosamina están sulfatados en las posiciones 4 o 6 en la propia cadena de polisacárido, una característica estructural recurrente en el sulfato de condroitina humano y en el sulfato de condroitina obtenido actualmente mediante extracción a partir de fuentes naturales.

Ejemplo 1 - Síntesis de 4,6-bencilideno derivado de condroitina. Preparación de condroitina ácida

Se disolvieron 50 gramos de condroitina obtenidos mediante fermentación tal como se ha descrito en la solicitud de patente italiana N° 1.312.984, que tenía un peso molecular de 38 kDa y una pureza > 90 %, en 1,5 l de agua MilliQ y se mantuvieron con agitación durante aproximadamente 2 h a temperatura ambiente con 250 g de FLUKA Dowex 50 WX8 H+ en forma de resina de intercambio catiónico, malla 50-100, lavada y neutralizada previamente con agua. A continuación, se vertió la suspensión en una columna de vidrio con un septo poroso de 50 mm de diámetro (porosidad 3) formando un lecho de aproximadamente 50 cm de altura. La suspensión se eluyó con agua MilliQ hasta que el eluato tuvo un pH ≤ 2 y se lavó de nuevo con 250 ml de agua MilliQ hasta que el eluato fue neutro. Para garantizar la mejor recuperación del producto, se añadió la solución de lavado al eluato anterior que contenía la condroitina ácida, y se criodesecó la solución resultante. El liofilizado, reducido hasta un polvo fino en un mezclador Waring, se secó adicionalmente a vacío durante la noche. Se obtuvo la condroitina ácida con un rendimiento molecular que superaba el 95 %.

Síntesis de 4,8-bencilideno derivado de condroitina

Se suspendieron 42,1 g (0,111 mol) de condroitina ácida en 1 l de *N,N*-dimetilformamida anhidra; A continuación se añadieron 167 ml de α,α -dimetoxitolueno (1,11 mol) y 6,2 g de ácido alcanfor-10-sulfónico (26,6 mmoles) en secuencia a la mezcla con agitación a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar la mezcla a 80 °C durante 20 h. A medida que la reacción progresa, la suspensión se volvió cada vez más transparente, hasta que se obtuvo una solución homogénea. El 4,6-bencilideno derivado de condroitina precipitó con 2,5 l de acetona fría, y el precipitado se separó del sobrenadante y se secó al vacío durante la noche. Se obtuvieron 49,6 g de 4,6-bencilideno derivado de condroitina, con un rendimiento molar del 92,8 %.

Se visualizó la bencilinilación en dos partes del espectro de RMN ¹H: presencia de una señal amplia a aprox. 7,3 ppm (protones del anillo aromático) y un singlete a 5,5 ppm (protón del bencilo acetálico).

Ejemplo 2 - Síntesis de 2,3-diacetilo derivado de 4,6-bencilideno condroitina

Se suspendieron 49,1 g (0,102 mol) del producto descrito en el ejemplo 1 en 300 ml de acetonitrilo anhidro. Se añadieron 260 ml de trietilamina, 107 ml de anhídrido acético (1,13 mol) y 3,74 g de 4-(dimetilamina)-piridina a la mezcla con agitación, en dicho orden. La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 22 h, y solubilizó parcialmente. La fase sólida se eliminó mediante centrifugación y se añadieron 300 ml de isopropil éter al sobrenadante, produciendo la precipitación instantánea del derivado de 2,3-diacetilo de la 4,6-bencilideno condroitina, que se separó del sobrenadante y se secó al vacío durante la noche. Se obtuvieron 55,9 g (87,5 mmoles) del producto, con un rendimiento molar del 85,8 %.

Ejemplo 3 - Apertura oxidativa del ciclo del bencilideno del producto descrito en el ejemplo 2.

Se suspendieron 5,59 g (8,75 mmoles) del producto descrito en el ejemplo 2 en 1 l de acetato de etilo. Se añadieron a la suspensión 43,9 de bromato de sodio (0,291 mol), disueltos en 1 l de agua. Se añadieron con agitación 42,3 de ditionato de sodio (0,243 mol), disueltos en 1,45 l de agua, a la mezcla enfriada en agua y un baño de hielo, en varias alícuotas para evitar el calentamiento en exceso. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 24 h bajo iluminación con luz visible. A continuación se retiró el sobrenadante, y el precipitado se secó al vacío durante la noche. Se obtuvieron 46 g (76 mmoles) de producto, que consistía en una mezcla de un derivado de 4 o 6 benzoílo en los restos *N*-acetil-galactosamina, con un rendimiento molar del 86,9 %. Se visualizó la reacción de apertura del bencilideno mediante la presencia de una señal a 5,4 ppm; esta señal, que se refiere al protón H-4 del carbinol de la *N*-acetil-galactosamina, presentó un desplazamiento químico mayor que el resto de protones del carbinol, debido a la benzoinilación. El análisis de RMN bidimensional, en particular los experimentos de espectrometría de coherencia cuántica única heteronuclear -

mejora de la señal sin distorsión por transferencia de polarización (HSQC-DEPT), demuestran que la apertura del bencilideno tiene lugar de forma aleatoria, proporcionando unidades de *N*-acetil-galactosamina cuya posición 4 está benzoilada y cuya posición 6 está sin proteger y viceversa. Se pueden reconocer las señales de tres carbonos secundarios, que necesariamente deben asociarse con las posiciones 6 de la *N*-acetil-galactosamina. Las dos primeras (δ 4,38/63,9 y 4,21/63,9) son consistentes con la posición 6 benzoilada debido al desplazamiento por acilación típico del valor del desplazamiento químico del protón. La perfecta coincidencia del desplazamiento químico del carbono para las dos señales demuestra que la división es debida a la diastereotopicidad de los dos protones en la posición 6 benzoilada. La señal del tercer carbono secundario (δ 3,34/60,3) no presenta ningún desplazamiento por acilación, y se puede asociar con la posición 6 sin proteger.

10 **Ejemplo 4 - Sulfatación del producto descrito en el ejemplo 3 y eliminación de los grupos protectores**

Se suspendieron 45 g (74,4 mmoles) del producto descrito en el ejemplo 3 en 650 ml de *N,N*-dimetil-formamida anhidra. Se añadieron 245 g (1,54 mol) de complejo de piridina-anhídrido sulfúrico, disueltos en 1,25 l de *N,N*-dimetilformamida anhidra, a la suspensión con agitación magnética a temperatura ambiente, en varias alícuotas. La mezcla de reacción se volvió rápidamente transparente y la solución se dejó con agitación a 50 °C durante 23 h. El producto de reacción se precipitó con 6 l de una solución saturada de NaCl en acetona. El precipitado, capturado en la cantidad mínima de agua, proporcionó una solución ácida (pH \approx 1-2); esta solución se calentó a 50 °C con agitación durante 1 h para eliminar mediante hidrólisis cualquier ciclo de bencilideno presente en los restos de *N*-acetil-galactosamina que sobrevivieron a la reacción de apertura oxidativa descrita en el ejemplo 3. A continuación se enfrió la solución a temperatura ambiente y se ajustó a pH \approx 13 con NaOH, y la solución básica se mantuvo con agitación durante 6 h para eliminar los grupos acilo protectores de las posiciones 2 y 3 de los restos de ácido glucurónico y el grupo protector de benzoilo de las posiciones 4 o 6 de los restos de *N*-acetil-galactosamina. El volumen de reacción se redujo a aprox. 1/4 mediante evaporación rotatoria y la solución se diafiltró a 4 °C con 10 volúmenes (corte de membrana: 10 kDa). Se obtuvieron 33,8 g de condroitina O-sulfatada en las posiciones 4 o 6 de la *N*-acetil-galactosamina (67,2 mmoles), con un rendimiento molar del 90,3 %, mediante criocongelación posterior.

25 **Ejemplo 5 - Identificación estructural del producto descrito en el ejemplo 4**

Se disolvieron 78 mg (0,155 mmol) del producto descrito en el ejemplo 4 en la cantidad mínima de agua bidestilada y se filtraron a través de un cartucho Sep-Pak C18. El producto seco, obtenido mediante criodesecación posterior, se disolvió en 3,5 ml de tampón TRIS-HCl 0,1 M, pH 8. Se añadieron 3,2 unidades de condroitinasa ABC de *Proteus vulgaris*, disueltos en 3,2 ml de agua bidestilada, en 4 alícuotas con un intervalo de 48 h. A continuación, la enzima se desactivó calentando la mezcla de reacción a 100 °C durante 5 min. Se analizó el digestato enzimático mediante HPLC en una columna de intercambio iónico (con un gradiente de elución de NaCl de 0,01 a 0,2 M). Los constituyentes de la mezcla, identificados mediante inyecciones simultáneas sucesivas de patrones puros, son 2-acetamida-2-desoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-eno-piranosilurónico)-6-O-sulfo-D-galactosa, ácido 2-acetamida-2-desoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-eno-piranosilurónico)-4-O-sulfo-D-galactosa y 2-acetamida-2-desoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-eno-piranosilurónico)-D-galactosa en relaciones relativas de 47:40:13 respectivamente, como se evaluó mediante la integración de los picos cromatográficos sin inyección simultánea de patrones. El orden de elución concuerda con la bibliografía (Volpi N. 2004. Carbohydr. Polym, 2004, 55, 273-281).

40 Se llevó a cabo el estudio de resonancia magnética nuclear (RMN) del producto descrito en el ejemplo 4 disolviendo 20 mg del producto criodesecado en 0,6 ml de agua deuterada y llevando a cabo una espectroscopía de correlación monodimensional de ^1H y bidimensional de ^{13}C (COSY), experimentos de espectroscopía de correlación total (TOCSY) y espectroscopía de coherencia cuántica única heteronuclear (HSQC). Los datos de espectroscopía se muestran en la Tabla.

45

Tabla - Datos de RMN de ¹H y de ¹³C del sulfato de condroitina 4 c 6 sulfato.

¹ H ¹³ C	N-acetil-galactosamina						ácido glucurónico						NCOCH ₃	NCOCH ₃
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
4-sulfato	4,45	3,92	3,89	4,64	3,72	3,68	4,36	3,26	3,48	3,62	3,59	---	1,92	---
6-sulfato	100,7	51,2	75,6	76,3	74,4	60,9	103,6	72,2	73,5	81,3	76,2	174,0	22,4	174,7
	4,42	3,90	3,73	4,07	3,86	4,11	4,39			3,64				
	100,9	50,6	79,9	67,2	72,3	67,3	104,2			79,9				

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de sulfato de condroitina, en el que los restos *N*-acetil galactosamina sulfatados en las posiciones 4 o 6 están presentes en la misma cadena de polisacárido; **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas de reacción: a) preparación del derivado de 4,6-bencilideno en los restos de la *N*-acetil-galactosamina en forma ácida; b) acilación de los grupos hidroxilo 2 y 3 de los restos de ácido glucurónico; c) apertura oxidativa del ciclo del bencilideno; d) sulfatación de los grupos hidroxilo 4 o 6 de los restos de *N*-acetil-galactosamina; e) eliminación del grupo protector de benzoilo de las posiciones 4 o 6 de los restos de *N*-acetil-galactosamina, y de los grupos protectores de acilo de los grupos hidroxilo 2 y 3 de los restos de ácido glucurónico; f) purificación del sulfato de condroitina 4 o 6 obtenido de esta manera.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa a) se obtiene haciendo reaccionar condroitina en forma ácida con α,α -dimetoxitolueno en presencia de un catalizador ácido en fase heterogénea durante 10-30 h a 70-90 °C.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se obtiene la etapa b), para la inserción de grupos protectores de acilo en los grupos hidroxilo 2 y 3 de los restos de ácido glucurónico del derivado de 4,6-bencilideno de la condroitina, haciendo reaccionar el producto de la etapa a) en fase heterogénea a temperatura ambiente durante 10-30 h con un anhídrido de ácido carboxílico en presencia de trietilamina y 4-(dimetilamina)-piridina.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa c), para la apertura oxidativa del anillo de bencilideno, se lleva a cabo haciendo reaccionar el producto de la etapa b) en fase heterogénea, a baja temperatura, en presencia de luz visible, durante 10-30 h con bromato de sodio y ditionito de sodio.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa d), para la sulfatación en 4 o 6 de los restos de *N*-acetil-galactosamina, se lleva a cabo haciendo reaccionar el producto de la etapa c) en fase heterogénea, a temperaturas comprendidas entre 10 y 100 °C, durante 10-60 h con un complejo de piridina-anhídrido sulfúrico.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa e), para la eliminación del grupo protector de benzoilo de las posiciones 4 o 6 de los restos de *N*-acetil-galactosamina y de los grupos protectores de acilo en los hidroxilos 2 y 3 de los restos de ácido glucurónico, implica hidrólisis ácida para eliminar cualquier resto de bencilideno aún presente en las posiciones 4-6 de la *N*-acetil-galactosamina, seguido por hidrólisis alcalina para eliminar los grupos acilo.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la hidrólisis ácida se lleva a cabo disolviendo el producto de la etapa d) en agua y calentando este a 50 °C durante 0,1-10 h, y la posterior hidrólisis básica se lleva a cabo ajustando la solución de hidrólisis ácida a pH 13 con NaOH y manteniéndola a temperatura ambiente durante 1-20 h.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa f), que comprende la purificación de la condroitina 4 o 6 sulfatada de los restos de *N*-acetil-galactosamina, implica la ultrafiltración/diafiltración en membranas con un corte de 2-20 kDa y el secado del retentado.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que ultrafiltración/diafiltración se lleva a cabo con membranas con un corte de 10 kDa.
10. Sulfato de condroitina, obtenido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, en el que los restos de *N*-acetil-galactosamina en cada cadena de polisacárido se sulfatan en las posiciones 4 o 6 en un porcentaje comprendido entre 20 y 95 %.
11. El sulfato de condroitina de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la relación entre la sulfatación en las posiciones 4 y 6 de los restos de galactosamina está comprendido entre 0,1 y 10.
12. El sulfato de condroitina de acuerdo con las reivindicaciones 10 y 11, que tiene un peso molecular comprendido entre 5 y 50 kDa.
13. El sulfato de condroitina de acuerdo con la reivindicación 12, que tiene un peso molecular comprendido entre 12 y 30 kDa.
14. El sulfato de condroitina de acuerdo con la reivindicación 13, que tiene un peso molecular comprendido entre 15 y 25 kDa.