

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 641**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 13/10 (2006.01)
C07H 11/00 (2006.01)
C07H 13/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008 E 08800116 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2303930**

54 Título: **Compuesto polisacárido sulfatado y preparación y utilización del mismo**

30 Prioridad:

04.07.2008 AU 2008903436

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

06.04.2016

73 Titular/es:

PARNELL TECHNOLOGIES PTY LTD (100.0%)
Unit 4 476 Gardeners Road
Alexandria, NSW 2015, AU

72 Inventor/es:

STAJIC, VLADIMIR;
CHEETHAM, NORMAN y
BELL, ALAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 565 641 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

Compuesto polisacárido sulfatado y preparación y utilización del mismo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto polisacárido sulfatado y a la preparación y utilización del mismo, y en particular a un pentosano muy sulfatado, de bajo peso molecular de distribución reducida (en este caso un xilano) denominado sulfato de glucuronoxilano (GXS).

La invención se ha desarrollado principalmente para su utilización en el tratamiento de diversos cuadros clínicos. Sin embargo, se apreciará que la invención no se limita este campo específico de utilización.

Problemas de la técnica anterior

10 Subsulfatación

15 Los glucanos y glucosaminoglucanos muy sulfatados (ésteres de sulfato) forman una clase terapéutica significativa de productos farmacéuticos en medicina humana y veterinaria. Los ésteres de sulfato demuestran una amplia gama de utilidad clínica en el tratamiento de diversas enfermedades, incluidas la osteoartritis, la isquemia miocárdica, la cistitis intersticial, el cáncer, y el control y tratamiento de enfermedades víricas, incluidos el virus de la inmunodeficiencia humana y otros retrovirus.

20 El polisulfato de pentosano se ha utilizado en formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de la osteoartritis, como anticoagulante o por otras enfermedades tales como la cistitis intersticial, la encefalopatía espongiiforme transmisible (TSE) y el virus de la inmunodeficiencia (tales como el VIH/SIDA o el virus de inmunodeficiencia felina (VIF)) en mamíferos, tales como seres humanos, productores de alimentos y animales de compañía (tales como felinos, caninos y equinos). El polisulfato de pentosano también puede utilizarse para tratar hematomas, hemorroides, congelación, quemaduras y enfermedades multiparamétricas tales como trombosis y aterosclerosis.

25 Los ésteres de sulfato, incluidos la heparina, el sulfato de dextrano y PPS son semisintéticos. Su obtención y síntesis han demostrado ser muy difíciles, siendo muy variables los resultados de la producción. Esto se ha traducido en resultados clínicos inconsistentes. Si bien actualmente no existen ensayos clínicos publicados mirando las diferencias en los resultados clínicos de tratamiento de la artrosis utilizando PPS más homogéneo y mucho más sulfatado en comparación con el PPS poco sulfatado, la prueba anecdótica sugiere variabilidad en el resultado clínico de los PPS poco sulfatados. Hay dos razones químicas principales que podrían estar detrás de la variabilidad de los resultados:

(a) PPS con intervalos de peso molecular incoherentes; y

(b) PPS con una gran variación en el grado de sulfatación (14-17%).

30 En los documentos EP0406685 y WO 9842754 se describen ejemplos de procedimientos de sulfatación.

Sin embargo, la patente de EE.UU. n° 4.713.373 apoya la reivindicación de que las fracciones de cadenas de glucanos tales como PPS con mayores grados de sulfatación tendrán mucha mayor eficacia que las que tienen menor sulfatación. En relación a la heparina (un glucosaminoglucano), se sabe que el tipo y posición de los grupos sulfato así como el nivel de sulfatación son importantes para la eficacia.

35 El refinamiento de la molécula de glucano o glucosaminoglucano (para el desarrollo, por ejemplo, de las heparinas de bajo peso molecular) ha sido bien documentado dando como resultado el desarrollo de moléculas con mayor coherencia y previsibilidad en los resultados clínicos. Sin embargo, en la práctica, ha demostrado ser difícil de conseguir un nivel de sulfatación consistentemente alto en posiciones constantes a lo largo de la cadena y en un intervalo de bajo peso molecular. Hasta la fecha nadie ha examinado la importancia del tipo y la ubicación de los grupos sulfato o distinguido la estructura química de la molécula de PPS producida por un proceso de fabricación de la producida por otro. Además, el grado de sulfatación dentro de las formulaciones de PPS conocidas puede variar ampliamente, lo que también puede conducir a la variabilidad en la eficacia clínica.

45 El polisulfato de pentosano como ácido libre o en forma de sal (generalmente con cationes inorgánicos tales como sodio o de calcio) se describe en la técnica anterior como una mezcla de oligosacáridos polisulfatados semisintéticos, generalmente obtenidos a partir de xilano de la madera de haya. El polisulfato de pentosano consiste en unidades lineales sulfatadas de beta-D-xilopiranosas conjugadas en 1-4 y tiene ácido 4-O-metil-D-glucurónico unido al azar en cada ocho a diez unidades de xilosa (por término medio).

50 El número típico de unidades de xilosa en una mezcla de PPS publicado en la técnica anterior ha sido de entre seis y treinta. Mezclas de PPS actualmente presentes en el mercado (cuando está en forma de sal de sodio en todos los grupos SO_3^-) contienen generalmente 15 a 17% de sulfatación. Aunque la técnica anterior describe grados de

5 sulfatación del 15 al 20%, es evidente a partir de la teoría y la experiencia que el 20% de sulfatación de PPS no es teóricamente posible a menos que el sodio se sustituya por hidrógeno dando bisulfato de pentosano (en cuyo caso la sulfatación máxima es de 21,9 %). El mayor grado posible de sulfatación para PPS fisiológicamente activo es del 18,9 al 19%, dependiendo de la longitud de la molécula. De hecho hasta la fecha, no hay tampoco ninguna justificación en la técnica anterior de 19% de sulfatación para PPS, y aún menos de mayores grados de sulfatación.

10 Pueden resultar diferencias en el procedimiento de fabricación (especialmente durante la hidrólisis y la sulfatación) con diferencias moleculares de la molécula de PPS, tales como el grado de sulfatación y la posición de grupos sulfato en la cadena de glucano. Es bien sabido que la eficacia clínica de los carbohidratos sulfatados puede verse afectada por el tipo y la posición de los grupos SO_3^- , de ahí la necesidad de controlar y caracterizar totalmente las moléculas. Esto es bien sabido en relación a la heparina pero hasta la fecha este conocimiento no se ha aplicado adecuadamente a la(s) molécula(s) PPS.

15 Los análisis de RMN de la técnica anterior de los ésteres de sulfato (tal como la Patente de EE.UU. n° 4.713.373) utilizan proporciones de picos de RMN para calcular los grados de sulfatación. Sin embargo, las proporciones de los picos de RMN no indicarán necesariamente el grado de sulfatación de la molécula a menos que el cálculo se haga mediante el análisis de todo el espectro de RMN.

20 La técnica anterior a PPS no caracteriza la posición de los grupos SO_3^- (excepto para describir la sulfatación completa teórica) o para exponer las subespecies moleculares. No ha habido ninguna descripción en la técnica anterior de dónde no se encuentra el azufre a lo largo de la cadena de glucosaminoglucano o glucano cuando la sulfatación no es completa. La técnica anterior reconoce que las mezclas de PPS difieren, pero se centran sólo en el nivel de sulfatación y el peso molecular medio como factores que pueden afectar significativamente la eficacia fisiológica del material PPS.

25 Los estudios con heparina demuestran que la eficacia de la variación de especies moleculares (de heparina) depende de la posición de los grupos $-\text{OSO}_3^-$ dentro de la molécula. Específicamente, la relación de la estructura química a la actividad para la heparina se identifica con una secuencia de pentasacárido que comprende tres unidades de D-glucosamina y dos de ácido urónico. La unidad central de D-glucosamina en esta secuencia contiene un resto 3-O-sulfato que es raro fuera de esta secuencia. Grupos sulfato en las D-glucosaminas se encuentran que son críticos para retener gran actividad anticoagulante, mientras que la infrasulfatación en lugares menos importantes parece no afectar la actividad anticoagulante.

30 Diferentes técnicas de fabricación conducen a diferentes tipos (estructuras químicas) de la heparina que se producen y estas estructuras diferentes se demuestra que tienen diferentes eficacias clínicas. A modo de analogía, las especies moleculares de otras cadenas de glucano (incluido el PPS) varían de acuerdo no sólo con el grado de sulfatación, sino también según la posición de los átomos de azufre. La técnica anterior a PPS no se ocupa de esto en detalle.

35 Aunque el uso de PPS llegó a generalizarse, y reducir variaciones entre lotes que podrían afectar a la eficacia farmacéutica, el problema fundamental a superar fue la producción de una especie molecular del PPS con un contenido de azufre constante cerca de o en 18 a 19%, con un intervalo de peso molecular medio restringido que garantiza beneficios fisiológicos constantes y grupos sulfato constantemente unidos a posiciones que garanticen efectos fisiológicos. Hasta la fecha, no ha habido ninguna exposición en la técnica anterior en cuanto a la importancia relativa de las posiciones de los grupos sulfato en la cadena de glucosaminoglucanos o glucanos.

Peso molecular de amplio espectro

40 PPS se obtiene de fuentes naturales tales como xilano de la madera de haya. En su forma natural, PPS consiste en cadenas moleculares de distintas longitudes o pesos moleculares. Sin embargo, como la heparina, los efectos de PPS natural no fraccionado pueden ser difíciles de predecir.

La experiencia clínica con heparina ha descubierto que al modificar la heparina y hacer la mezcla de moléculas más homogénea (con un intervalo más estrecho de peso molecular), se puede conseguir mayor eficacia clínica, consistencia y seguridad. Experiencia similar ha surgido en el uso clínico de PPS.

45 Sin embargo, en la práctica, ha sido difícil de conseguir consistencia de la mezcla heterogénea de los hidratos de carbono que componen PPS durante la producción comercial. Esto es debido a que ha sido difícil de conseguir un peso molecular medio uniforme, un peso molecular uniformemente bajo y uniforme pero alto nivel de sulfatación.

Objeto de la invención

50 Es un objetivo de la presente invención superar o mejorar al menos una de los inconvenientes de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

Según un aspecto de la invención, se proporciona una molécula de glucano sulfatado (éster de sulfato) que tiene:

- (a) una o más unidades lineales de beta-D-xilosa conjugadas en 1-4; y

- (b) al menos una unidad de ácido 4-O-metil-β-D-glucurónico unida al carbono 2 de cada aproximadamente ocho a diez (por término medio) de dichas unidades de xilosa.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de glucano sulfatado (éster de sulfato) que tiene:

- (a) una o más unidades lineales de beta-D-xilosa conjugadas en 1-4; y

- 5 (b) al menos una unidad de ácido 4-O-metil-β-D-glucurónico unida al carbono 2 de cada aproximadamente ocho a diez (por término medio) de dichas unidades de xilosa,

en donde dicha molécula tiene la siguiente configuración de grupos SO_3^- cuando está completamente sulfatada:

- (i) dos grupos SO_3^- de cada una de dicha(s) unidad(es) de ácido glucurónico, independientemente de la posición de dicha(s) unidad(es) de ácido glucurónico lo largo de dicha molécula;

- 10 (ii) tres grupos SO_3^- en una unidad de xilosa terminal cuando dicha unidad de xilosa no tiene un grupo de ácido glucurónico;

- (iii) dos grupos SO_3^- en una unidad de xilosa terminal cuando dicha unidad de xilosa tiene un grupo de ácido glucurónico;

- 15 (iv) dos grupos SO_3^- en una unidad de xilosa a mitad de la cadena cuando dicha unidad xilosa a mitad de la cadena no tiene un grupo de ácido glucurónico;

- (v) un grupo SO_3^- en una unidad de xilosa a mitad de la cadena cuando dicha unidad de xilosa mitad de la cadena tiene un grupo de ácido glucurónico.

Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de glucano sulfatado (éster de sulfato) que tiene:

- 20 (a) una o más unidades lineales de beta-D-xilosa conjugadas en 1-4; y

- (b) al menos una unidad de ácido 4-O-metil-β-D-glucurónico unida al carbono 2 de cada aproximadamente ocho a diez (por término medio) de dichas unidades de xilosa,

en donde dicha molécula tiene la siguiente configuración preferente de grupos NaSO_3^- cuando está muy sulfatada:

- 25 (i) hasta dos grupos SO_3^- de cada una de dicha(s) unidad(es) de ácido glucurónico, independientemente de la posición de dicha(s) unidad(es) de ácido glucurónico lo largo de dicha molécula;

- (ii) hasta tres grupos SO_3^- en una unidad de xilosa terminal cuando dicha unidad de xilosa no tiene un grupo de ácido glucurónico;

- (iii) hasta dos grupos SO_3^- en una unidad de xilosa terminal cuando dicha unidad de xilosa tiene un grupo de ácido glucurónico;

- 30 (iv) hasta dos grupos SO_3^- en una unidad de xilosa a mitad de la cadena cuando dicha unidad xilosa mitad de la cadena no tiene un grupo de ácido glucurónico; y

- de (v) hasta un grupo SO_3^- en una unidad de xilosa a mitad de la cadena cuando dicha unidad de xilosa a mitad de la cadena tiene un grupo ácido glucurónico,

de tal manera que no no hay más de un total de dos grupos SO_3^- en un estado totalmente sulfatado.

- 35 Según otro aspecto de la invención se proporciona una mezcla que comprende moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) en donde dichas moléculas tienen la siguiente estructura química típica:

- (a) una o más unidades lineales de beta-D-xilosa conjugadas en 1-4; y

- (b) al menos una unidad de ácido 4-O-metil-β-D-glucurónico unida al carbono 2 de cada aproximadamente ocho a diez (por término medio) de dichas unidades de xilosa.

- 40 Según aún otro aspecto de la invención, se proporciona una mezcla que comprende moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) en donde dichas moléculas tienen la siguiente estructura química típica:

- (a) una o más unidades lineales de beta-D-xilosa conjugadas en 1-4; y
- (b) al menos una unidad de ácido 4-O-metil- β -D-glucurónico unida al carbono 2 de cada aproximadamente ocho a diez (por término medio) de dichas unidades de xilosa,

5 en donde dicha unidad de ácido glucurónico reside preferentemente en una unidad de xilosa del terminal izquierdo.

Según aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona una mezcla que comprende moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) en donde dichas moléculas tienen la siguiente estructura química típica:

- (a) una o más unidades lineales de beta-D-xilosa conjugadas en 1-4; y
- (b) al menos una unidad de ácido 4-O-metil- β -D-glucurónico unida al carbono 2 de cada aproximadamente ocho a diez (por término medio) de dichas unidades de xilosa,

10

en donde dicha unidad de ácido glucurónico reside preferentemente en una unidad de xilosa del terminal derecho.

Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona una mezcla que comprende moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) en donde dichas moléculas tienen la siguiente estructura química típica:

15

- (a) una o más unidades lineales de beta-D-xilosa conjugadas en 1-4; y
- (b) al menos una unidad de ácido 4-O-metil- β -D-glucurónico unida al carbono 2 de cada aproximadamente ocho a diez (por término medio) de dichas unidades de xilosa,

en donde dicha unidad de ácido glucurónico reside preferentemente en una unidad de xilosa a mitad de la cadena.

20

Según aún un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para la producción de una mezcla que comprende moléculas de glucano sulfatado en donde dichas moléculas comprenden:

- (a) una o más unidades lineales de beta-D-xilosa conjugadas en 1-4; y
- b) al menos una unidad de ácido 4-O-metil- β -D-glucurónico unida al carbono 2 de cada aproximadamente ocho a diez (por término medio) de dichas unidades de xilosa.

25

Según un aspecto adicional de la invención todavía, se proporciona un método para el fraccionamiento de moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) obtenidas de xilano utilizando un disolvente orgánico.

Según aún otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la purificación de una mezcla que comprende moléculas de glucano sulfatados (éster de sulfato), en donde dicha purificación implica fraccionamiento utilizando un disolvente orgánico.

30

Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la decoloración de una mezcla que comprende moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato), en donde dicha decoloración implica:

- (a) carbón vegetal;
- (b) cloro;
- (c) peróxido;

35

- (d) fraccionamiento empleando un disolvente orgánico; o
- (e) cualquier combinación de los anteriores.

Según un aspecto adicional de la invención todavía, se proporciona una formulación terapéutica de moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) adecuada para administración parenteral en la que dicha formulación incluye moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) en solución acuosa.

40

Según un aspecto adicional de la invención todavía, se proporciona una formulación terapéutica de moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) adecuada para administración oral.

Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un mecanismo para la administración de una formulación terapéutica de moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato), en donde dicho mecanismo de administración es un dispositivo de suministro tipo pluma que permite:

- (a) marcar en un dial la dosis;
- 5 (b) precarga con un cartucho de dosis unitaria;
- (c) una combinación de las anteriores.

Según aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona una mezcla de moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato) adecuadas para su uso como antioxidante.

- 10 Según otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un antioxidante que comprende moléculas de glucano sulfatado (éster de sulfato).

Breve descripción de los dibujos

A continuación se describirá, a modo de ejemplo solamente, una realización preferida de la invención con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- 15 La figura 1 es una representación esquemática de una realización preferida de GXS que muestra los puntos de sulfatación en las unidades de xilosa que componen la cadena de glucano y la presencia de una unidad de ácido glucurónico en la unidad de xilosa del terminal izquierdo.

La figura 2 es un ejemplo de un resultado típico de espectrometría de RMN del compuesto A PPS de la técnica anterior.

La figura 3 es un ejemplo de un resultado típico de espectrometría de RMN del compuesto B PPS de la técnica anterior.

La figura 4 es un ejemplo de un resultado típico de espectrometría de RMN de la realización preferida, compuesto C.

- 20 La figura 5 es un ejemplo de un resultado típico de espectrometría de RMN de la realización preferida, compuesto C, pero con la adición de ácido trifluoroacético a la solución D₂O de GXS, con el fin de mover el pico de agua que oscurece parcialmente el pico a 4,7 ppm.

La figura 6 es un ejemplo de un perfil típico de electroforesis capilar en zona del compuesto A PPS.

La figura 7 es un ejemplo de un perfil típico de electroforesis capilar en zona del compuesto B PPS.

- 25 La figura 8 es un ejemplo de un perfil típico de electroforesis capilar en zona de la realización preferida, compuesto C.

La figura 9 es un diagrama de flujo que esboza una realización preferida del método de doble sulfatación.

La figura 10 es una tabla que contiene datos ilustrativos obtenidos en la cromatografía de exclusión por tamaño de GXS no fraccionado y GXS fraccionado (obtenidos en las concentraciones de etanol listadas).

La figura 11 es un cromatograma ilustrativo relativo a la muestra de GXS no fraccionado en la figura 10.

- 30 La figura 12 es un cromatograma ilustrativo que muestra un pico en sección de una primera fracción de GXS obtenido utilizando 40% de etanol como disolvente orgánico.

La figura 13 es un cromatograma ilustrativo que muestra un pico en sección de una segunda fracción de GXS obtenido utilizando 45% de etanol como disolvente orgánico.

- 35 La figura 14 es un cromatograma ilustrativo que muestra un pico en sección de una tercera fracción de GXS obtenido utilizando 50% de etanol como disolvente orgánico.

La figura 15 es un cromatograma ilustrativo que muestra un pico en sección de una cuarta fracción de GXS obtenido utilizando 55% de etanol como disolvente orgánico.

La figura 16 es un cromatograma ilustrativo que muestra un pico en sección de una quinta fracción de GXS obtenido utilizando 60% de etanol como disolvente orgánico.

- 40 La figura 17 es un cromatograma ilustrativo que muestra un pico en sección de una sexta fracción de GXS obtenido utilizando 65% de etanol como disolvente orgánico.

La figura 18 es un cromatograma ilustrativo que muestra un pico en sección de una séptima fracción de GXS obtenido utilizando 70% de etanol como disolvente orgánico.

La figura 19 es un espectro ilustrativo de RMN obtenido a partir de un GXS del segundo ciclo de fraccionamiento (en 45% de etanol).

La figura 20 es un espectro ilustrativo de RMN obtenido a partir de un GXS del tercer ciclo de fraccionamiento (en 50% de etanol).

- 5 La figura 21 es un espectro ilustrativo de RMN obtenido a partir de un GXS del cuarto ciclo de fraccionamiento (en 55% de etanol).

Descripción detallada

- 10 Una realización preferida de la presente invención se describirá a continuación haciendo referencia a los dibujos. La siguiente descripción detallada junto con las figuras proporciona el destinatario experto una comprensión de la invención. Debe apreciarse, sin embargo, que la invención no se limita a las aplicaciones descritas a continuación.

Diccionario de términos definidos

La Tabla 1 es un diccionario de términos definidos según la invención. Los términos definidos en la Tabla 1 se indican con el uso de mayúsculas en todo el documento. Si un término no se escribe con mayúscula entonces ha de interpretarse su significado corriente, a menos que se especifique lo contrario.

Tabla 1: Diccionario de términos definidos

Término	Descripción
Grado de sulfatación	Medición de la composición relativa de azufre en una molécula de glucano. Esta se mide como peso molecular relativo del azufre expresado en porcentaje del peso molecular de toda la cadena. Véase más abajo las definiciones de sulfatación "completa", "fuerte" y "parcial".
Sulfatación completa, totalmente sulfatado, estado totalmente sulfatado	Saturación de una molécula de glucano en la que el azufre ocupa todas las posiciones disponibles en las unidades de xilosa y unidades de ácido glucurónico en la cadena de glucano. La sulfatación completa de la cadena de glucano es del 18,9% (cuando el sodio no está sustituido por hidrógeno, como se expone en problemas de la técnica anterior).
GXS	Anión sulfato de glucuronoxilano y sus sales
PPS	Polisulfato de sodio y pentosano
Fuerte sulfatación, muy sulfatado, estado muy sulfatado	Fuerte sulfatación de la cadena de glucano es una sulfatación del 18% o mayor.
Pm	Peso molecular de la parte superior de un pico de la cromatografía por exclusión de tamaño
Sulfatación parcial, parcialmente sulfatado, estado parcialmente sulfatado	Sulfatación parcial es menos del 18% de sulfatación. En la práctica, las moléculas PPS de la técnica anterior (que son una cadena de glucano) no han superado 17% de sulfatación a menos que el sodio se sustituya por hidrógeno, resultando bisulfato de pentosano en lugar de PPS.
Fraccionamiento selectivo	En este documento fraccionamiento selectivo significa fraccionamiento con un disolvente orgánico tal como etanol realizado en una solución alcalina (p. ej., pH 9,0)

15

Los elementos de la invención se describen a continuación bajo los siguientes encabezamientos:

Una realización preferida de un compuesto polisacárido sulfatado: GXS

La presente invención proporciona una nueva molécula de glucano sulfatado (éster de sulfato). La nueva molécula es la primera molécula conocida para conseguir fuerte y total sulfatación de la cadena de xilano y se denominará sulfato de glucuronoxilano (GXS). GXS es distinto de las moléculas PPS conocidas, como se muestra por análisis químico y estudios clínicos de rendimiento (expuestos más adelante en este documento). Ningún método descrito actualmente en la técnica anterior es capaz de conseguir fuerte o total sulfatación de la molécula de PPS.

Estructura química

Según la técnica anterior, PPS consiste en unidades lineales sulfatadas de beta-D-xilopiranososa conjugadas en 1-4 y tiene ácido 4-O-metil-β-D-glucurónico unido al azar al carbono 2 en cada ocho a diez unidades de xilosa (por término medio).

Una configuración de la realización preferida es una mezcla de moléculas GXS en la que al menos el 10% de las moléculas en la mezcla están completamente sulfatadas. El término "sulfatación completa" lo utiliza el solicitante para referirse a una configuración de la molécula GXS como se ilustra en la figura 1, con la siguiente composición de grupos SO₃⁻:

(a) en la unidad de xilosa del terminal derecho ilustrada, hay tres grupos SO₃⁻;

(b) en cada unidad de xilosa a mitad de la cadena, hay dos grupos SO₃⁻; y

(c) en la unidad de xilosa del terminal izquierdo, hay una unidad de ácido glucurónico (definida por una unidad carboxilo y un grupo -OCH₃ [4-metoxi]) y dos unidades SO₃⁻.

La configuración anterior se basa en la bibliografía científica (p. ej., Friedrich Cavagna, Hans Deger, Jurgen Puls, *Carbohydrate Research* 129 (1984) 1-8), que indica que el 97% de las moléculas en una mezcla de isómeros de glucano hidrolizados tendrá la unidad de ácido glucurónico en la pentosa del terminal izquierdo. También es bien conocido que los grupos carboxilo en especies moleculares tales como enzimas a menudo participan indirectamente y guían/catalizan la hidrólisis. Además, el programa de modelado 3D (en concreto, el programa comercial conocido como ACD/3D de Advanced Chemistry Development, Inc.) indica que en la macromolécula de xilano sulfatado no hidrolizado, unidades de xilosa modificadas con ácido glucurónico estarán en la configuración de barco retorcida, añadiendo motivos de configuración y estéricos a la hidrólisis dirigida (guiada por el ácido glucurónico). Esto está en contraste con la técnica anterior de PPS que reivindica asignación aleatoria de unidades de ácido glucurónico en las unidades de xilosa de la cadena izquierda, derecha y media.

Las realizaciones preferidas permiten un alto rendimiento de glucanos muy y/o completamente sulfatados. Los isómeros de estos glucanos pueden separarse utilizando electroforesis, cromatografía o técnicas similares, produciendo con ello compuestos con eficacia farmacéutica o terapéutica potencialmente mayor.

En una primera realización preferida, el GXS se fracciona utilizando un disolvente orgánico. Ninguna de las moléculas de PPS conocidas extraídas en xilano se fraccionan de esta manera. En una segunda realización preferida, el GXS no se fracciona. Todos los comentarios en la descripción detallada se aplican a todas las realizaciones y configuraciones de la invención, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En todas las configuraciones, la realización preferida es un GXS semisintético con 18% o más de sulfatación, verificada por pruebas para grado de sulfatación (expresado en porcentaje en peso de la composición de la cadena de glucano). La tabla 1 contiene ejemplos de pruebas en tres lotes, que demuestran más de 18% de sulfatación de GXS sintetizado como una sal de sodio utilizando el método de la invención:

Tabla 1. Grado de sulfatación

	% de sulfatación
Lote 1	18,2
Lote 2	18,0
Lote 3	18,4

GXS es un anión y puede existir en una amplia gama de realizaciones prácticas, uniendo a varios contraiones tales como metales inorgánicos (p. ej., Na, K, Ca, Mg, Ag) o bases orgánicas. Se incluyen también más ejemplos en el

apartado "1.2 Conversión de la sal de piridinio en una sal de sodio, como configuración ilustrativa de la realización preferida".

5 El grado de sulfatación de la realización preferida se distingue de las cadenas de glucano conocidas procedentes del xilano (descritas en la técnica anterior como moléculas PPS), que tienen menos de 17% de sulfatación en la práctica. El solicitante sugiere que esto es debido a una diferencia nueva en el método de preparación de GXS en comparación con PPS conocidos, como se describe más adelante en este documento.

10 El grado de sulfatación de GXS en comparación con el PPS se ha comprobado por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) de protones, llevada a cabo por un laboratorio independiente utilizando la misma metodología (50 mg/ml de D₂O con o sin ácido trifluoroacético) y equipo (600 MHz) a través de muestras de tres compuestos de glucanos diferentes, cada una obtenida a partir de xilano pero fabricada por un proveedor diferente. Los tres compuestos diferentes analizados fueron los siguientes:

- (a) compuesto A (véase la figura 2) - un compuesto PPS;
- (b) compuesto B (véase la figura 3) - un compuesto PPS; y
- (c) el compuesto de la invención (compuesto C – véase la figura 4): un compuesto de GXS.

15 En las figuras 2 a 4 se demuestran ejemplos del análisis de RMN de diferentes compuestos. El compuesto de la invención, compuesto C, se diferencia de los compuestos de PPS de la técnica anterior, indicados por los análisis de RMN (y otros análisis descritos a continuación). Los desplazamientos exactos del pico de RMN diferirán según las condiciones experimentales tales como la temperatura, la concentración de la muestra, el disolvente utilizado, y así sucesivamente. Por lo tanto, todos los desplazamientos del pico de RMN son aproximados y solamente indicativos.

20 Con referencia a la figura 2, la intensidad del pico visto a 5,1 ppm indica sulfatación incompleta del compuesto A en la posición 2 de las subunidades de xilosa. Para aclarar, el pico a 5,1 ppm se debe al desplazamiento en la RMN de protones a C1 de las unidades de xilosa cuando un grupo sulfato está presente en C2 (lo que significa que el desplazamiento de este protón a C1 no será a 5,1 ppm si no hay sulfatación en C2). Por lo tanto, el pico a 5,1 ppm es una medida indirecta de sulfatación en la posición 2 de las unidades de xilosa.

25 El pico a aproximadamente 3,4 ppm se debe al grupo OCH₃ de ácido glucurónico. La presencia de un solo pico marcado a aproximadamente 3,4 ppm indica la sulfatación consistente en ambas posiciones 2 y 3 de la unidad de ácido glucurónico en el compuesto A.

30 Con referencia ahora a la figura 3, la intensidad y el aspecto de dos picos a 3,4 ppm indican sulfatación desigual del compuesto B en las posiciones 2 y 3 de la unidad de ácido glucurónico. Además, el programa de predicción de RMN indicó que las unidades de ácido glucurónico completamente sulfatadas se presentarán con el pico a aproximadamente 5,3 ppm, mientras que la presencia del pico a 5,2 ppm es típica para el ácido glucurónico parcialmente sulfatado (grupo SO₃ que falta en la posición 3). Por lo tanto, la presencia de dos picos a aproximadamente 3,4 y otros dos picos en la región de 5,2-5,3 ppm indicó sulfatación desigual del ácido glucurónico del compuesto B.

35 Comparando ambas figuras 2 y 3, los espectros de RMN de ambos compuestos A y B no muestran trazas significativas de picos a 5,85 ppm y 5,7 ppm. Según los cálculos teóricos y las búsquedas en bases de datos de estructuras químicas experimentales llevados a cabo por modelado de RMN y programa de predicción (en concreto, el programa comercial conocido como ACD/C+H NMR Predictors y DB por Advanced Chemistry Development, Inc.):

- (a) el pico de 5,85 ppm se relacionará con una xilosa del terminal derecho completamente sulfatada (con tres grupos sulfato); y
- 40 (b) el pico de 5,7 ppm indica que dos (probablemente en las posiciones 1 y 3) de cada tres posibles grupos sulfato en la xilosa del terminal derecho estarán presentes.

Por lo tanto, los picos a 5,85 ppm y 5,7 ppm indican una mezcla de moléculas completamente y parcialmente sulfatadas (en la xilosa del terminal derecho). Dado que ambos de estos picos son prácticamente insignificante para el compuesto A y el compuesto B, esto indica que ninguno de los dos compuestos ha conseguido la sulfatación teórica completa.

45 La figura 4 contiene un ejemplo de los datos de espectrometría de RMN de GXS. La RMN en la figura 4 demuestra la presencia importante de moléculas completamente sulfatadas y la existencia de grupos sulfato (SO₃⁻) en todas las unidades de xilosa a lo largo de la cadena de glucano recién creada conocida como GXS.

50 Específicamente, la sulfatación completa de todas las unidades de xilosa en GXS viene indicada por la aparición de picos a 5,1 ppm, 4,7 ppm (véase también la figura 5), 4,4 ppm y 3,8 ppm, como se muestra en la figura 4. El pico de RMN a 4,7 ppm se ve más claramente en la figura 5, que ha sido recogida por la adición de ácido trifluoroacético a la solución de GXS en D₂O, con el fin de mover el pico de agua (visible en la figura 4 a alrededor de 4,7 ppm) y muestra

la sulfatación completa de ese pico. Los demás picos se pueden ver totalmente en la figura 4. La adición de TFA no es el modo preferido de recogida de espectros de RMN ya que la adición de dicho ácido fuerte podría afectar a la aparición de algunos picos pequeños, pero importantes, o incluso provocar un pequeño cambio de la estructura de GXS que es propensa a la degradación ácida.

5 El único pico marcado en la RMN a aproximadamente 3,4 ppm indica sulfatación consistente y el pico de 5,3 ppm indica sulfatación completa del ácido glucurónico. Además, los picos a aproximadamente 5,85 ppm y 5,7 ppm indican una mezcla de una unidad de xilosa del terminal derecho completamente sulfatada y una unidad de xilosa del terminal derecho parcialmente sulfatada (con grupos SO_3 en las posiciones 1 y 3). Por lo tanto, el modelado predictivo de los datos de RMN indicó que el compuesto GXS de la invención es una mezcla de moléculas completamente sulfatadas y muy sulfatadas, con gran número de moléculas completamente sulfatadas.

10 Las figuras 6 y 7 contienen perfiles típicos de electroforesis capilar en zona de la muestra (CZE) de los compuestos A (Fig. 6) y B (Fig. 7), respectivamente. El compuesto B es el compuesto PPS pionero lanzado al mercado para su uso en la osteoartritis. El fabricante del compuesto A (fabricante A) lanzó posteriormente un compuesto (A) con perfil CZE en forma de campana mostrado en la figura 6 como un tipo de PPS. El fabricante B utilizó previamente la diferencia en los perfiles CZE (es decir, los picos de oligosacáridos más cortos en el perfil CZE del compuesto A en comparación con el compuesto B) al sostener que el PPS en forma de campana no es una copia genérica de la molécula PPS que es el compuesto B.

15 El fabricante A es el solicitante de la solicitud de patente nº WO 2007/123800, en la que se opone a la importancia de picos de CZE bien definidos (oligosacáridos cortos). El componente de la curva en forma de campana del perfil de CZE representa un gran número de especies moleculares. Por el contrario, los picos bien definidos en un perfil de CZE representan un número menor de especies moleculares - en la figura 7, los picos se producen en la izquierda de la curva en forma de campana, lo que indica un menor número de especies moleculares en el intervalo de peso molecular inferior. La curva en forma de campana para el compuesto del fabricante A tiene un perfil más agudo que la del compuesto B (véase comparando las figuras 6 y 7). El fabricante A ha utilizado éste para apoyar una deducción de que el área bajo la curva representa un mayor número de especies de bajo peso molecular.

20 La figura 8 contiene un perfil típico de CZE de la realización preferida no fraccionada. El perfil contiene un gran número de picos bien definidos (oligosacáridos cortos) a la izquierda, continuando en la curva en forma de campana. Una interpretación del perfil de CZE es que indica que la incidencia de las especies moleculares en el intervalo de peso molecular más bajo para el compuesto C (GXS) es mayor que para los compuestos A y B.

30 Aunque los perfiles de CZE de GXS (compuesto C) y del compuesto B PPS tienen similitudes, los perfiles de RMN de los dos compuestos presentan inequívocamente diferencias muy importantes en la estructura química entre las dos moléculas. La RMN es una técnica mejor para distinguir la estructura molecular de los glucanos que CZE y RMN es ampliamente reconocida como una técnica principal de firma química. CZE no puede contar con la misma precisión para determinar la firma química de una molécula.

35 Un método de preparación de GXS a partir de xilano: una realización preferida

Una realización preferida proporciona un nuevo método para la producción de sulfatos de xilano (específicamente, el GXS descrito anteriormente) a partir de xilano de madera de haya. El método de producción incluye las etapas siguientes:

40 (a) realización de una nueva técnica de doble sulfatación utilizando complejo de piridina ácido clorosulfónico en DMF, complejo piridina SO_3 en DMF o una combinación de éstos en un disolvente;

(b) ultrafiltración para eliminar las impurezas inorgánicas (p. ej. cationes divalentes) y algunos de los productos de degradación de mu bajos PM a partir del GXS. La ultrafiltración puede ocurrir en una o más etapas a lo largo del método de producción; y

45 (c) en relación con la realización de GXS fraccionada, la realización del fraccionamiento con un disolvente orgánico tal como etanol, para producir moléculas de GXS de bajo PM con distribución restringida y como un medio novedoso para decoloración. Ningún método conocido para la extracción de moléculas de PPS de la técnica anterior a partir de xilano conlleva una etapa de fraccionamiento utilizando un disolvente orgánico o una mezcla que incluye un disolvente orgánico. Además, el método de fraccionamiento del solicitante incluye las nuevas etapas de:

50 i. fraccionamiento selectivo de la mezcla de GXS (obtenido a partir del método de doble sulfatación), utilizando un disolvente orgánico, para aumentar el rendimiento de moléculas de GXS muy y totalmente sulfatadas;

ii. modificación del pH de la solución molécula/disolvente para hacerla alcalina (por lo tanto precipitando selectivamente las moléculas de PM más alto); y

- iii. empleo de fraccionamiento selectivo como medio para eliminar el color (un cambio de color desde una fracción a la siguiente indica la degradación química que produce coloración del precipitado).

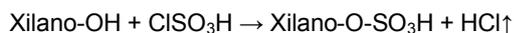
1. Principio de sulfatación

5

1.1 Producción de la sal polisulfato de xilano piridina

El xilano reacciona en determinadas condiciones con ácido clorosulfónico piridina, piridina SO₃ o una combinación para formar ésteres sulfatados de xilano. El medio de reacción contiene un aceptador de protones (N,N-dimetilformamida (DMF)), que puede ser un disolvente aprótico polar superior. Las ecuaciones incluyen:

10



15

En presencia de DMF, la reacción cuantitativa de piridina con ácido clorosulfónico, por ejemplo, produce inmediatamente SO₃HC₅H₅N y un mol de cloruro de piridinio. El SO₃HC₅H₅N reacciona con xilano para formar xilano-O-SO₃HC₅H₅N, que tiene buena solubilidad en DMF. La DMF muy polar se asocia con los grupos hidroxilo del sustrato y los hace más accesibles para el complejo SO₃-piridina, que se utiliza como donante de sulfato. La utilización de piridina y DMF en exceso y la temperatura de sulfatación inferior no sólo puede evitar la degradación sino que forma un sistema homogéneo, lo que da lugar a una reacción más completa.

20

El cloruro de hidrógeno formado en la mezcla de reacción puede ser absorbido en el agua mediante un tubo con CaCl₂. La temperatura (75°C) mantiene el xilano disuelto en el sistema de reacción y da un mayor grado de sulfatación. La sal de piridinio del xilano sulfatado se recupera y se purifica por precipitación en metanol.

1.2. Conversión de la sal de piridinio en una sal de sodio, como ejemplo de configuración de la realización preferida

25

La sal de piridinio se puede convertir en la sal de sodio al elevar el pH a un nivel donde la piridina no está protonada, y se libera como piridina libre. Esta reacción es reversible.



El pH alto acelera la conversión en la sal de sodio, pero puede causar degradación. Un pH de 9,5-10 es adecuado. La piridina residual libre y DMF se eliminan por evaporación rotativa a 50°C.

30

En configuraciones alternativas, la sal de piridinio se puede convertir en otras sales, uniéndose a cualquier otro contraión adecuado, tal como un metal inorgánico (p. ej., Na, K, Ca, Mg, Ag) o una base orgánica. Los ejemplos adecuados incluyen:

(I) Éster etílico de glicina (u otro éster de aminoácido)

(ii) Glucosamina

(iii) Procaína

35

(iv) Tetracaína

(v) Trietanolamina (utilizada en forma de salicilato de trietanolamina)

(vi) Benzatina

(vii) Colina (utilizada en forma de salicilato de colina)

(viii) Benorilato

40

(ix) Imipramina

(x) Penicilamina

(xi) Trimetoprima

(xii) Mesalamina

- (xiii) Meglumina (N-metilglucamina)
- (xiv) 4-metil-2-hexanamina (metilhexanoamina)
- (xv) ácido p-amino hipúrico
- (xvi) 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol
- 5 (xvii) 2-amino-4-picolina
- (xviii) ácido 4-amino salicílico
- (xix) Pirilamina
- (xx) Guanina.

1.3. Control de tamaño molecular y decoloración

- 10 El xilano de un proveedor comercial (p. ej. Sigma o Kaden) tiene un peso molecular mayor (10.000 a 50.000) que el requerido. Teóricamente, la sulfatación completa hará que el peso molecular (PM) del xilano sulfatado final aumente 2,5 veces el del xilano de partida. Para asegurar un PM final de aproximadamente 1.000 a 6.000, pueden utilizarse tres métodos:
- I. el xilano se sulfata directamente después de la hidrólisis a un tamaño molecular adecuado;
 - 15 II. la reducción del tamaño molecular y decoloración se pueden llevar a cabo de forma simultánea realizando la reacción en medio ácido que contiene peróxido de hidrógeno o cloro; o
 - III. el xilano se sulfata directamente, se hidroliza en medio ácido a un tamaño molecular adecuado, y el producto resultante se vuelve a sulfatar.

20 Se ha demostrado que los métodos (II) y (III) son métodos eficientes para obtener un GXS sulfatado de bajo peso molecular, de baja viscosidad. El producto sulfatado es muy soluble en agua en comparación con el xilano natural por eso la despolimerización y la diálisis posterior son más fáciles de realizar. Sin embargo, ambos métodos (I) y (II) adolecen de inconvenientes.

25 En el método (II), aunque la sulfatación seguida de la despolimerización es una manera conveniente de obtener el tamaño molecular deseado, la hidrólisis ácida a alta temperatura (80-100°C) también produce alguna desulfatación. Como resultado, el espectro de RMN del producto final no es satisfactorio. También hay un problema con el poder oxidante residual conferido por el peróxido de hidrógeno, por lo que se recomienda encarecidamente utilizar cloro.

30 En el método (I), aunque la despolimerización seguida de sulfatación proporciona un contenido de sulfatación satisfactorio, la etapa de despolimerización da bajos rendimientos debido a la baja solubilidad del polímero natural en medio ácido, lo que conduce a una reacción heterogénea difícil de reproducir. Además, no es fácil desalar xilano despolimerizado, no sulfatado por diálisis debido a la baja solubilidad que conduce al bloqueo de la membrana.

Es sabido también que la exposición de xilano sulfatado a condiciones extremas tales como medio ácido y calor durante la hidrólisis podría conducir a la pérdida de azufre y apertura de nuevas posiciones para la posible sulfatación.

35 Los inconvenientes de los métodos (I) y (II) pueden superarse mediante la sulfatación seguida de despolimerización, a continuación el método de resulfatación (III). La introducción de grupos sulfato mejora en gran medida la solubilidad del xilano, y la etapa de despolimerización da rendimientos más altos. La desulfatación en la hidrólisis puede ser superada por la resulfatación. El solicitante ha adoptado este método aunque es más costoso de reactivos y consume mucho tiempo.

2. Método de doble sulfatación para producir GXS no fraccionado pero muy sulfatado: una realización preferida

40 Los métodos de producción de ésteres de sulfato conocidos (PPS) a partir de xilano implican sulfatación seguida de hidrólisis ácida. Durante la etapa de hidrólisis, se produce una pérdida de azufre y nuevos grupos OH se abren disponibles para la sulfatación. De esta manera, la hidrólisis ácida produce una reducción en el grado de sulfatación del producto final. Los métodos conocidos no abordan este inconveniente. El método de doble sulfatación de la realización preferida introduce una segunda etapa de sulfatación después de la hidrólisis ácida para reponer el azufre perdido durante la hidrólisis. Esto se describe a continuación.

2.1. Sulfatación de xilano

Con referencia a la etapa 1 en la figura 9, una mezcla de volúmenes iguales de piridina anhidra y DMF anhidro se agita mecánicamente durante media hora aproximadamente a 0°C en un baño con hielo. Por ejemplo, se añade una mezcla de 650 ml de piridina anhidra y 650 ml de DMF anhidra en un matraz de 5 l de fondo redondo de dos cuellos provisto de un agitador mecánico, un termómetro (0-100°C) y un embudo de decantación de 250 ml al que se conecta un tubo de secado con gel de sílice. Esta mezcla se agita mecánicamente durante media hora a 0°C en un baño con hielo.

Con referencia a la etapa 2 en la figura 9, después de aproximadamente 30 minutos, ácido clorosulfónico, complejo piridina SO₃ o una combinación de los dos (en este ejemplo, 167 ml de ácido clorosulfónico) se añade lentamente a la solución (por ejemplo 1 ml/min) a 0°C gota a gota con agitación constante durante un período de aproximadamente 2 horas. La mezcla se agita a 0°C, hasta que todos los humos blancos de HCl desaparecen. La solución es de un color blanco lechoso.

El baño con hielo se cambia a un baño de agua, y la temperatura del baño de agua se eleva gradualmente a 60°C mediante un calentador/agitador de temperatura controlada. En este momento, se añade xilano en polvo (es decir, 100 g en este ejemplo) en porciones a la solución de la mezcla (véase la etapa 3 en la figura 9) a través del tubo lateral del matraz mediante el embudo de cuello largo para dar una suspensión parduzca homogénea. La mezcla de reacción se eleva a 75°C y se mantiene a esta temperatura durante aproximadamente 4 horas (véase la etapa 4 en la figura 9), tras lo cual se retira el baño de agua.

La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente (véase la etapa 5 en la figura 9) con agitación continua, y a continuación el xilano sulfatado se precipita por adición a (en este ejemplo) 6.000 ml de metanol preenfriado (en un baño de hielo) con agitación vigorosa (véase la etapa 6 en la figura 9). El precipitado es una sal de piridinio blanca, amorfa, soluble en agua, y el sobrenadante es un líquido de color marrón. El precipitado se recoge (véase la etapa 7 en la figura 9) en este ejemplo en un embudo Buchner con la bomba de agua, el residuo se lava con metanol (x 3 veces) para eliminar la adhesión de reactivo de sulfatación que no ha reaccionado.

2.2. Conversión de la sal de piridinio en la sal de sodio, como un ejemplo de configuración de la realización preferida

Con referencia a la etapa 8 en la figura 9, el residuo se disolvió en agua destilada (en este ejemplo, 1,5 l) con agitación vigorosa, y se ajusta el pH entre 3,8 y 10 (véase la etapa 9 en la figura 9) con NaOH 6 N (aproximadamente 230-250 ml, en este ejemplo) con el fin de convertir el sulfato de piridinio-xilano en sulfato de de sodio-xilano.

Para asegurar que el pH de la solución se mantiene en este valor, es necesario comprobar el pH justo antes de la evaporación rotatoria (etapa 10 en la figura 9). Una vez que la solución se hace girar y se evapora a sequedad (color rojo-marrón) el residuo sólido (esencialmente libre de piridina y DMF) se redissuelve en agua destilada (véase la etapa 11 en la figura 9) y el pH de la solución se ajusta a 7.

En configuraciones alternativas, la sal de piridinio se puede convertir en otras sales, uniéndose a cualquier otro contraión adecuado, tal como un metal inorgánico (p. ej., Na, K, Ca, Mg, Ag) o a una base orgánica, como se describe en "1.2 Conversión de la sal de piridinio en una sal de sodio, como ejemplo de configuración de la realización preferida", anteriormente.

2.3. Hidrólisis del xilano sulfatado

Con referencia a la etapa 12 en la figura 9, la solución en este ejemplo se lleva hasta 1670 ml (color marrón oscuro), es decir, 50 X por 3 ml, (X = xilano original en gramos). Esta solución se transfiere a un matraz redondo de 3 l en este ejemplo y equipado con un condensador de reflujo y manta de calentamiento y se lleva a ebullición suave. Se añade H₂SO₄ 5 M (25 ml en este ejemplo) a la solución de éster sulfatado de xilano a través del tubo condensador, con agitación, dejado aproximadamente 35 minutos a 100°C (véase la etapa 13 en la figura 9). El tiempo es un parámetro importante, ya que determina el peso molecular del producto final. Se necesitará determinar independientemente el tiempo para cada tamaño de lote. A continuación la solución se enfría rápidamente vertiéndola en un baño de hielo. El pH de la solución enfriada es de 0,9-1,0. El pH se ajusta a un pH de 7 (véase la etapa 14 en la figura 9), en este ejemplo, tomando 50-55 ml de solución de NaOH 6 N.

2.4. Diálisis y secado del producto de hidrólisis

A fin de mantener un caudal razonable de penetración a una presión segura y constante [es decir, 1,0-1,2 atm (15-20 psi)], la concentración de la solución de hidrólisis debe mantenerse a menos de 3-4% y preferiblemente a 1,5-2%. Esto proporciona un aumento de la tasa de recogida de filtrado, más que compensando el aumento del volumen de partida.

Con referencia a las etapas 15 y 16 en la figura 9, esta solución necesita ser filtrada utilizando un prefiltro y una membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm, para evitar el bloqueo de la membrana de diálisis. La solución se sometió a ultrafiltración utilizando, por ejemplo, un cartucho Prep/sale-TFF 6ft2 (Millipore) que tiene un PM umbral nominal de 1.000 Daltons, con agua destilada (preferiblemente agua purificada BP). La presión de operación [es decir, 1,0-1,2 atm (15-20 psi)] se mantiene con una bomba Amicon LP-1A por ejemplo. Después de 5-6 x volumen de agua destilada (en relación con el volumen de la solución de procesamiento) se ha recogido como permeado, la solución retenida (incluidos

los lavados del sistema con, en este ejemplo, 500 a 600 ml de agua) se seca por evaporación rotatoria generalmente a 50°C a presión reducida (véase la etapa 17 en la figura 9). El producto final (en este ejemplo, 160-180 g) se muele y pone en el desecador con P₂O₅ al vacío.

2.5. Resulfatación de xilano sulfatado

5 Haciendo referencia a la etapa 18 en la figura 9, el segundo método de sulfatación es similar al primero, con una ligera modificación. Una mezcla de volúmenes iguales de piridina y DMF se agita mecánicamente. En este ejemplo, 650 ml de piridina y 650 ml de DMF se añaden a un matraz de fondo redondo de dos bocas de 5.000 ml provisto de un agitador mecánico, un embudo de decantación de 250 ml equipado con un tubo de gel de sílice, ajustado en un baño de hielo. Cuando la temperatura del disolvente mixto está cerca de 0°C, 167 ml (en este ejemplo) de ácido clorosulfónico se deja caer lentamente en la solución durante aproximadamente 2 horas con agitación continua y enfriamiento para mantener la temperatura cerca de 0°C.

15 Después de la adición de ácido clorosulfónico (en este ejemplo), la mezcla de reacción se agita más (en este ejemplo, durante 30 minutos más). El baño de hielo se cambia a agua, y la temperatura se eleva a 60°C durante 1,2 a 1,5 horas. Se añade xilano sulfatado (en este ejemplo, 170 a 240 g) al disolvente de la reacción por el tubo lateral del matraz redondo. La temperatura se eleva aún más a 75°C, y luego se mantiene a esta temperatura con agitación durante aproximadamente 1 hora. Se apaga el calentador y se drena el agua caliente o se sifona del baño de agua. Se deja enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente con agitación. La solución enfriada se vierte en metanol (en este ejemplo, 6.000 ml) con agitación vigorosa. El precipitado es un sólido de color blanco.

2.6. Conversión a la sal de sodio (como ejemplo de configuración) y eliminación de piridina y DMF

20 Haciendo referencia a la etapa 19 en la figura 9, el precipitado se disuelve de nuevo en agua destilada (en este ejemplo, 1 l), siendo el pH 4,1 a 4,2. El pH de la solución se ajusta a 10. En este ejemplo, se toman aproximadamente 120 a 140 ml de solución de NaOH 6 N. Esta solución se evaporó con rotación a sequedad a 50°C (de color gris-blanco). El residuo se disuelve en agua destilada (en este ejemplo, 300 ml de agua destilada) y se vierte en metanol (en este ejemplo, 2.500 a 3.000 ml) con agitación vigorosa (véase la etapa 20 en la figura 9). En esta etapa, debido a la presencia de una sal inorgánica en gran cantidad, el precipitado puede formar fácilmente grumos. El precipitado se recoge por filtración bajo succión de la bomba de agua.

Como se describe en "1.2 Conversión de la sal de piridinio en una sal de sodio, como ejemplo de configuración de la realización preferida", configuraciones alternativas incluyen la sal preparada con cualquier otro contraión adecuado, tal como un metal inorgánico (p. ej., Na, K, Ca, Mg, Ag) o una base orgánica.

30 2.7. Decoloración de xilano resulfatado utilizando un cartucho de carbón

El precipitado anterior se disuelve de nuevo en agua destilada (en este ejemplo, en 2 l de agua destilada). La solución es de color marrón oscuro. El color puede eliminarse por circulación repetida de la solución a través de un cartucho de carbono (p. ej., un filtro de agua APII de Aqua-Pure) a temperatura ambiente durante 2 horas (véase la etapa 21 en la figura 9). La solución final se vuelve de color amarillo claro y se evapora con rotación a sequedad.

35 Pueden experimentarse pérdidas considerables (hasta del 30%) de sulfato de xilano "bueno" si se utiliza un cartucho de carbón con baja selectividad. Es preferible utilizar una buena calidad de carbón activado en polvo, en un proceso por lotes. La cantidad de carbono en relación con el sulfato de xilano es de aproximadamente 20% peso/peso.

Alternativamente, la decoloración puede tener lugar durante el fraccionamiento, como se describe a continuación.

2.8. Diálisis y secado

40 Haciendo referencia a la etapa 22 en la figura 9, la solución decolorada se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm con un prefiltro. El filtrado se desala a continuación como se describió anteriormente (p. ej., utilizando un sistema de ultrafiltración Millipore provisto de un cartucho Prep/Scale™-TFF (umbral de PM 1.000) utilizando agua purificada BP. La presión de operación [0,68-1,36 atm (10-20 psi)] se mantiene con una bomba peristáltica Amicon LP-1A). Después de recoger 10 × volúmenes de la solución de permeado, la solución del proceso se concentra en el sistema de ultrafiltración tanto como sea posible (por ejemplo, 3-4%). A continuación se seca la solución final, por ejemplo, por evaporación rotatoria (véase la etapa 23 en la figura 9).

3. Fraccionamiento selectivo para producir un GXS muy sulfatado, de bajo PM y espectro restringido

50 Para la realización de GXS fraccionado, después de la finalización del método de doble sulfatación descrito anteriormente, los cristales resultantes se fraccionan con un disolvente orgánico tal como etanol utilizando el procedimiento descrito a continuación. El solicitante se refiere a este procedimiento de fraccionamiento como "fraccionamiento selectivo", ya que utiliza la carga de la molécula GXS muy sulfatada para "enfocar" el proceso de fraccionamiento de modo que la precipitación se produce utilizando la carga de la molécula, además del peso molecular.

Utilizando el método de fraccionamiento selectivo (descrito a continuación), es posible producir el compuesto GXS con un peso molecular siempre bajo y dentro de un espectro restringido de intervalos de peso, de 1.000 a 4.000.

El método de fraccionamiento selectivo es el siguiente:

- 5 (a) A raíz de la etapa 23 en la figura 9, los cristales se disuelven en H₂O para preparar una solución al 10%. En este ejemplo se disuelven 100 g de sólidos en 1.000 ml de solución total. Esta solución tiene un pH de alrededor de 5,0, sin ajustar.
- (b) El pH de la solución se ajusta a alrededor de 9,0 mediante la adición de NaOH. El ajuste del pH afecta a la carga de la molécula GXS y por lo tanto a su solubilidad en mezclas de agua/disolvente orgánico.
- 10 (c) Después de ajustar el pH a alrededor de 9, el disolvente orgánico (en este ejemplo, etanol) se añade gota a gota (mientras se agita) para preparar una concentración total de 40% en volumen. Se añade etanol porque las fracciones de alto peso molecular son los menos solubles y la adición de un disolvente orgánico tal como etanol afectará a su solubilidad.
- (d) Las fracciones de alto peso molecular serán las primeras en precipitar en la solución. La primera fracción se elimina y luego se centrifuga la solución completa.
- 15 (e) Se añade disolvente orgánico (en este ejemplo, etanol) al sobrenadante (que todavía incluye el GXS de menor PM) de la misma manera se prepara una concentración total de 45% en volumen.
- (f) Se retira el precipitante (segunda fracción) y la solución se centrifuga de nuevo como se describe en la etapa (d) anterior.
- 20 (g) Se repiten las etapas (d) a (f), aumentando la concentración de etanol en un 5% en cada ciclo, hasta una concentración de 70% en el ciclo final.
- (h) Para cada fracción, el precipitado se aclara aún más utilizando más etanol para eliminar el agua tanto como sea posible de los cristales.

25 La figura 10 es una tabla que presenta datos de las muestras obtenidos de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de GXS producido utilizando el método de doble sulfatación descrito anteriormente. La segunda columna de la izquierda es de datos ilustrativos obtenidos a partir de un lote de GXS no fraccionado; las columnas restantes son para GXS fraccionado, utilizando el método de fraccionamiento selectivo descrito anteriormente.

30 Las figuras 11-18 muestran cromatogramas de los datos de la figura 10 - a saber, las SEC ilustrativas de GSX no fraccionado y fraccionado. Cada cromatograma (figuras 11-18) muestra el índice de refracción (IR) frente al tiempo de retención (TR). La fase móvil utilizada fue agua pura con azida de sodio al 0,05%, con un caudal de 0,5 ml por minuto. Se utilizaron en el experimento SEC dos Phenomenex Biosep S2000 conectados en serie a una temperatura de 30°C. El instrumento era un Agilent 1100 con un detector de IR, calibrado con patrones de sulfonato de poliestireno. La concentración de la muestra de GXS fue de 5 mg/ml.

Haciendo referencia a la segunda columna de la tabla en la figura 10 y a la figura 11, el GXS no fraccionado tenía una sulfatación media de 18% con un PM relativo máximo de 3.294, siendo el modo PM 2.759.

35 La primera fracción (obtenida utilizando fraccionamiento en etanol con etanol en una concentración de 40%), dio un rendimiento con una sulfatación promedio de 18,1%. Se puede observar a partir del perfil % en peso en la tabla en la figura 10 que la primera fracción elimina las moléculas de PM más alto (22% de esta fracción tiene un PM relativo mayor que 10.000). El perfil de % en peso de esta fracción está ilustrado en el cromatograma en la figura 12.

40 La segunda fracción (en 45% de etanol), dio un rendimiento con una sulfatación media de 18,2%, siendo el modo PM 2.000-3.000 (véase la figura 13 y en la tabla en la figura 10). La tercera fracción (en 50% de etanol), dio un rendimiento con una sulfatación media de 18,5%, siendo también el modo PM 2.000-3.000 (véase la figura 14 y la tabla en la figura 10). La cuarta fracción (en 55% de etanol), dio un rendimiento con una sulfatación media de 18,4%, siendo el modo PM también 2.000-3.000 (véase la figura 15 y la tabla en la figura 10). La quinta fracción (en 60% de etanol), dio un rendimiento con una sulfatación media de 17,8%, siendo el modo PM 1.500-2.000 (véase la figura 16 y la tabla en la figura 10). La sexta fracción (en 65% de etanol), dio un rendimiento con una sulfatación media de 16,9%, siendo el modo PM también 1.500-2.000 (véase la figura 17 y la tabla en la figura 10). La séptima fracción (en 70% de etanol), dio un rendimiento con una sulfatación media de 17,1%, siendo el modo PM también inferior a 1.500 (véase la figura 18 y la tabla en la figura 10).

50 Estos datos indican que el segundo al cuarto ciclo de fraccionamiento dieron el mayor rendimiento de bajo PM, moléculas de GXS completamente sulfatadas. Sin embargo, el rendimiento puede verse afectado por el Pm de GXS no fraccionado de partida. Por lo tanto, el control estricto del peso molecular de GXS y la optimización de los parámetros de

fabricación son cruciales para obtener un alto rendimiento, el nivel deseable de sulfatación y el intervalo de peso molecular.

La realización preferida es una mezcla de moléculas de GXS que contiene al menos 10% de moléculas completamente sulfatadas, presentando las siguientes características de RMN (y como se muestra en los espectros ilustrativos de RMN obtenidos a partir del segundo al cuarto ciclo de fraccionamiento de GXS visto en las figuras 19 a 21):

- 5 (a) un único pico OCH_3 de ácido glucurónico alrededor de 3,3 a 3,5 ppm;
- (b) un pico de ácido glucurónico totalmente sulfatado alrededor de 5,2 a 5,4 ppm;
- (c) al menos un pico que se correlaciona con una unidad de xilosa del terminal derecho completamente sulfatada, visto en alrededor de 5,5 a 6,0 ppm; y
- 10 (d) la aparición de un único pico marcado a alrededor de cada uno de los siguientes 5,1 ppm, 4,7 ppm, 4,4 ppm y 3,8 ppm, que se correlaciona con las unidades de xilosa completamente sulfatadas.

4. Purificación

15 El método de producción incluye una o más etapas de ultrafiltración para eliminar las impurezas que pueden afectar a la calidad del producto final. La cromatografía líquida de alta resolución del compuesto de la invención, GXS, en comparación con las moléculas PPS de la técnica anterior demuestra una ausencia de picos en la cola del cromatograma, lo que indica la eliminación de impurezas de bajo peso molecular, tales como productos de degradación. Esto se logra ya sea mediante ultrafiltración o mediante fraccionamiento con disolventes orgánicos, como se describió anteriormente.

20 5. La eliminación de color por fraccionamiento

La coloración oscura del producto final indica un cambio de la estructura química. Por lo tanto, la eliminación del color es importante como una forma para la eliminación de productos de degradación descoloridos.

25 La eliminación del color se puede conseguir por perfusión con peróxido de hidrógeno o de cloro, como se describe en la etapa 1.3 anterior, o con carbón vegetal como se describe en la etapa 2.7. Estos métodos de eliminación de color han demostrado ser la etapa más difícil en la producción.

Una realización preferida del método de producción utiliza fraccionamiento selectivo con disolvente orgánico como un medio para la eliminación de color, porque las fracciones de peso molecular más bajo son de aspecto más oscuro. Esto tiene las ventajas de que no intervienen aditivos y de minimizar las etapas y costes en la producción.

Método de uso de GXS: una realización preferida

30 El GXS muy sulfatado, de bajo peso molecular de la presente invención se administra por vía parenteral en una realización preferida (como por ejemplo por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa). La administración puede ser mediante una jeringa hipodérmica tradicional o mediante un dispositivo de administración tipo pluma que permite marcar en un dial la dosis o la precarga con un cartucho de dosis única de solución acuosa de GXS.

35 Alternativamente, el GXS puede ser una formulación de liberación mantenida o controlada administrada por inyección de liberación lenta. Ésta puede tener un uso práctico en animales no tratados actualmente para determinadas condiciones (tales como inflamación de las articulaciones y otros trastornos).

40 Una realización alternativa se puede administrar por vía oral, dependiendo del cuadro clínico que se está tratando. Esto puede tener aplicación más práctica para formulaciones que contienen GXS fraccionado en lugar de GXS no fraccionado, ya que la investigación sugiere que la biodisponibilidad del compuesto fraccionado es mejor que para el compuesto no fraccionado.

La investigación sugiere que GXS ejerce una función en el tratamiento de una amplia gama de cuadros clínicos en animales, incluidos los seres humanos, animales productores de alimentos y animales de compañía (tales como felinos, caninos y equinos). La gama de enfermedades en las que GXS puede ejercer una función en el tratamiento incluyen:

- (a) enfermedades inflamatorias no infecciosas tales como la osteoartritis;
- 45 (b) isquemia;
- (c) cáncer;

(d) el control y el tratamiento de enfermedades causadas por virus, incluidos el virus de la inmunodeficiencia (tales como el VIH/SIDA o el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF)) y de la gripe equina;

(e) cistitis intersticial;

(f) enfermedad de Crohn;

5 (g) colitis ulcerosa;

(h) síndrome de Reiter;

(i) enfermedades por priones, tales como la encefalopatía espongiforme transmisible (EET), la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y su variante yatrógena en seres humanos;

10 (j) hematomas;

(k) hemorroides, congelación, quemaduras; y

(l) enfermedades multiparamétricas tales como la trombosis y la aterosclerosis.

Dosis que van desde 1 mg/kg a 10 mg/kg se han publicado en la bibliografía para el uso de PPS de la técnica anterior en diversas enfermedades. Los experimentos indican que dosis en el intervalo de alrededor de 1 mg/kg a 20 mg/kg para GXS sería de utilidad clínica en diversas enfermedades.

Por ejemplo, GXS es uno de una nueva generación de fármacos conocidos como fármacos para osteoartritis modificadores de la enfermedad (DMOAD). GXS estimula la síntesis de proteoglucanos en las células del cartílago artrítico, y reduce la pérdida de proteoglucanos en el cartílago mediante las enzimas inhibitoras que degradan el cartílago, modificando de este modo el proceso de la enfermedad. En una configuración de una realización preferida, GXS es un medio para tratar la enfermedad degenerativa de las articulaciones tal como la osteoartritis y es clínicamente eficaz en la reparación de daño en las articulaciones.

En otra configuración de la realización preferida, GXS es un medio para la profilaxis en la enfermedad degenerativa de las articulaciones tal como la osteoartritis y es clínicamente eficaz en la prevención de daño en las articulaciones.

Un método ilustrativo de uso incluye un régimen de administración de alrededor de 1 a 10 mg/kg administrados por inyección intramuscular o subcutánea, una vez a la semana durante al menos cuatro semanas.

Las aplicaciones clínicas de la realización preferida se basan en experimentos que utilizan los regímenes de administración de alrededor de 3 mg/kg/semana durante un máximo de 12 semanas en adultos y caballos pura sangre de un año. Los experimentos se han realizado utilizando GXS no fraccionado con 18% o más de sulfatación. Los estudios demuestran estadísticamente una mejora significativa en el tratamiento y prevención de la enfermedad degenerativa de las articulaciones, tal como la osteoartritis. Esto se midió evaluando las puntuaciones del cuadro clínico y los niveles de biomarcadores séricos tales como el epítipo CS846. Este epítipo es un indicador de la síntesis del proteoglucano agrecano, que se produce durante la reparación del cartílago. En caballos adultos que recibieron GXS intramuscular, un aumento en los niveles de CS846 ($p = 0,01$) se vio más de 12 semanas, lo que indica un aumento de la reparación en la articulación.

Los del año presentan niveles naturalmente altos de CS846 debido al rápido crecimiento y la remodelación constante de las articulaciones en este grupo de edad. Los del año que recibieron GXS por vía intramuscular (dosis semanales de 3 mg/kg IM como máximo hasta 12 semanas) presentaron una disminución significativa en los niveles de CS846 ($p = 0,05$) durante 12 semanas, lo que indica un efecto protector contra el daño en las articulaciones de la enfermedad de la fase 1 (inicio de osteoartritis, sin signos clínicos visibles).

La investigación de la técnica anterior en caballos utilizando PPS conocidos a una dosis de 3 mg/kg y midiendo la efectividad clínica en la osteoartritis (también midiendo los niveles de epítipo CS846) no pudo demostrar un efecto estadísticamente significativo. Esto confirma la conclusión del solicitante de que GXS (fraccionado o no fraccionado) es una entidad química diferente al PPS de la técnica anterior extraído en xilano.

Una realización preferida de una formulación de GXS

45 En una realización preferida, el ingrediente activo GXS se formula en solución acuosa para inyección parenteral (incluida intramuscular, subcutánea o intravenosa).

En una configuración, la formulación inyectable incluye un antioxidante adecuado para permitir que la formulación acuosa permanezca sustancialmente estable (es decir para resistir la decoloración y degradación) sin refrigeración. La patente WO 2007/123800 reivindica una formulación con PPS con "un antioxidante en el grupo metabisulfito, bisulfato

de sodio y ascorbato en una concentración de aproximadamente 0,02% p/v hasta alrededor de 5,0% p/v" es estable sin refrigeración. Sin embargo, los experimentos realizados por el solicitante ponen de manifiesto que muchos antioxidantes no son eficaces en GXS en una solución acuosa. Por ejemplo, el ascorbato no actúa como antioxidante, ya que en su presencia el GXS todavía se disocia y se decolora. Esta observación apoya la conclusión de que GXS es una entidad distinta al PPS de la técnica anterior extraídos en xilano.

Los experimentos realizados por el solicitante han descubierto que solamente los antioxidantes que contienen azufre son adecuados para prevenir la degradación y decoloración de una formulación con GXS inyectable a temperatura ambiente durante al menos siete meses. La tabla 2 a continuación enumera ejemplos de antioxidantes que contienen azufre que se encuentra que son adecuados para este uso.

Tabla 2. Ejemplos de antioxidantes a base de azufre que se ha encontrado que son adecuados

Denominación	Nº en CAS	Ejemplo de concentración eficaz *
Metabisulfito de sodio	7681-57-4	0,5% por peso/volumen
Bisulfito sódico ACS Reactivo	Mezcla de 7681-57-4 y 7631-90-5	0,5% por peso/volumen
Hidroximetano-Sulfonato de sodio	149-44-0	1% por peso/volumen
Formaldehído-Bisulfato de sodio	870-72-4	1% por peso/volumen

* Para conseguir una estabilidad sustancial de formulación inyectable de GXS

La realización preferida puede envasarse en forma de una formulación inyectable para administración con una jeringuilla hipodérmica tradicional o administración mediante un dispositivo de suministro de administración tipo pluma que permite marcar en un dial la dosis o la precarga con un cartucho de una sola dosis de la solución acuosa de GXS.

En una realización adicional, el GXS es una formulación de liberación mantenida o controlada administrada por inyección de liberación lenta. Esta formulación puede adaptarse a su uso en animales no actualmente bajo supervisión veterinaria regular - tal como ganado lechero, es decir, disminución de la movilidad derivada de dolor en las articulaciones puede afectar a la salud en general, incluidas la producción de leche y la reproducción. Ya que el ganado vacuno no se requiere generalmente que se mueva rápidamente, el dolor de las articulaciones y la inflamación en dichos animales pueden resultar desatendido. Esto está en contraste con los animales tales como los caballos de pura sangre o perros que necesitan máxima movilidad y están bajo asistencia muy regular de veterinarios. Una formulación de liberación lenta permitiría a los animales que pueden estar sin tratar (p. ej., en enfermedades inflamatorias de las articulaciones) a tratarse con GXS sin que sea necesario asistencia regular (por ejemplo, semanal) de un veterinario, lo que puede tener importantes implicaciones tanto para la producción como para el bienestar de los animales.

Una realización adicional es una formulación de dosis unitaria sólida de GXS para administración oral; sin embargo, como biodisponibilidad de GXS no fraccionado es escasa cuando se toma por vía oral, la dosis requerida para el efecto terapéutico puede hacer inadecuada la administración oral de GXS no fraccionado para algunas indicaciones clínicas. La investigación sugiere que la biodisponibilidad de GXS fraccionado sería mejor que la biodisponibilidad de GXS no fraccionado cuando se toma por vía oral. Por lo tanto, una formulación oral de GXS fraccionado puede tener uso clínico más amplio que las formulaciones orales de GXS no fraccionado o de ésteres de sulfato no fraccionadas de la técnica anterior, tal como PPS (que están indicados actualmente para la cistitis intersticial en los seres humanos).

Ejemplos de configuraciones de la realización preferida (GXS en solución acuosa para administración parenteral) pueden comprender GXS en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg/ml.

A modo de ejemplo, para una solución de 100 mg/ml con un tamaño de envase 10 ml, la formulación puede incluir:

- (a) alrededor de 100 mg de GXS;
- (b) alrededor de 10 mg de alcohol bencílico como conservante
- (c) alrededor de 0,8 mg de ácido cítrico anhidro como tampón;
- (d) alrededor de 15 mg de citrato trisódico deshidratado como tampón;
- (e) a 1,0 ml de agua para inyectables como vehículo.

Un segundo ejemplo de configuración de la realización preferida es una solución de 250 mg/ml con un tamaño de envase de 6 ml. La formulación puede incluir:

- (a) alrededor de 250 mg de GXS;
- (b) alrededor de 10 mg de alcohol bencílico como conservante
- 5 (c) alrededor de 2 mg de ácido cítrico anhidro como tampón;
- (d) alrededor de 38 mg de citrato trisódico deshidratado como tampón;
- (e) a 1,0 ml de agua para inyectables como el vehículo.

10 Para las formulaciones a temperatura ambiente de las configuraciones ilustrativas anteriores, se añade un antioxidante adecuado en una concentración eficaz, cuyos ejemplos se proporcionan en la Tabla 2. Opcionalmente, el espacio de cabeza en las formulaciones a temperatura ambiente también puede reemplazarse con nitrógeno.

Una realización alternativa: GXS como antioxidante nuevo o mejorado

15 Los experimentos realizados por el solicitante demuestran que GXS se oxida más fácilmente que algunos antioxidantes comunes (BHA, BHT, ácido lipoico, ácido glutámico, ácido gentísico, metilsulfonilmetano, ácido málico, ácido nicotínico, ascorbatos). Esta observación indica que GXS tiene excelentes propiedades antioxidantes por sí mismo. La bibliografía científica indica que el OSO₃ en la posición 1 (tal como en la unidad de xilosa del terminal derecho en GXS) es generalmente muy lábil, por lo tanto GXS se oxidaría con preferencia al ácido ascórbico (o a los demás antioxidantes mencionados anteriormente).

20 Esta conclusión está apoyada por la observación (expuesta anteriormente) que solamente los antioxidantes que contienen azufre son adecuados para prevenir la degradación de GXS, por que el azufre en el antioxidante se oxida preferentemente a OSO₃ del terminal derecho u otras unidades de carbohidrato en GXS.

En una realización preferida, GXS es adecuado para su uso como antioxidante, como por ejemplo en preparaciones para uso clínico.

25 Aunque la invención se ha descrito con referencia a ejemplos específicos, los expertos en la técnica apreciarán que la invención puede realizarse de muchas otras formas diferentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de moléculas de glucano sulfatado, en donde dichas moléculas comprenden:

(A) Una o más unidades de beta-D-xilosa lineales conjugadas en 1-4; y

(B) al menos una unidad de ácido 4-O-metil-β-D-glucurónico unido a un carbono 2 de cada ocho a diez unidades de glucosa (por término medio),

método que comprende:

(a) llevar a cabo la sulfatación de xilano, mediante reacción con:

(i) complejo de ácido clorosulfónico y piridina en DMF;

(ii) complejo piridina SO₃ en DMF; o

(iii) una mezcla de (i) y (ii) anterior, para producir sulfato de piridinio xilano;

(b) sustituir piridinio, con un contraión para formar una sal de sulfato de xilano sin piridinio; seguido de eliminación de piridina y DMF;

(c) llevar a cabo la hidrólisis ácida de la sal de sulfato de xilano sin piridinio para ajustar su peso molecular relativo final;

(d) llevar a cabo la ultrafiltración de la sal de sulfato de xilano sin piridinio para eliminar impurezas orgánicas y productos de degradación ; y

(e) llevar a cabo al menos un ciclo de resulfatación/hidrólisis de la sal de sulfato de xilano sin piridinio, seguido de la conversión a un sales de sodio y eliminación de dicha piridina y DMF para formar un precipitado no fraccionado.

2. El método de la la reivindicación 1, en donde el contraión es un metal inorgánico o una base orgánica.

3. Un método para la producción de una mezcla que comprende moléculas de glucano sulfatado en donde dichas moléculas comprenden:

(A) una o más unidades lineales de β-D-xilosa conjugadas en 1-4; y

(B) al menos una unidad de ácido 4-O-metil-β-D-glucurónico unida al carbono 2 de cada ocho a diez unidades de xilosa (por término medio),

método que comprende:

(a) hidrólisis, en donde la hidrólisis se lleva a cabo al menos una vez durante el método y en donde la hidrólisis se lleva a cabo en:

(i) xilano;

(ii) sulfato de xilano; o

(iii) uno de los dos anteriores en una etapa de hidrólisis por separado; y

(b) sulfatación, en donde la sulfatación se lleva a cabo al menos dos veces durante el procedimiento y en donde la sulfatación se lleva a cabo en:

(i) xilano;

(ii) sulfato de xilano; o

(iii) uno de los dos anteriores en una etapa de sulfatación por separado.

4. Una mezcla obtenida por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las moléculas de glucano sulfatado tienen un peso molecular comprendido en el intervalo entre 1.000 y 6.000.

5. La mezcla según la reivindicación 4, en donde las moléculas de glucano sulfatado tienen un peso molecular comprendido en el intervalo entre 1.000 y 4.000.

6. Una formulación terapéutica para administración parenteral que comprende moléculas de glucano sulfatado en solución acuosa preparadas según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. La formulación terapéutica de la reivindicación 6, que es una formulación de liberación controlada.
8. La formulación terapéutica de la reivindicación 6 o 7 para su utilización en el tratamiento de osteoartritis.

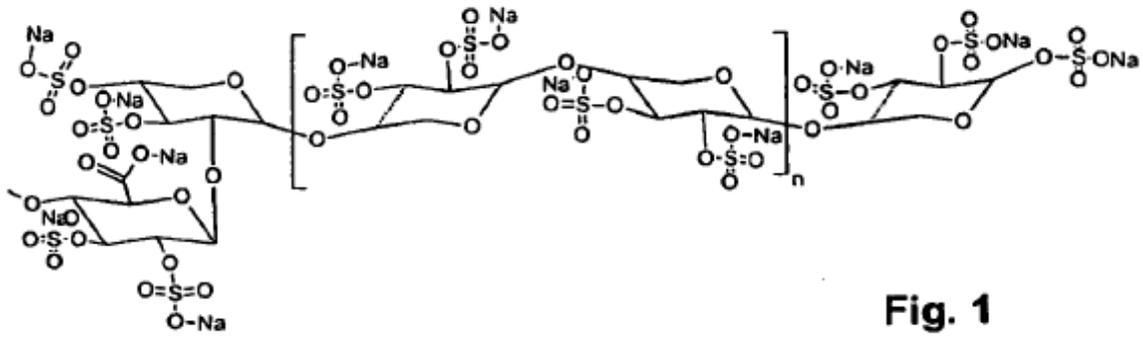


Fig. 1

Fig. 2

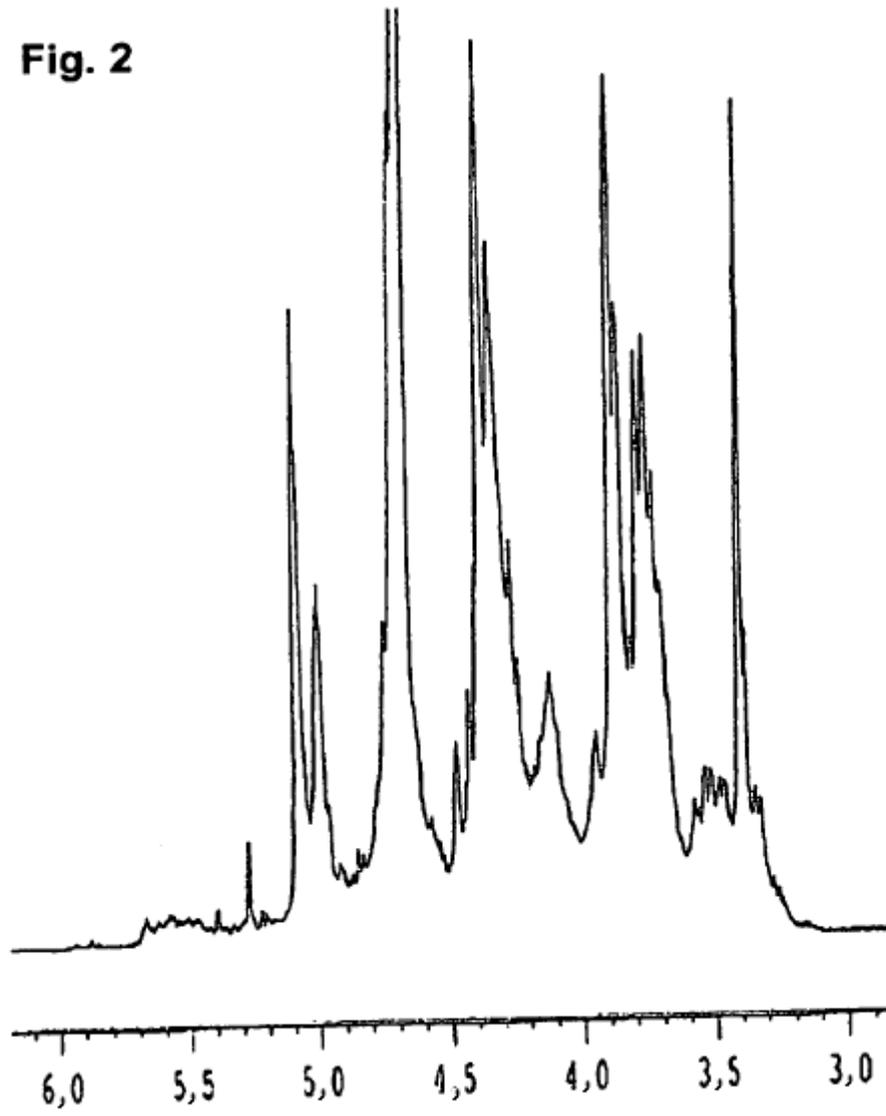


Fig. 3

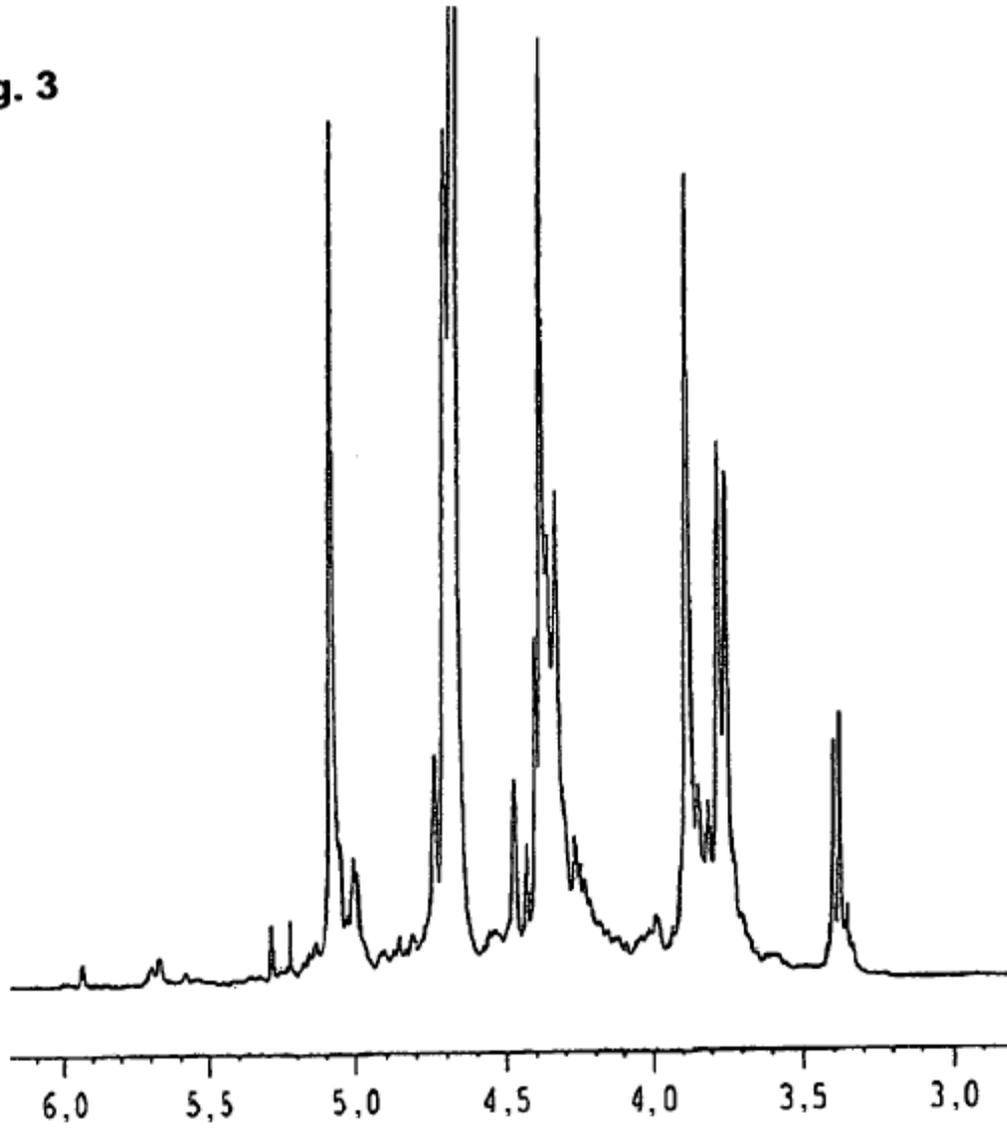


Fig. 4

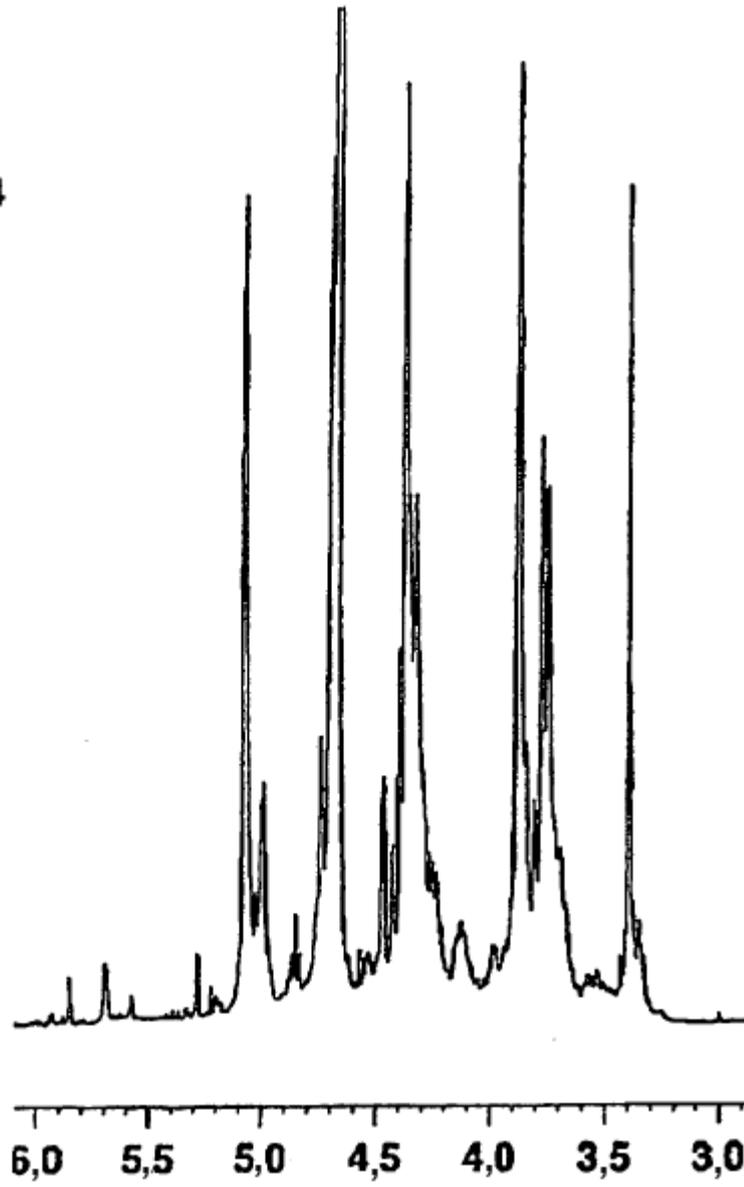


Fig. 5

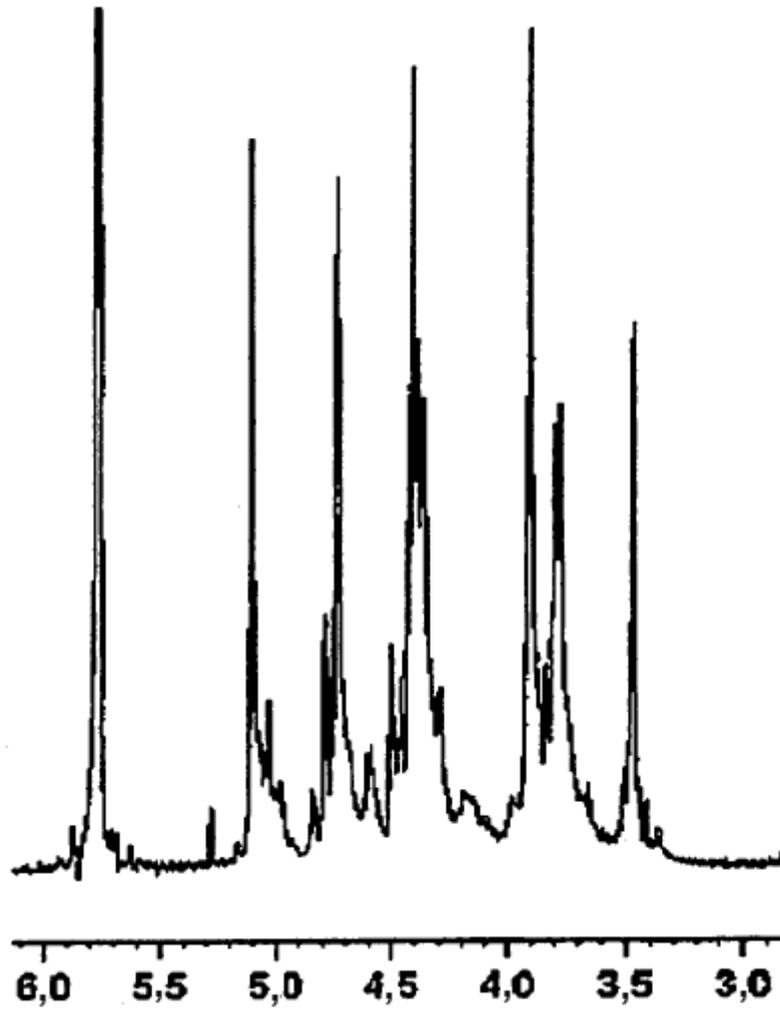


Fig. 6

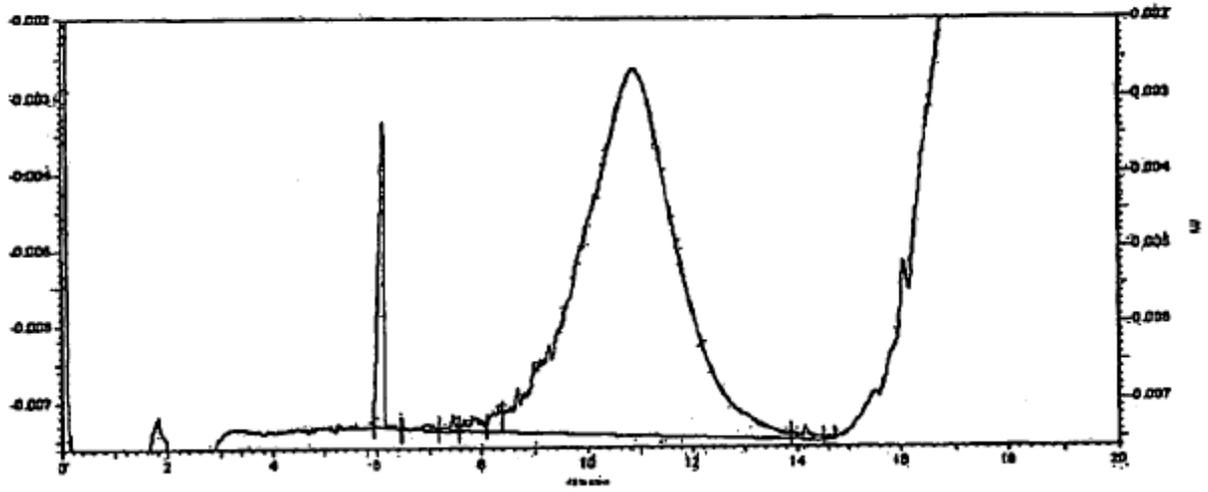


Fig. 7

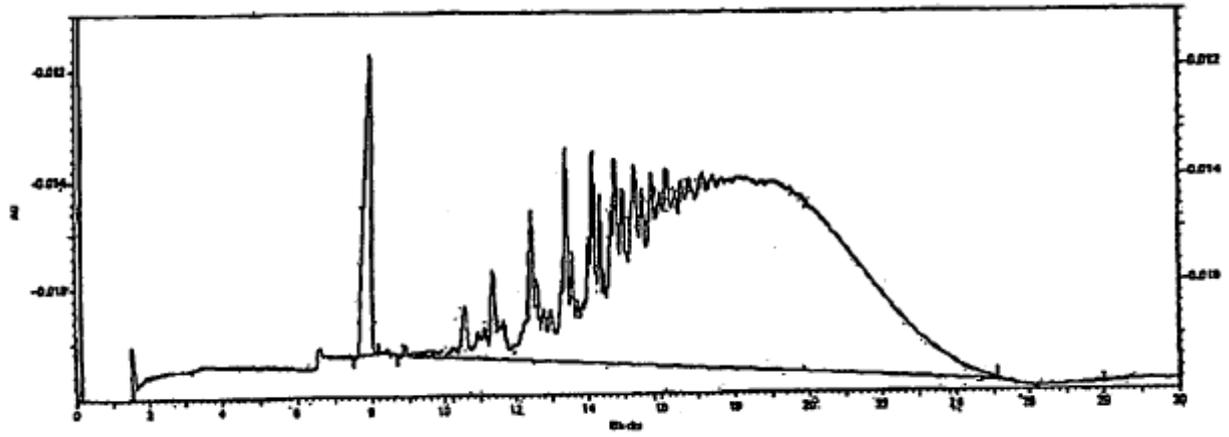
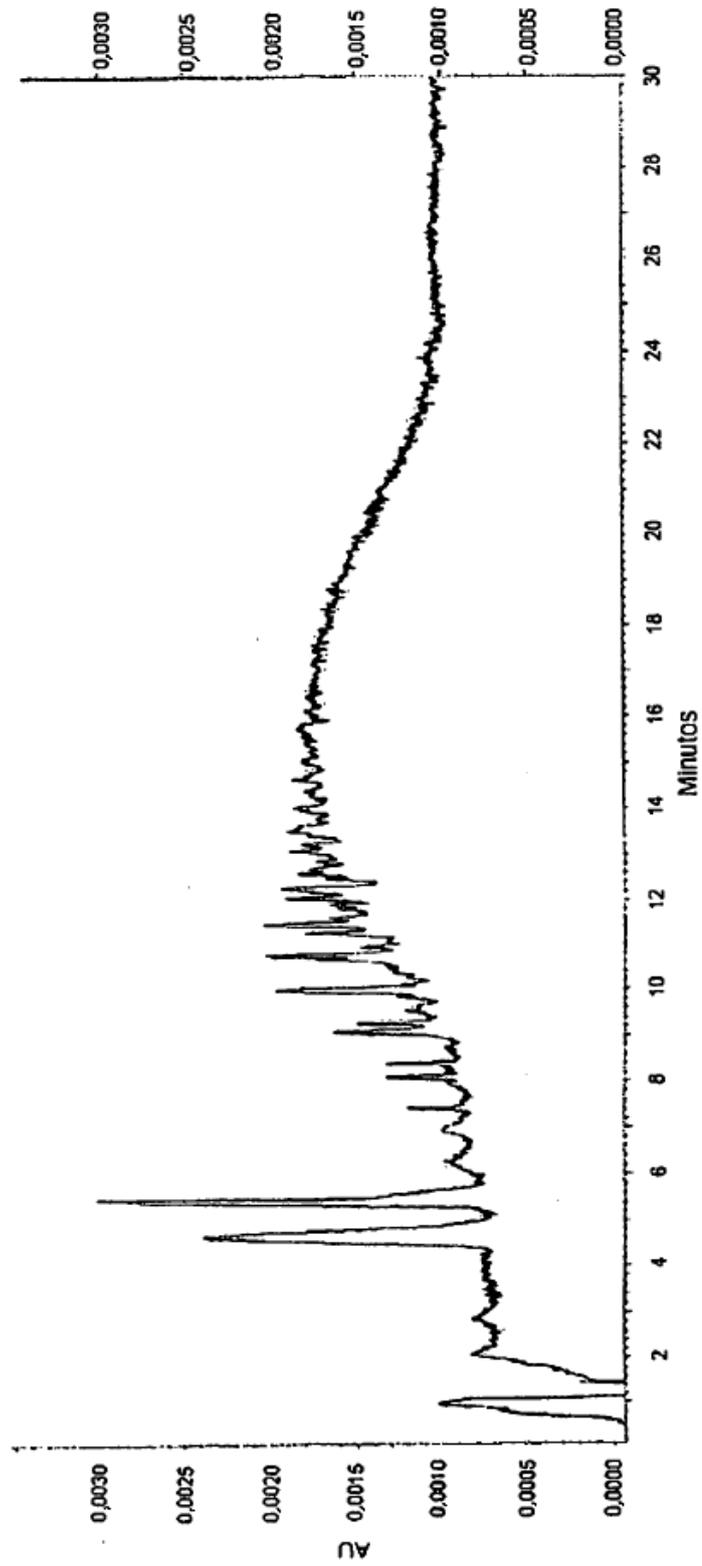


Fig. 8



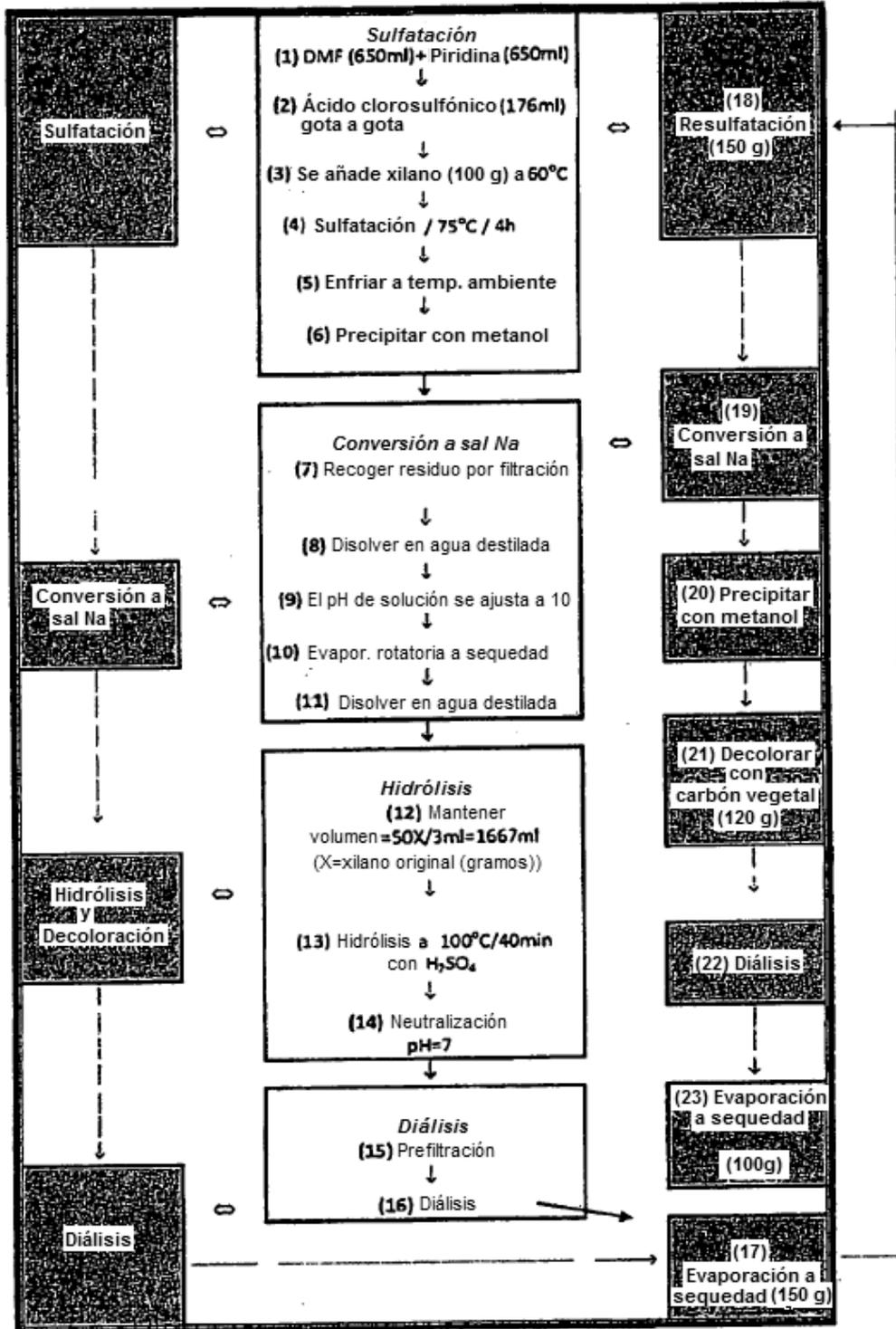


Fig. 9

ES 2 565 641 T3

	No fraccionado	0-40%	40-45	45-50	50-55	55-60	60-65	65-70
% S	18	18,1	18,2	18,5	18,4	17,8	16,9	17,1
Rendimiento	% en peso	9,2	31,7	13,7	13,6	9,4	7,1	5,8
Pm	3.294	7.342	4.204	2.654	2.160	1.829	1.615	1.528
		% en peso						
> 10 k	4,67	22	5,17	1,35	0,62	0,34	0,13	0,03
9-10 k	0,062	3,5	1,36	0,4	0,18	0,12	0,05	0,01
8-9 k	0,89	4,48	1,96	0,61	0,27	0,18	0,08	0,02
7-8 k	1,35	5,84	2,98	1	0,45	0,29	0,14	0,03
6-7 k	2,26	7,78	4,83	1,81	0,82	0,52	0,27	0,06
5-6 k	3,94	10,03	8,02	3,54	1,69	1	0,58	0,15
4-5 k	7,22	12,08	13,3	7,56	4,01	2,21	1,39	0,46
3-4 k	13,74	13,22	21	17,67	11,77	6,63	4,18	2
2-3 k	27,59	13,29	26,5	38,5	38,23	29,93	20,76	15,14
1,5-2 k	22,29	5,23	10,4	20,2	30,49	38,88	38,56	38,72
< 1,5 k	15,42	2,53	4,51	7,37	11,47	19,91	33,87	43,39

Fig. 10

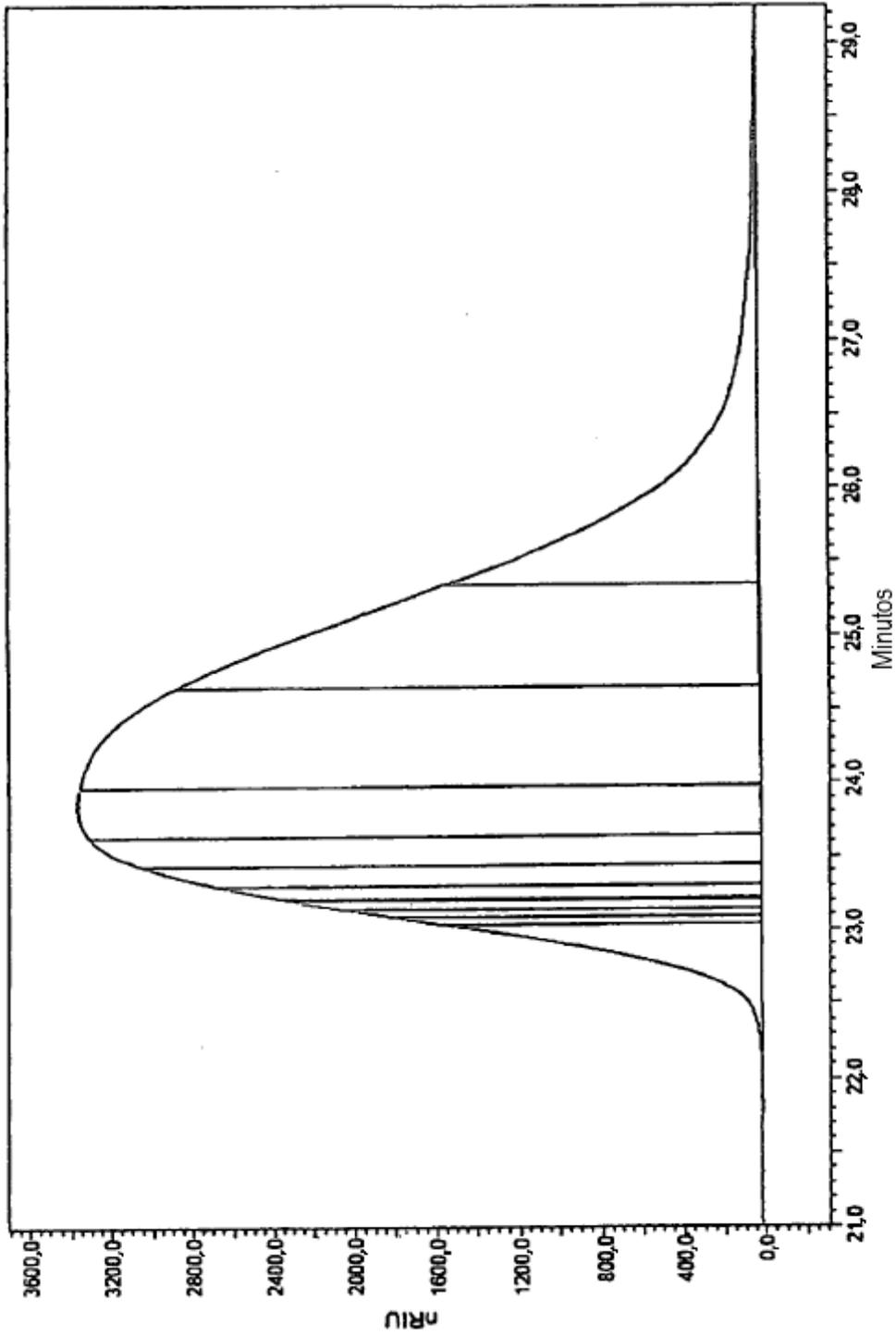


Fig. 11 _____ Nombre de muestra **07019** no fraccionada

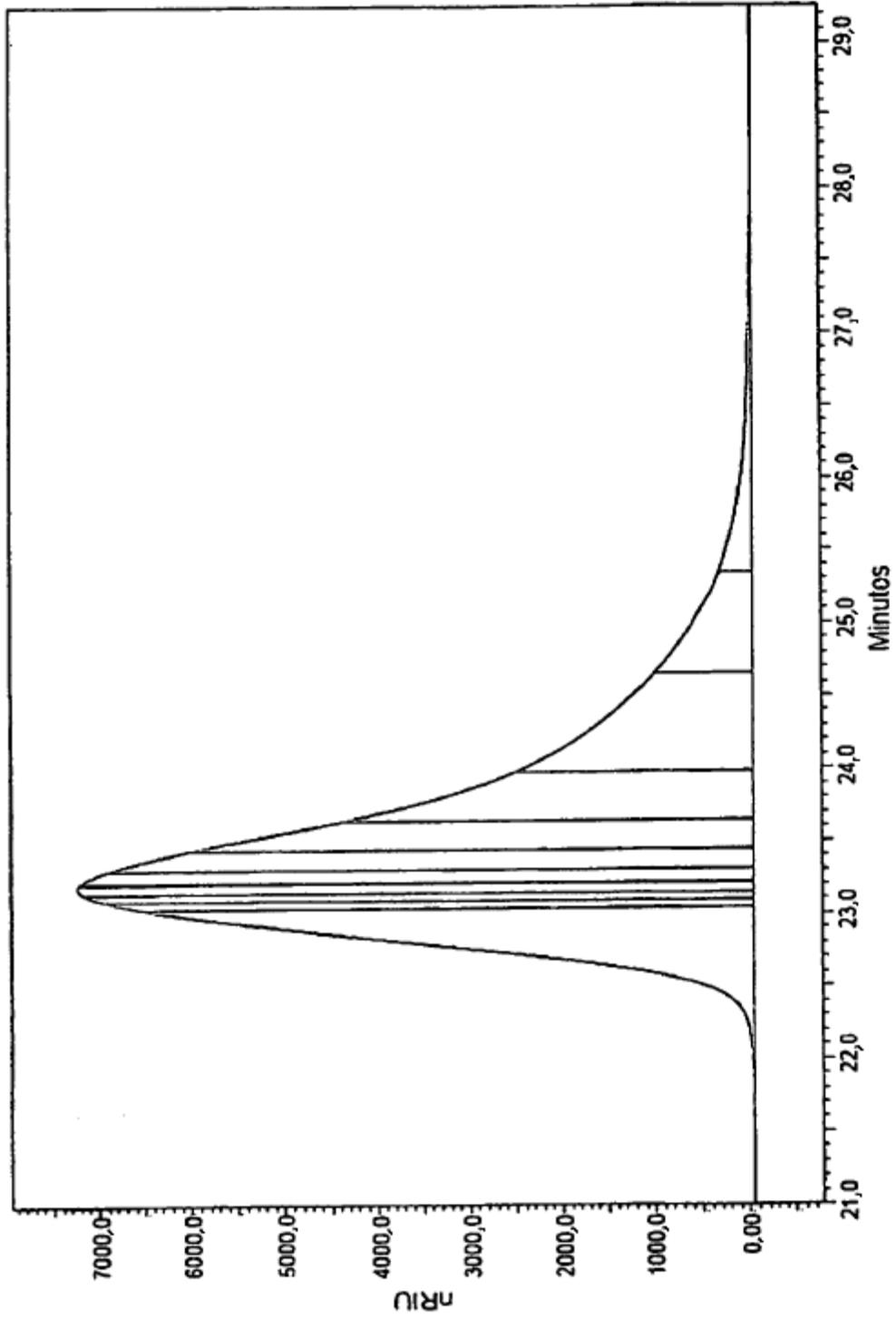


Fig. 12

— Nombre de la muestra BASE_07019_0 a 40

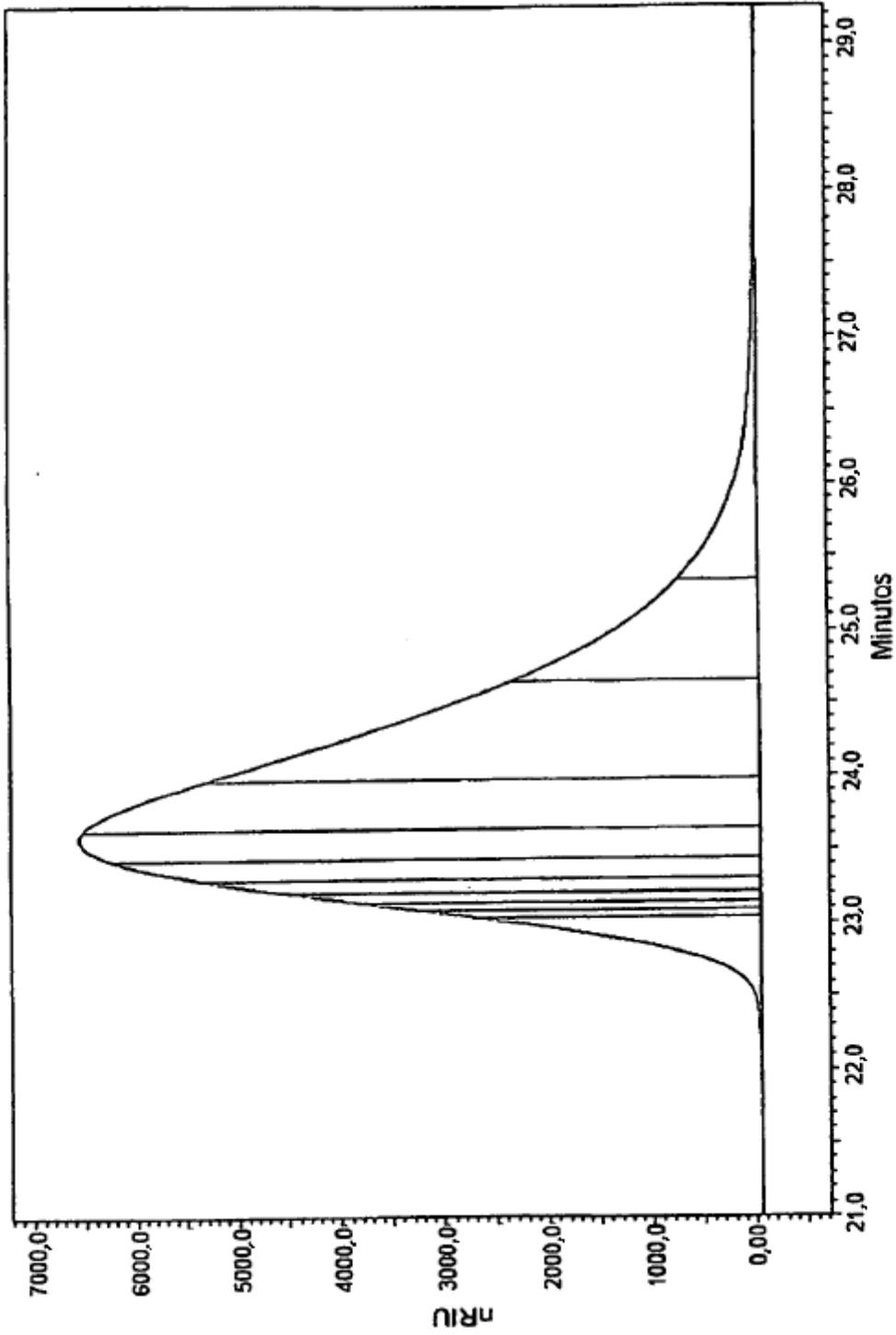


Fig. 13

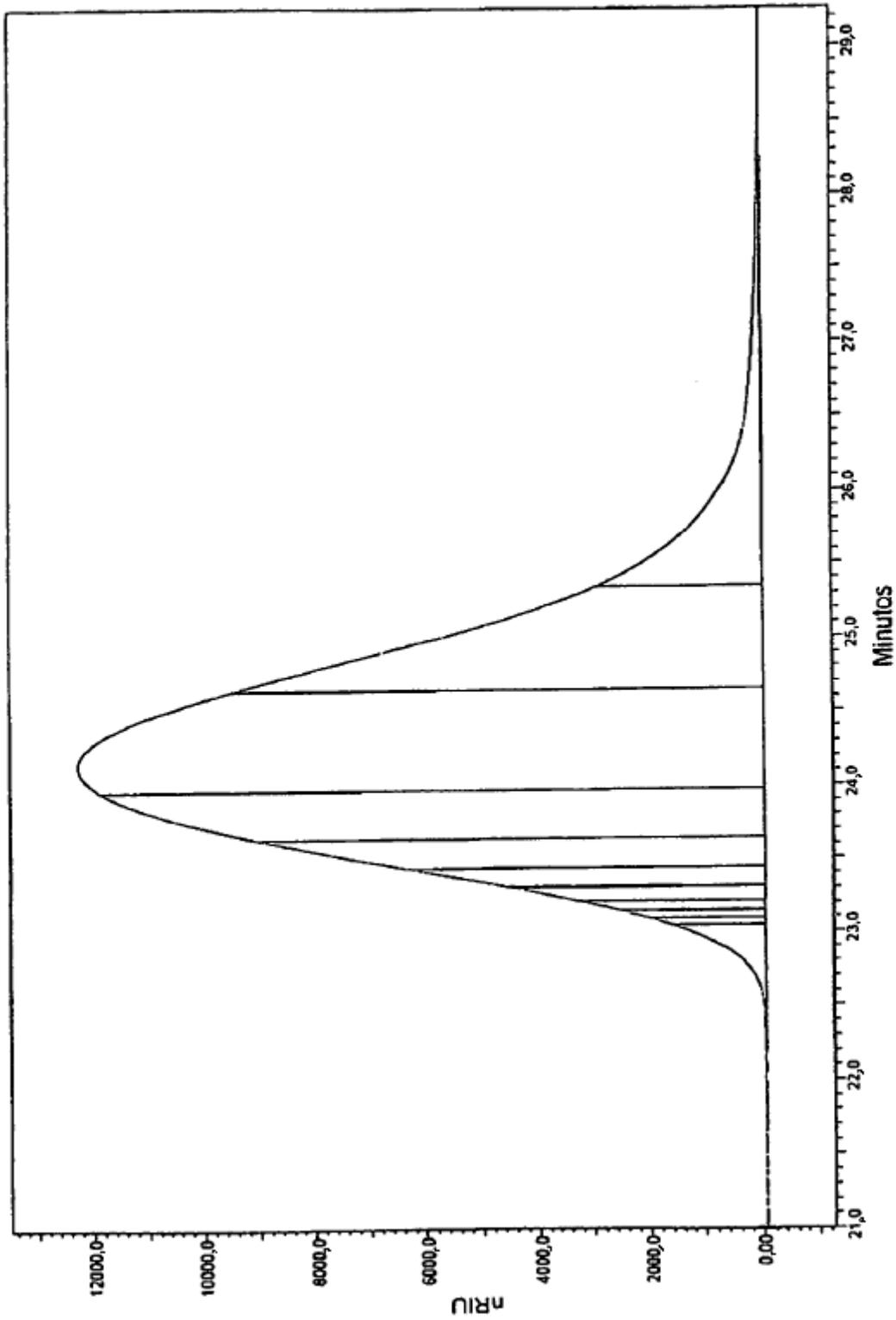


Fig. 14

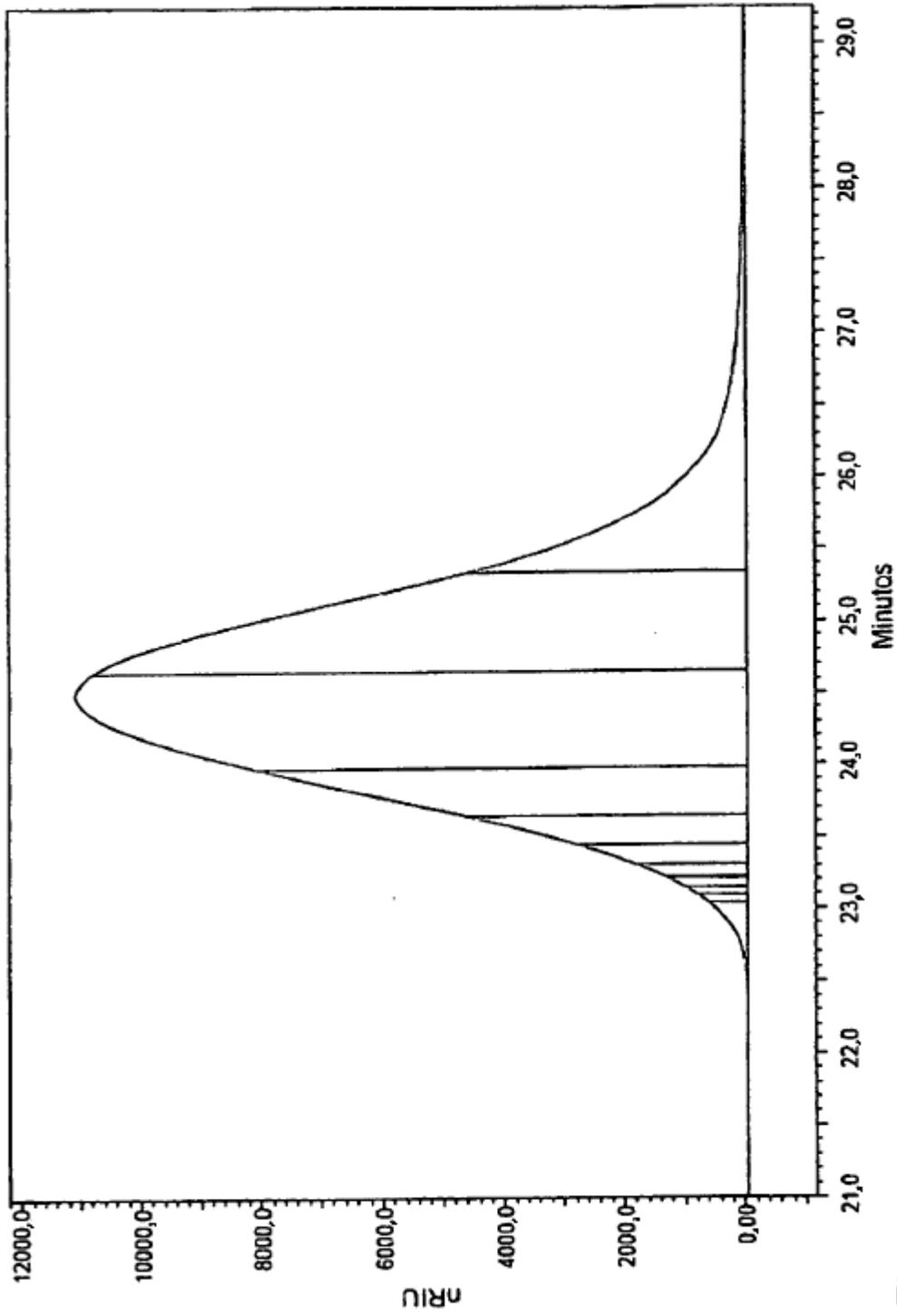


Fig. 15

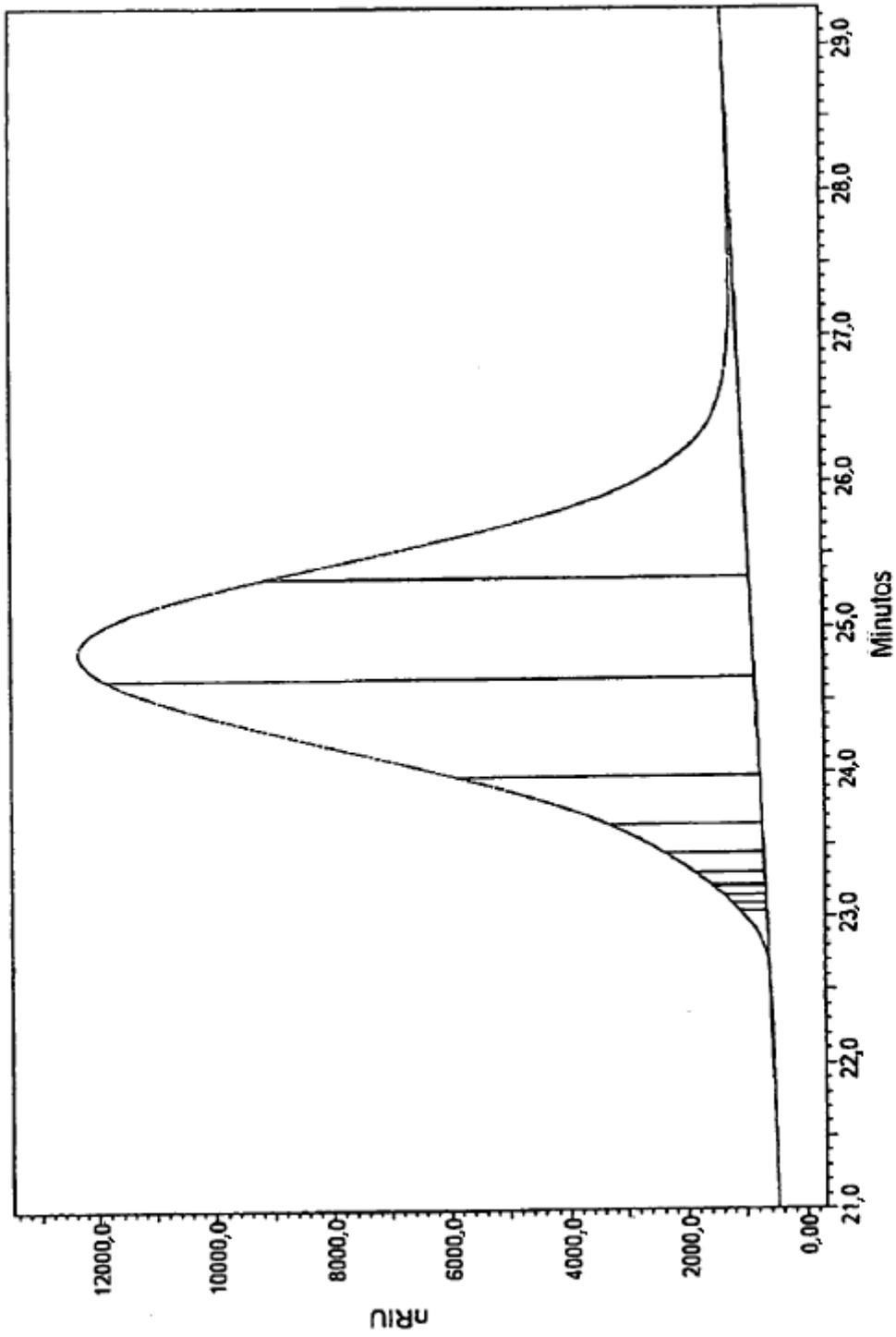


Fig. 16

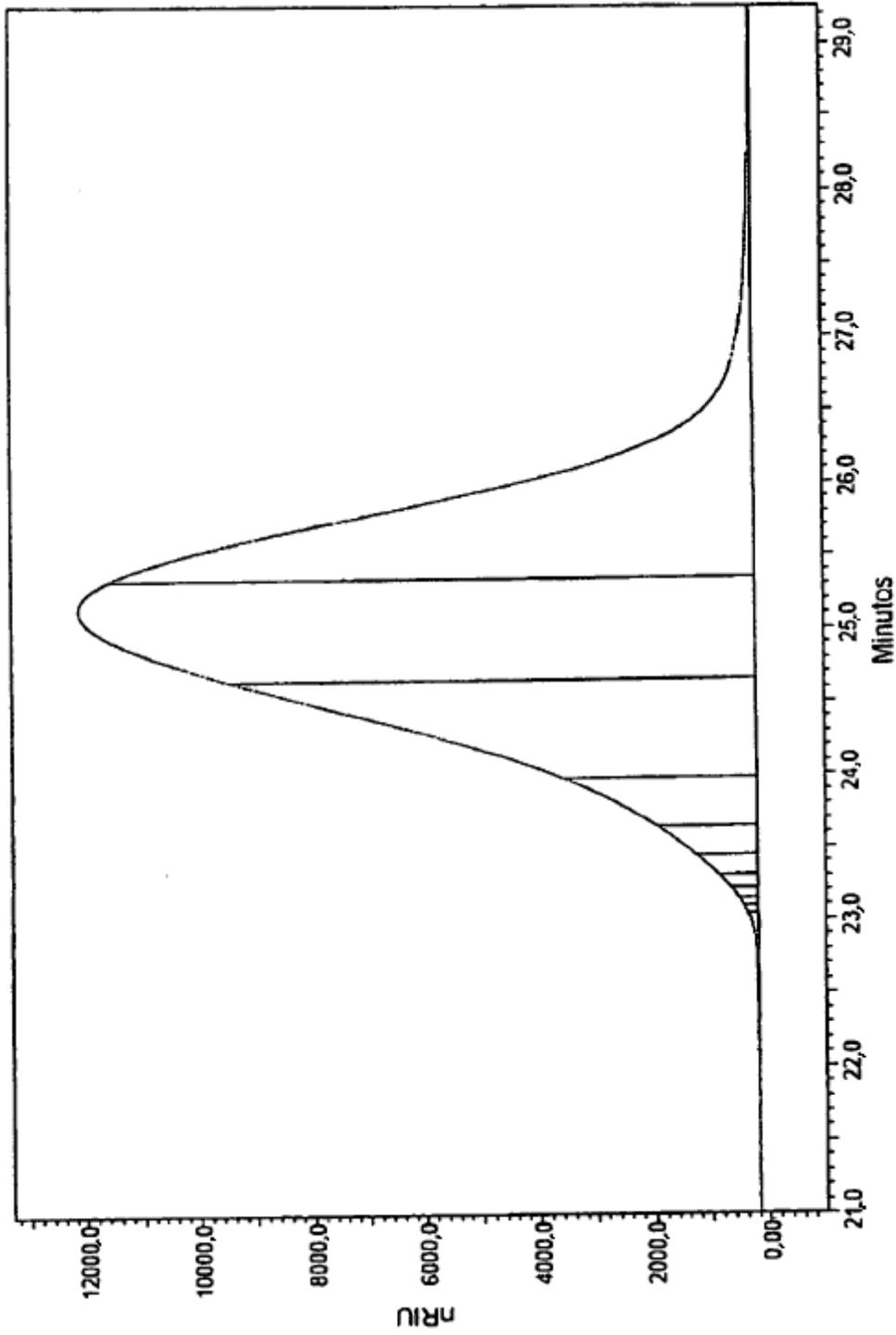


Fig. 17

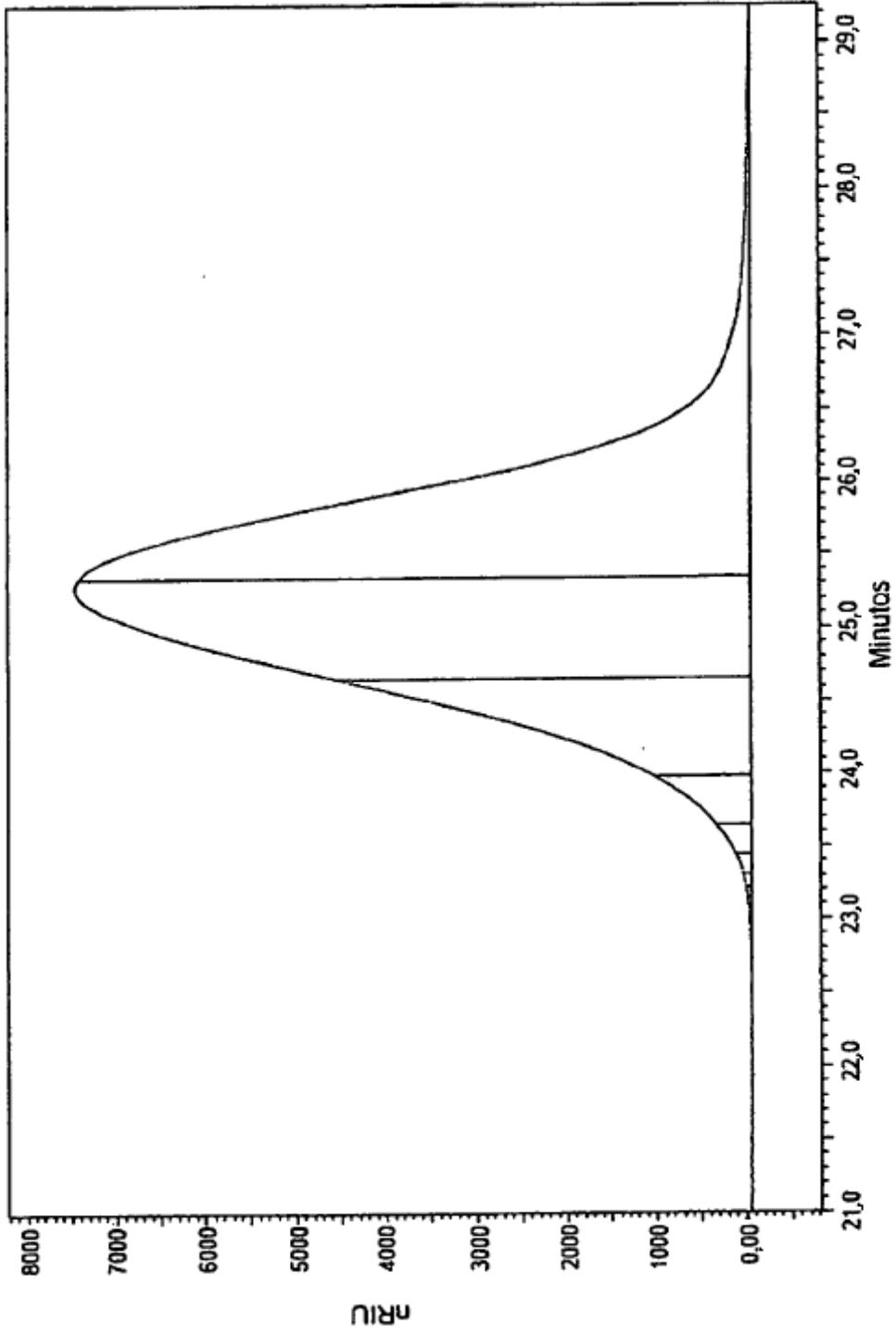


Fig. 18

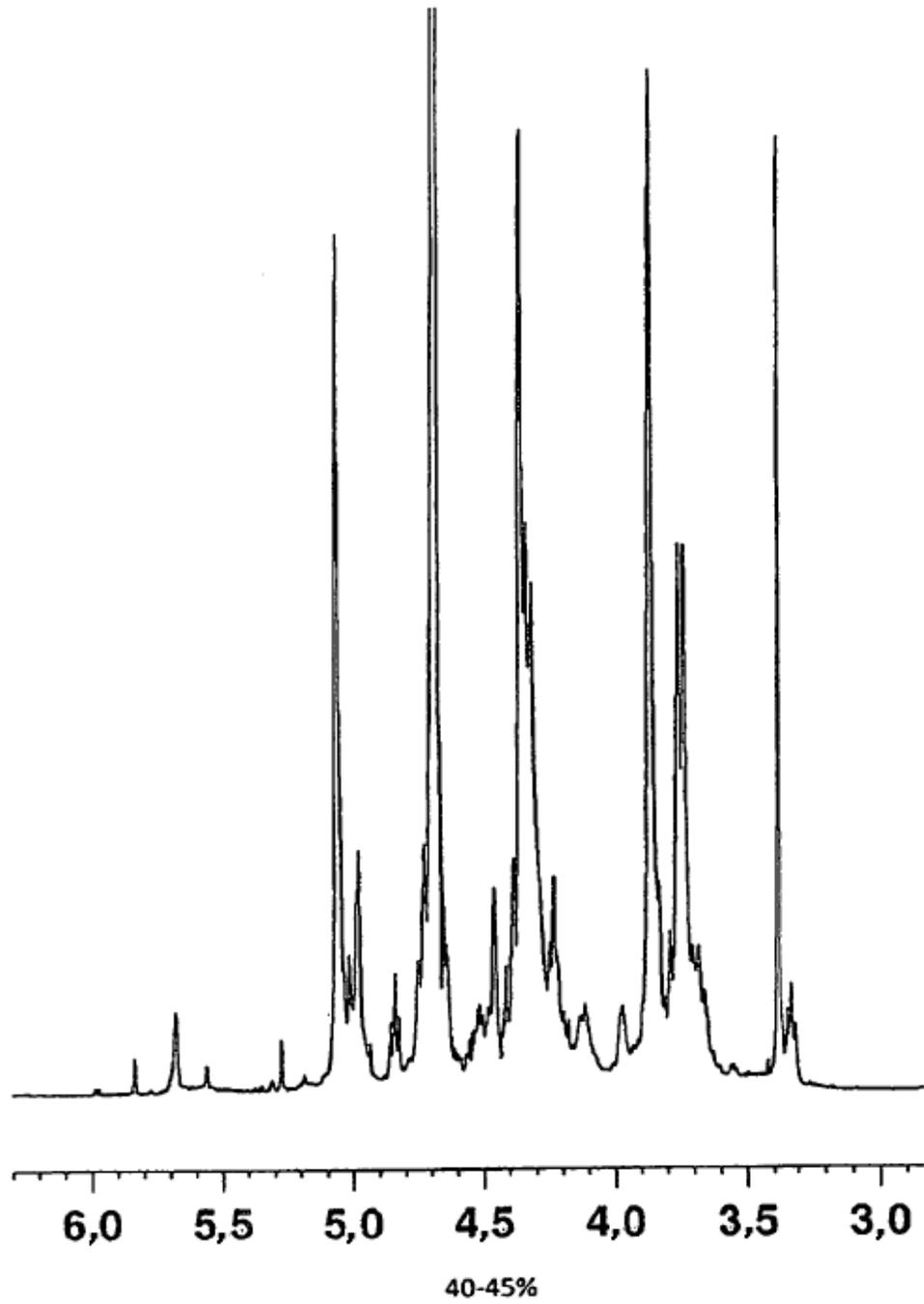
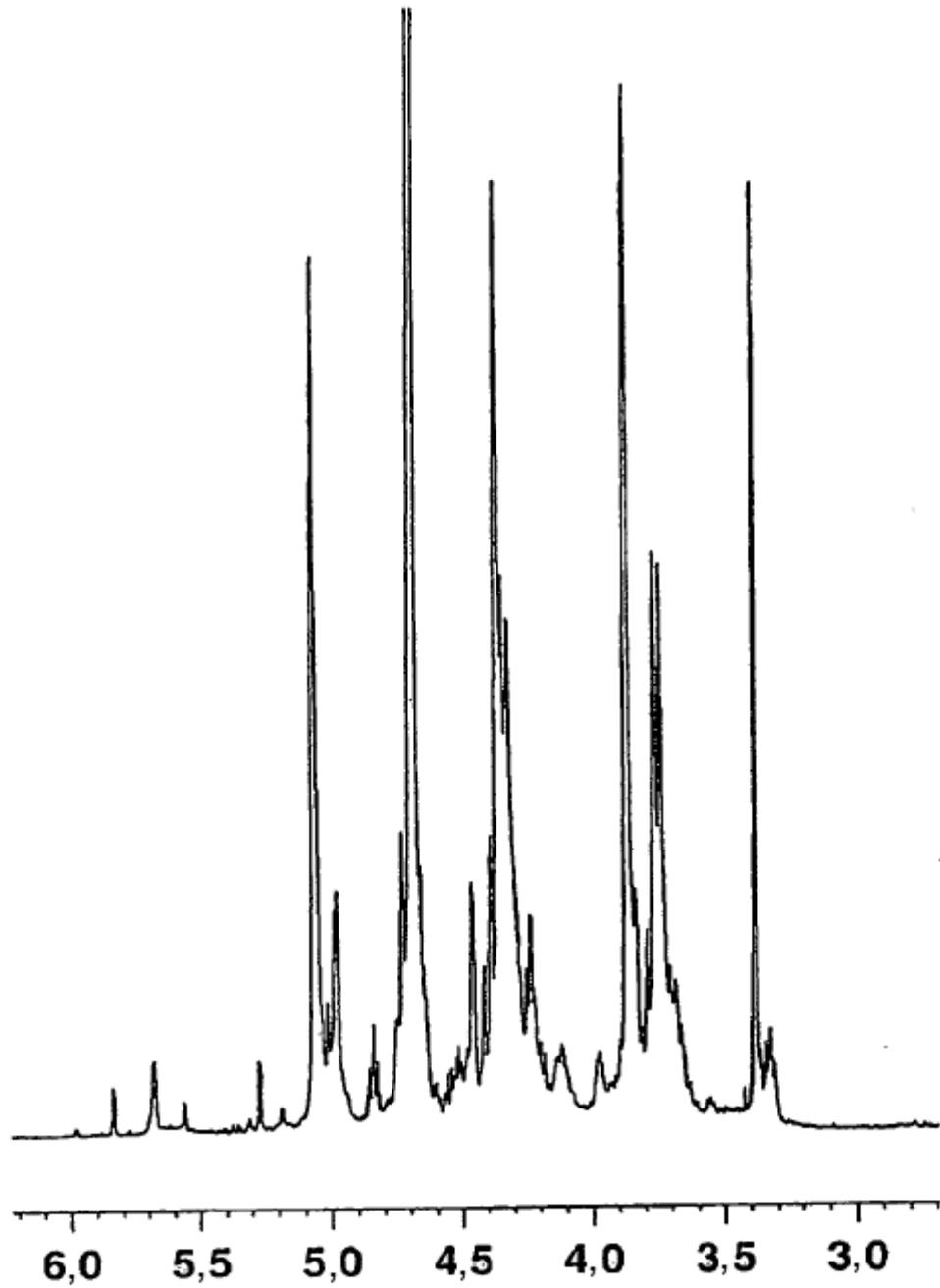


Fig. 19



45-50%

Fig. 20

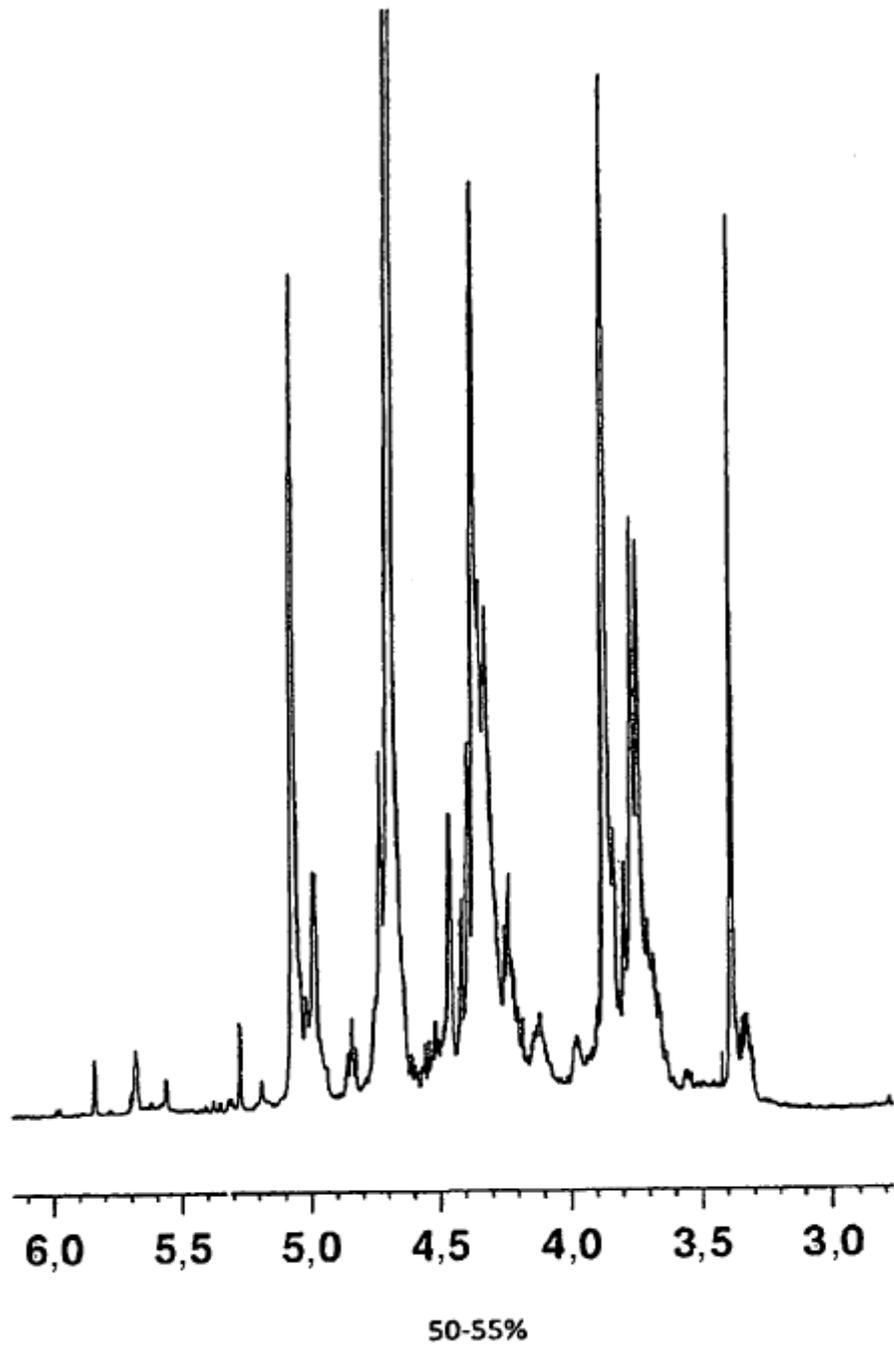


Fig. 21