

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 583**

51 Int. Cl.:

A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61K 31/726 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2013 E 13728982 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2852437**

54 Título: **6-Sulfato de condroitina biotecnológico de bajo peso molecular para la prevención de la artrosis**

30 Prioridad:

22.05.2012 IT MI20120880

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

26.05.2016

73 Titular/es:

**GNOSIS S.P.A. (100.0%)
Piazza del Carmine 4
20121 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**MIRAGLIA, NICCOLÒ;
BIANCHI, DAVIDE;
VALOTI, ERMANNO;
TRENTIN, ANTONELLA;
TRILLI, ANTONIO;
BUSIELLO, IMMACOLATA;
AGOSTINETTO, MARCO;
BAZZA, PAOLA y
VALETTI, MARCO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 571 583 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

6-Sulfato de condroitina biotecnológico de bajo peso molecular para la prevención de la artrosis

Sumario de la invención

5 La presente invención se refiere a un sulfato de condroitina (CS) con un peso molecular extremadamente bajo (1000-5000 daltons) producido mediante sulfatación química y posterior despolimerización de una cadena principal de condroitina no sulfatada obtenida mediante técnicas biotecnológicas, o producido mediante sulfatación de un polisacárido de origen biotecnológico caracterizado originalmente por un bajo peso molecular, y el uso de dicho CS en el tratamiento y la prevención de la artrosis y procesos inflamatorios crónicos y agudos. En particular, la invención se refiere a un CS biotecnológico que está esencialmente monosulfatado, principalmente en la posición 6, posee muy poco o nada del 4-sulfato, y es idéntico al CS natural en términos de la proporción disacárido monosulfatado/disulfatado, la ausencia de disacáridos trisulfatados y polisulfatados, la densidad de carga y la actividad biológica exhibida. El 6-sulfato de condroitina (C6S) de acuerdo con la invención presenta un peso molecular más bajo (1000-5000 daltons) que el de los sulfatos de condroitina extraídos de tejidos de animales de origen terrestre (bovinos, porcinos y aves), caracterizados por valores de peso molecular de 14000 a 26.000 daltons, y de origen marino (tiburón, calamar, raya y peces óseos), todos con un peso molecular > 50.000 daltons. El C6S de acuerdo con la invención tiene también un peso molecular incluso más bajo que el de tipos conocidos de CS de bajo peso molecular. Esta característica da al 6-sulfato de condroitina de acuerdo con la invención una mejor biodisponibilidad y, por tanto, una mayor eficacia.

20 El uso del 6-sulfato de condroitina (C6S) biotecnológico de bajo peso molecular en el tratamiento y la prevención de la artrosis está confirmado por la verificación experimental de su actividad antiinflamatoria en un modelo animal muy conocido usado normalmente para el estudio de la artritis y los síntomas asociados. El C6S biotecnológico de bajo peso molecular descrito exhibe también una buena tolerancia, como se demuestra en los estudios toxicológicos realizados de acuerdo con las directrices de la OCDE para productos farmacéuticos.

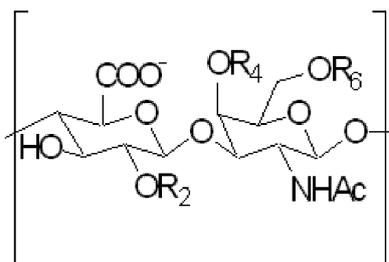
Antecedentes de la invención

25 El sulfato de condroitina (CS) es recomendado actualmente por la EULAR (la Liga Europea contra el Reumatismo) como fármaco sintomático de acción lenta para la artrosis (SYSADOA) en el tratamiento de la artrosis de la rodilla (Jordan KM y col., *Ann. Rheum. Dis.* 62, 1145, 2003), cadera (Jordan KM y col., *Ann. Rheum. Dis.* 62, 1145, 2003) y mano (Zhang W y col., *Ann. Rheum. Dis.* 66, 377, 2007) sobre la base de numerosos hallazgos clínicos y diversos meta-análisis de ensayos clínicos. Ensayos clínicos recientes han demostrado también que el CS modifica las estructuras extracelulares del tejido de cartílago humano (Reginster JY, Heraud F, Zegels B, Bruyere O., *Mini Rev Med Chem* 7, 1051, 2007; Kahan A, Uebelhart D, De Vathaire F, Delmas PD, Reginster JY., *Arthritis Rheum* 60, 524, 2009). El CS también se ha usado ampliamente como nutraceutico, bien solo o bien combinado con otros ingredientes (McAlindon TE y col., *JAMA* 283, 1469, 2000. Volpi N y col., *Food Anal Meth* 1, 195, 2008. Volpi N y col., *Separation Sc* 1, 22, 2009).

35 El sulfato de condroitina (CS) es un polisacárido natural que pertenece a la clase de los glicosaminoglicanos (GAG), presente tanto en vertebrados como en invertebrados, que consiste en secuencias de disacáridos formadas por residuos alternantes de ácido glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) unidos entre sí mediante enlaces beta 1-3 y sulfatados en diferentes posiciones.

40 El CS está presente en tejidos de animales, con funciones estructurales y fisiológicas. Consiste principalmente en dos tipos de unidades disacárido monosulfatadas en la posición 4 o en la posición 6 del GalNAc (denominadas disacárido A y C, respectivamente), presentes en diferentes porcentajes dependiendo de su origen. La cadena principal del CS contiene también disacáridos no sulfatados, generalmente en pequeñas cantidades. Los disacáridos disulfatados que tienen dos grupos sulfato unidos a través del átomo de oxígeno en diversas posiciones, tales como la posición 2 del GlcA y la posición 6 del GalNAc (disacárido D), la posición 2 del GlcA y la posición 4 del GalNAc, o las posiciones 4 y 6 del GalNAc (disacárido E), pueden estar presentes en la cadena principal del CS en porcentajes variables dependiendo de la fuente animal específica (Volpi N. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 1271, 2009. Volpi N. *J. Pharm. Sci.* 96, 3168, 2007. Volpi N. *Curr. Pharm. Des.* 12, 639, 2006). La presencia de sulfatación en la posición 3 del GlcA es posible, pero en cantidades extremadamente pequeñas; dicha presencia es rara en el CS de origen terrestre, y más probable en los tipos altamente sulfatados de origen marino (Fongmoon D y col. *J Biol Chem* 282, 36895, 2007).

La fórmula de la unidad disacárido repetida del CS es tal como sigue:



en la que R₂, R₄ y R₆ son independientemente H o SO₃⁻.

Las cargas negativas de los grupos carboxilato y sulfato en la unidad disacárido repetida generalmente están neutralizadas con iones sodio.

5 Los significados de los acrónimos usados más habitualmente para identificar los disacáridos sulfatados de diferentes maneras se exponen a continuación:

Di-0S (R₂=H; R₄=H; R₆=H)

Di-6S (C) (R₂=H; R₄=H; R₆= SO₃⁻)

Di-4S (A) (R₂=H; R₄= SO₃⁻; R₆=H)

10 Di-4,6diS (E) (R₂=H; R₄= SO₃⁻; R₆= SO₃⁻)

Di-2,6diS (D) (R₂= SO₃⁻; R₄=H; R₆= SO₃⁻)

Di-2,4diS (B) (R₂= SO₃⁻; R₄= SO₃⁻; R₆=H)

Di-2,4,6triS (R₂= SO₃⁻; R₄= SO₃⁻; R₆= SO₃⁻)

15 Las muestras de CS procedentes de diferentes fuentes animales se caracterizan también por sus diferentes pesos moleculares y densidades de carga, estando este último parámetro correlacionado con los grupos sulfatados específicos.

La Tabla muestra los disacáridos principales encontrados en el CS natural extraído del cartílago de diversas especies animales:

Tabla 1 -

| Parámetros | CS bovino | CS porcino | CS de pollo | CS de tiburón | CS de raya | CS de calamar |
|---------------------------|-----------|------------|-------------|---------------|------------|---------------|
| PMn (kDa) | 12-17 | 9-14 | 8-13 | 25-40 | 27-34 | 60-80 |
| PMp (kDa) | 20-26 | 14-20 | 16-21 | 50-70 | 50-70 | 80-120 |
| Índice de polidispersidad | 1,8-2,2 | 1,4-1,8 | 1,6-2,0 | 1,0-2,0 | 1,2-2,5 | 0,8-1,3 |
| Di-0S | 6 | 6 | 8 | 3 | 3 | 13 |
| Di-6S | 33 | 14 | 20 | 44 | 39 | 15 |
| Di-4S | 61 | 80 | 72 | 32 | 43 | 50 |
| Di-2,6diS | ND | ND | ND | 18 | 13 | 0 |
| Di-4,6diS | ND | ND | ND | 2 | 1 | 22 |
| Di-2,4diS | ND | ND | ND | 1 | 1 | 0 |
| Densidad de carga | 0,90-0,96 | 0,92-0,96 | 0,90-0,94 | 1,15-1,25 | 1,08-1,20 | 1,00-1,20 |
| proporción 4S/6S | 1,50-2,00 | 4,50-7,00 | 3,00-4,00 | 0,45-0,90 | 1,00-1,40 | 2,50-4,00 |

PMn = peso molecular promedio en número; PMp = peso molecular promedio en peso; índice de polidispersidad = PMp/PMn; la densidad de carga es el número de grupos sulfato por unidad disacárido; ND = no identificado

5 Los diversos tipos de CS derivados de animales terrestres tienen parámetros de peso molecular similares (PMn y PMp), mientras que difieren de los de las especies marinas, que tienen valores de peso molecular más altos. El CS de origen terrestre tiene un peso molecular (PMp) medio entre 14 y 26 kDa, mientras que el CS de origen marino, obtenido de calamares, peces cartilaginosos y peces óseos, tiene un peso molecular (PMp) superior a 50 kDa. Las muestras de CS terrestre se caracterizan también por valores de densidad de carga (CD) inferiores a 1,0, mientras que las muestras de CS marino tienen siempre valores de CD superiores a 1,0.

Los disacáridos disulfatados están presentes normalmente en cantidades traza en el CS terrestre, y son más abundantes en el CS de origen marino. Además, no se observan cantidades significativas de disacáridos polisulfatados (trisulfatos y tetrasulfatos) en el CS natural.

10 El CS natural presenta también diferencias entre diferentes órganos y tejidos, incluso dentro de la misma especie, tal y como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 –

| Parámetros | Cartílago bovino | Aorta de bovino | Huesos de esturión | Íleon, riñón, pulmón y médula ósea de conejo | Plaquetas humanas | Plasma humano |
|---------------------------|------------------|-----------------|--------------------|--|-------------------|---------------|
| PMn (kDa) | 12-17 | ND | 25-30 | ND | ND | ND |
| PMp (kDa) | 20-26 | ND | 35-40 | ND | ND | ~ 15 |
| Índice de polidispersidad | 1,8-2,2 | ND | 1,05-1,5 | ND | ND | ND |
| Di-0S | 6 | 0 | 7 | ND | 0 | 40-60 |
| Di-6S | 33 | 95-100 | 55 | ~ 100 | Trazas | 1-5 |
| Di-4S | 61 | 0-5 | 38 | Trazas | > 98 | 60-40 |
| Di-2,6diS | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Di-4,6diS | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Di-2,4diS | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Densidad de carga | 0,90-0,96 | 0,98-1,02 | 0,90-0,95 | 0,98-1,02 | 0,98-1,02 | 0,40-0,60 |
| proporción 4S/6S | 1,50-2,00 | < 0,1 | 0,40-0,90 | < 0,1 | > 45 | 10-50 |

PMn: peso molecular promedio en número; PMp = peso molecular promedio en peso; Índice de polidispersidad = PMp/PMn; la densidad de carga es el número de grupos sulfato por unidad disacárido; ND = no identificado.

15 La existencia de cadenas de CS oligosacárido o polisacárido con un 100 % de disacáridos 6-sulfato o 4-sulfato se ha comunicado en la literatura para diversos tejidos y órganos (Sampaio L.O. y col., *Biol. Chem.* 256, 9205, 1981; Okayama E. y col. *Blood* 72,745, 1988; Ambrosius M. y col., *J. Chrom. A* 1201, 54, 2008; Volpi N. y col., *Clin. Chim. Acta* 370, 196, 2006).

20 Todas estas características demuestran la extrema heterogeneidad del CS natural en términos tanto de peso molecular como de densidad de carga; sin embargo, se pueden identificar los parámetros de acuerdo con los cuales un CS se puede definir como "similar al natural". Un 6-sulfato de condroitina que tiene una densidad de carga comparable a la del CS de origen marino y que se caracteriza por la ausencia de patrones de sulfatación anómalos se presenta como estructuralmente similar al glicosaminoglicano natural. Se ha demostrado que la actividad antiinflamatoria *in vivo* proporciona un soporte adicional a la definición del CS similar al natural, y confirma su uso en el tratamiento de los síntomas asociados a los trastornos artríticos.

25 Se han hecho muchos intentos por encontrar un procedimiento biotecnológico para la producción de CS usando microorganismos como fuente precursora de polisacáridos que tienen una estructura parcialmente similar a la del CS, y usando después la sulfatación química para producir un CS similar al del tipo natural.

Algunas bacterias producen polisacáridos capsulares con una estructura similar a la de los glicosaminoglicanos; por ejemplo, la *Pasteurella multocida* produce un polisacárido idéntico a la condroitina no sulfatada (De Angelis P.L., *Carbohydrate Res.*, 337 (17), 1547, 2002). Sin embargo, la cepa de *Escherichia coli* con serotipo O5:K4:H4 produce un polisacárido capsular con una cadena principal de condroitina que lleva un residuo β -fructosa unido en la posición 3 de la unidad de GlcA (polisacárido K4).

Un ejemplo de producción de CS biotecnológico partiendo del polisacárido capsular K4 de *E. coli* O5:K4:H4 se ha comunicado en el documento EP 1304338, que describe un procedimiento en el que el polisacárido K4, producido en cultivos líquidos, se extrae y se purifica, y después se disuelve de nuevo y se somete a hidrólisis ácida para eliminar los residuos de fructosa unidos a los residuos de GlcA del polímero. El polímero desfructosilado, idéntico a la cadena principal de CS no sulfatada (CH), se sulfata después en la posición 4 o en la posición 6 del residuo de GalNAc de acuerdo con varios procedimientos de síntesis química para producir un CS con un peso molecular entre 6 y 25 kDa. Sin embargo, el CS biotecnológico descrito en el documento EP 1304338 no se evalúa en absoluto en cuanto a su actividad antiinflamatoria y antiartrítica, y su uso en el tratamiento de la artritis y/o la artrosis se queda en una mera hipótesis. Esto es particularmente importante ya que solo el 70 % del polisacárido descrito en el documento EP 1304338 tiene definitivamente la estructura de un sulfato de condroitina natural, siendo el 30 % restante principalmente condroitina no sulfatada (CH). Además, no se consideran los oligosacáridos con un peso molecular inferior a 5 kDa.

Una publicación reciente (Bedini E. y col., *Angew Chem. Int. Ed Engl.* 2011) describe un procedimiento en el que el polisacárido K4 producido está sulfatado en la posición 4 y/o en la posición 6 del residuo de GalNAc en la misma cadena. Una vez más, el CS biotecnológico descrito no se evalúa en cuanto a su actividad antiinflamatoria o antiartrítica, y su uso en el tratamiento y la prevención de la artritis y/o la artrosis y los procesos inflamatorios asociados tampoco se evalúa. Los mismos autores postulan la presencia de modificaciones estructurales en la cadena del CS biotecnológico derivadas de su procedimiento de síntesis, el cual produce una sulfatación anómala del grupo hidroxilo en el C3 del GlcA debido a una baja protección de ese grupo durante el procedimiento de síntesis. Se sabe que esta anomalía causa una seria toxicidad en humanos tras la administración intravenosa de heparina en la que dicho CS 3-sulfatado en GlcA estaba presente como contaminante. Si bien esta toxicidad no se ha observado nunca con relación a la administración oral del CS, el riesgo de efectos tóxicos debidos a este tipo de sulfatación anómala permanece; esto lo indican también los mismos autores en otra publicación reciente (Bedini E. y col., *Chem. J.* 2012 [Publicación electrónica antes de impresión]).

Además, el CS biotecnológico descrito por Bedini y col. (*Angew Chem Int Ed Engl.* 2011) tiene un peso molecular de aproximadamente 17 kDa y, por tanto, exhibe potencialmente la baja biodisponibilidad de los productos naturales de origen extractivo. Por todas estas razones, el CS biotecnológico descrito por Bedini y col. es improbable que se use en el tratamiento y la prevención de la artritis y/o la artrosis.

Existen ejemplos de tipos de CS de bajo peso molecular para su uso en el tratamiento de la artritis (Cho SY y col., *Biol. Pharm. Bull.* 27, 47, 2004, Das A. y col., *Osteoart. Cartil.* 8, 343, 2000), pero todos ellos se obtienen mediante despolimerización de CS de origen animal, lo que significa que no se puede descartar la presencia de virus, priones y otros agentes infecciosos transmisibles.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Aumento del peso corporal de ratas que padecen artritis adyuvante (AA) tras el tratamiento con el C6S biotecnológico de bajo peso molecular. Leyendas: HC, control sano; AC, control artrítico; T, grupo tratado con C6S (días 0 a 28); PT, grupo pretratado con C6S (días -14 a 28); Valores expresados en $g \pm$ ETM.

Fig. 2: Evaluación del edema en las patas traseras de ratas que padecen artritis adyuvante (AA) tras el tratamiento con C6S biotecnológico de bajo peso molecular. Leyendas: HC, control sano; AC, control artrítico; T, grupo tratado con C6S (días 0 a 28); PT, grupo pretratado con C6S (días -14 a 28); Aumento del porcentaje: medición efectuada como un aumento del volumen (ml), cálculo del porcentaje: $[(\text{Día}_n/\text{Día}_0) \times 100] - 100$ Valores expresados en $\% \pm$ ETM

Fig. 3: Progresión del estado del edema durante el estudio en ratas que padecen artritis adyuvante (AA) tras un tratamiento con C6S biotecnológico de bajo peso molecular. Leyendas: HC, control sano; AC, control artrítico; T, grupo tratado con C6S (días 0 a 28); PT, grupo pretratado con C6S (días -14 a 28); Evaluación del aumento del porcentaje en volumen tras 0, 7, 14, 21 y 28 días después de la inducción de la AA. Valores expresados como $\%$.

Fig. 4: Puntuación de la artritis en ratas que padecen artritis adyuvante (AA) tras el tratamiento con C6S biotecnológico de bajo peso molecular. Leyendas: HC, control sano; AC, control artrítico; T, grupo tratado con C6S (días 0 a 28); PT, grupo pretratado con C6S (días -14 a 28); Puntuación: Inflamación periarticular y eritema de las patas delanteras (1-5), inflamación periarticular y eritema de las patas traseras (1-8), diámetro de la costra en la base de la cola (1-5). Valores expresados en unidades \pm ETM.

Fig. 5: Progresión de la puntuación de la artritis durante el estudio en ratas que padecen artritis adyuvante (AA) tras el tratamiento con C6S biotecnológico de bajo peso molecular. Leyendas: HC, control sano; AC, control artrítico; T, grupo tratado con C6S (días 0 a 28); PT, grupo pretratado con C6S (días -14 a 28); Evaluación de la puntuación 0, 7, 14, 21 y 28 días después de la inducción de la AA. Valores expresados en unidades.

Descripción de la invención

5 Se ha descubierto ahora que un sulfato de condroitina (CS) con un peso molecular bajo, entre 1000 y 5000 daltons, o preferentemente entre 2000 y 4000 daltons, producido por la sulfatación química y posterior despolimerización de una cadena principal de condroitina no sulfatada obtenida mediante técnicas biotecnológicas, tiene una actividad antiinflamatoria comparable a la del CS natural, una biodisponibilidad mejorada y un perfil de seguridad favorable. El CS descrito está esencialmente monosulfatado, principalmente en la posición 6, con muy poca sulfatación en la posición 4, y con una proporción disacárido monosulfatado/disulfatado y una densidad de carga similares a los del CS natural.

10 El CS de acuerdo con la invención presenta todas las características de un CS natural y, más específicamente, de un CS de origen marino. Tiene similares porcentajes relativos de disacáridos monosulfatados y disulfatados, similar distribución de los disacáridos disulfatados y, por tanto, similar densidad de carga (CD) asociada a una proporción 4-sulfato/6-sulfato baja.

15 El CS biotecnológico de acuerdo con la invención presenta también las siguientes características especiales: un peso molecular muy bajo (entre 1000 y 5000 daltons, o preferentemente entre 2000 y 4000 daltons); un porcentaje particularmente elevado de disacáridos 6-sulfatados; una ausencia casi total de disacáridos trisulfatados; una ausencia esencial de sulfatación en la posición 3 del residuo de GlcA. En particular, la presencia de disacáridos trisulfatados y de disacáridos sulfatados en la posición 3 del residuo de GlcA caracteriza a los tipos conocidos de CS sintético, y causa con frecuencia efectos adversos en su aplicación terapéutica.

20 La Tabla 3 muestra las características fisicoquímicas del 6-sulfato de condroitina biotecnológico de acuerdo con la invención.

Tabla 3

| Características fisicoquímicas del CS biotecnológico | |
|--|----------------|
| Peso molecular (PMp) | 1000 - 5000 Da |
| <i>Disacáridos:</i> | |
| Δ Di-0S | < 15 % |
| Δ Di-6S | \geq 65 % |
| Δ Di-4S | < 1 % |
| Δ Di-2,6diS | < 20 % |
| Δ Di-4,6diS | < 5 % |
| Δ Di-2,4diS | < 1 % |
| Densidad de carga | 1 - 1,25 |
| proporción 4S/6S | < 0,1 |

25 De acuerdo con un aspecto particular de la invención, el C6S se puede obtener mediante el procedimiento de síntesis química descrito en el documento PCT/EP2011/058297 aplicado al polisacárido capsular K4 producido de forma natural por la cepa de *E. coli* O5:K4:H4 (WO 01/02597) previamente desfructosilado mediante hidrólisis termoácida de acuerdo con técnicas conocidas (Rodríguez y Jann, *Eur.J.Biochem.* 117, 117-124, FEBS 1988), o a cualquier otro polisacárido con la estructura de la condroitina no sulfatada. De modo alternativo, la condroitina no sulfatada (CH) de partida se puede obtener a partir de cultivos de la cepa *DSM23644* de *E. coli* descrita en el documento WO 2012004063 la cual, debido a una mutación inducida en el gen KfoE responsable de la fructosilación del K4, produce un polisacárido idéntico a la CH no sulfatada natural. De acuerdo con este aspecto de la invención, el polisacárido se somete a sulfatación química, preferentemente de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento PCT/EP2011/058297.

Brevemente, el procedimiento de síntesis que lleva a la sulfatación de las unidades disacárido es tal como sigue:

35 a) La condroitina no sulfatada, aislada en forma de sal de amonio, o en forma de cualquiera de las sales de metales alcalinos y, particularmente en forma de sal de sodio o en forma de sal de potasio o sal de litio, obtenida tras la desfructosilación del polisacárido K4 se desalifica en una resina de intercambio catiónico y se vuelve a salificar con un grupo de hidróxido de alquilamonio, preferentemente con hidróxido de tetrabutilamonio añadido en una cantidad estequiométrica hasta un pH de 7-7,5, y se seca mediante liofilización o secado por

pulverización.

b) la sal tetrabutilamonio de la CH descrita en la etapa a) se añade con agitación a una solución que consiste en un disolvente polar aprótico, preferentemente dimetilformamida (DMF), mantenido a una temperatura de entre 0 y 30 °C; el complejo de sulfatación se añade después en una proporción molar entre 2 y 5 a la CH, manteniendo una temperatura constante y con agitación.

c) Finalmente, se añade una cantidad de bicarbonato sódico en una proporción molar estequiométrica al agente de sulfatación o en exceso, aumentando al mismo tiempo la temperatura hasta 65 °C para eliminar el disolvente por evaporación. Se añade después agua, seguido de una redestilación. La solución final se somete a ultrafiltración y se dializa. Por último, la sal sódica de la CS se filtra y se seca al vacío hasta una humedad residual inferior al 10 %.

Las dimensiones moleculares del CS obtenido se reducen después mediante un procedimiento de despolimerización efectuado de acuerdo con técnicas conocidas de despolimerización por radicales (Volpi N. y col., *Carb. Res.*, 279, 193-200, 1995) o de despolimerización ácida, controlando el procedimiento a fin de obtener la distribución de pesos moleculares requerida.

La despolimerización ácida se realiza mediante resuspensión del CS en agua, acidificando la solución con la adición de HCl hasta una concentración de 1 M, y calentando hasta 60 °C.

El peso molecular de los oligosacáridos generados por despolimerización se calcula tomando muestras de la solución a intervalos cortos, determinando el peso molecular de los oligosacáridos mediante análisis SEC-HPLC efectuado en dos columnas de 5 µm de Agilent Bio Series SEC®-5 (monocapa polimérica neutra hidrófila) de 300 y 150 Å, respectivamente, en serie. La reacción se interrumpe mediante neutralización con NaOH o bicarbonato sódico, de modo que el pH esté ajustado a 6-8 cuando se hayan alcanzado los valores de peso molecular deseados.

De modo alternativo, la despolimerización se puede conseguir mediante hidrólisis con radicales, controlando el peso molecular final de los oligosacáridos resultantes tal y como se ha descrito previamente.

El CS se resuspende en agua y el pH se corrige a 7,5 mediante la adición de una solución de ácido clorhídrico o hidróxido sódico al 10 %, dependiendo de si la solución de CS necesita ser acidificada o basificada. Se añade una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 9 % a la solución mantenida a 60 °C. Se efectúa un análisis SEC-HPLC tal y como se ha descrito previamente para comprobar si se ha alcanzado el peso molecular deseado. La reacción se interrumpe mediante enfriamiento de la solución hasta temperatura ambiente (20-25 °C); y disminución del pH a 6,0.

La Tabla 4 muestra los valores de los pesos moleculares normales de un oligosacárido analizado mediante SEC-HPLC durante las etapas de reacción hasta el final de la despolimerización.

Tabla 4

| Tiempo (minutos) | PMp (kDa) | Índice de polidispersidad | PMp relativo (% del valor inicial) |
|------------------|-----------|---------------------------|------------------------------------|
| 0 | 77,3 | 0,2 | 100,0 |
| 60 | 73,6 | 0,2 | 95,3 |
| 120 | 81,9 | 0,2 | 106,0 |
| 180 | 76,3 | 0,3 | 98,7 |
| 330 | 45,7 | 0,4 | 59,1 |
| 390 | 39,7 | 0,4 | 51,4 |
| 510 | 28,6 | 0,5 | 37,0 |
| 660 | 25,5 | 0,6 | 33,0 |
| 780 | 20,5 | 0,6 | 26,5 |
| 840 | 18,7 | 0,6 | 24,2 |
| 900 | 18,1 | 0,6 | 23,4 |
| 1020 | 14,0 | 0,6 | 18,1 |
| 1200 | 10,2 | 0,6 | 13,2 |

(continuación)

| Tiempo (minutos) | PMp (kDa) | Índice de polidispersidad | PMp relativo (% del valor inicial) |
|------------------|-----------|---------------------------|------------------------------------|
| 1440 | 3,7 | 0,6 | 9,96 |

El C6S de acuerdo con la invención se puede obtener también mediante sulfatación química según los procedimientos previamente indicados, usando como sustrato la fracción de bajo peso molecular del polisacárido K4 procedente de la fermentación de la cepa de *E. coli* O5:K4:H4. En este caso, el caldo de cultivo se trata al final de la fermentación mediante calentamiento a 80 °C durante 60 minutos para desactivar el microorganismo, y después se centrifuga y se somete a ultrafiltración como en el documento EP 1304338; el sobrenadante resultante se carga después en una columna de filtración sobre gel y las fracciones se recogen, comprobando el contenido de ácido urónico de cada una de ellas mediante técnicas conocidas. Mediante combinación de las fracciones que han dado positivo en el ensayo del ácido urónico, se pueden aislar dos grupos separados: un primer grupo que contiene K4 de alto peso molecular (40-70 kDa), correspondiente al polisacárido conocido y que se corresponde cuantitativamente con el 80 % de los sacáridos totales, y un segundo grupo, claramente separado del primero en función del volumen de elución y que contiene K4 de bajo peso molecular, con baja dispersión alrededor del valor medio, de entre 1500 y 6000 daltons. La identidad de los oligosacáridos contenidos en dicho segundo grupo de bajo peso molecular con K4 se demuestra mediante la respuesta positiva simultánea al ensayo del ácido urónico y la digestibilidad con condroitinasa ABC, acompañada de la aparición de unidades disacárido.

Dicha fracción de oligosacáridos K4, que representa cuantitativamente un 20 % de los sacáridos totales, se somete seguidamente al procedimiento de desfructosilación y sulfatación química desvelado en el documento PCT/EP2011/058297 hasta que se obtiene un CS con un peso molecular final en el intervalo de 1000-5000 daltons.

De modo alternativo, el C6S biotecnológico de bajo peso molecular se puede obtener mediante un procedimiento similar a los descritos previamente, que implica la sulfatación de una fracción de bajo peso molecular del oligosacárido desfructosilado naturalmente K4-d recuperado de la fermentación de la cepa de *E. coli* DSM23644 descrita en el documento WO 2012004063.

El C6S de bajo peso molecular así obtenido se evaluó para determinar la eficacia en un modelo de artritis animal experimental (Artritis Adyuvante: AA) en rata, y los resultados obtenidos se compararon con aquellos relativos al CS natural de calidad farmacéutica de origen extractivo usados en el mismo modelo experimental (Bauerova K. y col., *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1373, 2011), tras un tratamiento diario oral con 900 mg/kg.

La AA se indujo mediante una única inyección intradérmica de *Mycobacterium butyricum* en adyuvante incompleto de Freund. El estudio incluía un grupo de animales sanos (HC), un grupo de animales artríticos sin tratar (AC) y dos grupos de animales artríticos tratados con dos pautas posológicas diferentes. La primera pauta del tratamiento implicaba un pretratamiento que consistía en la administración de 900 mg/kg de C6S biotecnológico al día durante 14 días antes de la inducción de la artritis, continuando durante 28 días tras la inducción de la AA (PT). La segunda pauta del tratamiento implicaba la administración de 900 mg/kg de C6S biotecnológico al día durante los 28 días posteriores a la inducción de la AA (T).

El aumento fisiológico del peso corporal de las ratas era muy bajo en los animales artríticos sin tratar (AC), llegando a aproximadamente un 40 % del de los controles sanos al final del estudio. El pretratamiento con C6S biotecnológico (grupo PT) limitó esta reducción: el aumento de peso corporal llegó al 73 % del de los controles sanos. El tratamiento solo (T) también demostró ser eficaz en restaurar el peso corporal, aunque en menor grado (un aumento de un 54 % comparado con el de los controles sanos) (Fig. 1). Esto es atribuible al papel antiinflamatorio del C6S biotecnológico de bajo peso molecular a nivel sistémico. Este efecto en el aumento del peso corporal de los animales es mayor que el encontrado en el estudio de Bauerova y col., realizado con C6S de alto peso molecular de origen bovino a la misma dosis (Bauerova K. y col., *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1373, 2011). Este hallazgo confirma la mayor absorción intestinal del C6S biotecnológico de acuerdo con la invención.

La gravedad de la artritis se cuantificó sobre la base del aumento de los niveles de la inflamación de las extremidades (edema); el edema que se desarrolló en la pata trasera se redujo significativamente en los animales pretratados (PT) (Fig. 2). El pretratamiento con C6S biotecnológico redujo significativamente el edema a lo largo del estudio en comparación con los controles sin tratar (Fig. 3).

El pretratamiento también demostró ser eficaz en la reducción de la puntuación de la artritis total, un parámetro que tiene en cuenta un conjunto de factores que comprenden el eritema periarticular, el edema desarrollado y el diámetro de la costra en el sitio de la inyección del adyuvante en la base de la cola. La escala de evaluación de la artritis asigna una puntuación entre 6 y 31; el grupo de control de la artritis (AC) obtuvo un valor de 23, mientras que el grupo PT alcanzó un valor de 19, frente al 12 de los controles sanos (HC) (Fig. 4). Además, el pretratamiento demostró ser eficaz a lo largo de la fase subaguda, desde el día 1 hasta el día 28 tras la inducción de la AA (Fig. 5). El grupo de tratamiento solo (T) grupo no influyó significativamente en la puntuación de la artritis durante el periodo de estudio.

El C6S de acuerdo con la invención se ensayó también para determinar su seguridad toxicológica en animales y en cultivos celulares de acuerdo con diversos protocolos diseñados para evaluar la potencial genotoxicidad a nivel celular y la toxicidad oral aguda en ratas. Todos los ensayos usados se validaron y se realizaron de acuerdo con las directrices de la OCDE para productos farmacéuticos.

- 5 El C6S biotecnológico se sometió a ensayos de mutagénesis en células bacterianas (mutación inversa en bacterias, Ref. OCDE 471) que examinaban la capacidad del producto para inducir la aparición de mutantes inversos en cepas auxotróficas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. No se observó un aumento significativo de la mutagenicidad bacteriana.

- 10 La genotoxicidad del C6S biotecnológico se examinó también en otros dos ensayos sobre cultivos de células eucariotas, particularmente el ensayo de las aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster chino *in vitro*, (Ref. OCDE 473) y un ensayo de mutagenicidad en células de linfoma murino (Mutación en células de linfoma de ratón L5178Y TK^{+/+}, Prot. OCDE 476). No se encontró un aumento significativo de la toxicidad genética en los dos estudios citados hasta la concentración más alta de C6S usada (5000 µg/placa y 5000 µg/ml, respectivamente).

- 15 Finalmente, se examinó la toxicidad aguda tras la administración oral en ratas Sprague-Dawley hasta la dosis de 2000 mg/kg de peso corporal. Tras una observación que duró 14 días después de la administración, las ratas no mostraron ningún signo clínico de padecerla, y no se produjo mortalidad alguna. Además, la autopsia realizada al final del estudio no indicaba ningún signo de toxicidad en los tejidos y órganos examinados.

- 20 Para los usos sanitarios o terapéuticos previstos, el C6S de acuerdo con la invención se usará como principio activo de medicamentos, complementos dietéticos o aditivos alimentarios, combinado posiblemente con otros principios activos tales como clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, N-acetilglucosamina, ácido hialurónico, aminoácidos, colágeno, colágeno hidrolizado, ácidos grasos poliinsaturados, queratina, dermatina, metilsulfonilmetano (MSM), folatos, folatos reducidos, vitaminas, vitaminas del grupo B, S-adenosilmetionina (SAME), ácido ascórbico o ascorbato de manganeso.

- 25 Ejemplos de formulaciones de acuerdo con la invención incluyen cápsulas, cápsulas blandas de gel, comprimidos, bebidas en forma líquida y bebidas en polvo para ser reconstituidas.

Las dosis del C6S de acuerdo con la invención estarán entre 100 y 3000 mg/día, preferentemente entre 1000 y 2000 mg/día, y más preferentemente entre 1250 y 1750 mg/día.

La invención se describirá ahora con mayor detalle en los ejemplos siguientes.

- 30 **Ejemplo 1: Inducción de artritis (Artritis Adyuvante, AA) en ratas, y tratamiento con C6S biotecnológico de bajo peso molecular**

Se dividieron aleatoriamente 40 ratas Lewis macho de entre 150 y 190 g en cuatro grupos de 10 animales cada uno, se alojaron en jaulas de polipropileno en un ambiente mantenido a la temperatura de 22 ± 2 °C, y se alimentaron con una dieta de laboratorio convencional con acceso ilimitado al agua.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 35 1) Un grupo de control sano sin tratar (HC).
 2) Un grupo de control sin tratar con artritis inducida por adyuvante (AC).
 3) Un grupo de ratas artríticas tratadas por vía oral con C6S biotecnológico a la dosis de 900 mg/día por kg de peso corporal durante 28 días tras la inducción de la AA (días 0-28 del experimento) (T).
 40 4) Un grupo pretratado por vía oral con C6S biotecnológico a la dosis de 900 mg/día por kg de peso corporal durante 14 días previamente a la inducción de la AA, y durante 28 días tras la inducción de la AA (días -14 a 28 del experimento) (PT).

La artritis se indujo experimentalmente en ratas el día 0 mediante una única inyección intradérmica en la base de la cola de 1 ml de una mezcla que consistía en *Mycobacterium butyricum* térmicamente inactivada en medio incompleto de Freund.

- 45 El C6S de la invención se disolvió en agua destilada a la concentración de 20 mg/ml y se administró por vía oral en forma de una dosis diaria única mediante una sonda.

Ejemplo 2: Efectos del C6S biotecnológico sobre la evaluación de la AA en ratas mediante control del peso corporal

- 50 El peso corporal de las ratas se midió antes de la inducción de la AA (día 0), los días 7, 14 y 21, y al final del tratamiento (día 28). El efecto del tratamiento sobre este parámetro se evaluó mediante comparación del aumento de peso de los diferentes grupos durante el periodo de tratamiento.

Los valores encontrados se recogen en la Tabla 5:

Tabla 5

| Día (día _n) | Cambio en el peso corporal: Δ (día _n - día ₀) | | | | |
|-------------------------------------|---|-------|--------|--------|--------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Control sano (HC) | 0,0 | 98,19 | 120,93 | 135,37 | 148,33 |
| ETM | 0,0 | 1,76 | 2,01 | 1,99 | 2,47 |
| Control artrítico (AC) | 0,0 | 74,73 | 76,77 | 51,93 | 57,57 |
| ETM | 0,0 | 4,06 | 7,02 | 6,05 | 5,71 |
| Tratamiento con C6S bajo PM (T) | 0,0 | 85,19 | 89,19 | 68,39 | 79,78 |
| ETM | 0,0 | 3,03 | 5,63 | 7,52 | 8,86 |
| Pretratamiento con C6S bajo PM (PT) | 0,0 | 92,96 | 107,26 | 93,39 | 108,63 |
| ETM | 0,0 | 2,94 | 6,48 | 8,65 | 8,29 |
| ETM: Error típico de la media | | | | | |

Ejemplo 3: Efectos del C6S biotecnológico sobre la evaluación de la AA en ratas mediante control del edema desarrollado

- 5 El edema que desarrollaron como consecuencia de la artritis se midió mediante observación del aumento del volumen de la pata trasera con un calibrador adecuado para la medición. Las mediciones se efectuaron antes de la inducción de la AA (día 0), y los días 7, 14, 21, y 28 del estudio.

Los datos se expresaron como el porcentaje de aumento del edema calculado con la fórmula siguiente: $[(\text{Día}_n/\text{Día}_0) \times 100] - 100$, siendo Día₀ la medición del día de inicio, y Día_n la medición del día considerado.

- 10 Los valores encontrados se recogen en la Tabla 6:

Tabla 6

| Día (día _n) | Cambio en la inflamación de la pata trasera: $[(\text{Día}_n/\text{Día}_0) \times 100] - 100$ (%) | | | | |
|-------------------------------------|---|------|------|------|------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Control sano (HC) | 0,0 | 17,6 | 19,3 | 24,8 | 29,1 |
| ETM | 0,0 | 1,5 | 1,4 | 1,8 | 2,0 |
| Control artrítico (AC) | 0,0 | 8,6 | 31,0 | 56,7 | 59,3 |
| ETM | 0,0 | 1,2 | 4,6 | 6,5 | 6,1 |
| Tratamiento con C6S bajo PM (T) | 0,0 | 13,1 | 34,5 | 62,8 | 61,4 |
| ETM | 0,0 | 1,0 | 6,4 | 8,1 | 7,1 |
| Pretratamiento con C6S bajo PM (PT) | 0,0 | 15,4 | 26,7 | 46,5 | 49,7 |
| ETM | 0,0 | 1,5 | 4,9 | 6,9 | 7,1 |
| ETM: Error típico de la media | | | | | |

Ejemplo 4: Efectos del C6S biotecnológico sobre la evaluación de la AA en ratas mediante control de la puntuación de la artritis

- 15 La puntuación de la artritis se evaluó asignando una puntuación a la observación de la inflamación de la articulación de la pata (edema), la extensión del eritema periarticular y el diámetro de la costra en el sitio de inyección en la base

de la cola. La puntuación de la artritis o artrograma se midió como la suma de total del edema (en ml, puntuación de 1 a 8), más el diámetro de la pata delantera (en mm, puntuación máx. de 1 a 5), más el diámetro de la costra en el sitio de aplicación de la *Mycobacterium butyricum* medida en paralelo a la columna vertebral (en mm, puntuación máx. de 1 a 5), para cada animal.

5 Los valores encontrados se recogen en la Tabla 7:

Tabla 7

| Día (día _n) | Puntuación de la artritis | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------|------|------|------|------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Control sano (HC) | 10,0 | 10,0 | 10,2 | 11,4 | 12,0 |
| <i>ETM</i> | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,3 | 0,0 |
| Control artrítico (AC) | 10,0 | 11,0 | 16,9 | 22,4 | 23,2 |
| <i>ETM</i> | 0,0 | 0,4 | 1,2 | 1,4 | 1,3 |
| Tratamiento con C6S bajo PM (T) | 10,0 | 10,0 | 18,1 | 22,7 | 23,0 |
| <i>ETM</i> | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 1,9 | 1,3 |
| Pretratamiento con C6S bajo PM (PT) | 10,0 | 10,1 | 13,1 | 15,8 | 19,0 |
| <i>ETM</i> | 0,0 | 0,1 | 0,8 | 1,3 | 1,7 |
| ETM: Error típico de la media | | | | | |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sulfato de condroitina con un peso molecular que varía entre 1000 y 5000 daltons que tiene actividad biológica antiinflamatoria y antiartrítica **caracterizado por** un porcentaje de disacárido 6-monosulfato mayor o igual al 65 %, un porcentaje de disacárido 4-monosulfato < 1 %, un porcentaje de disacárido 2,6-disulfato menor o igual al 20 %, un porcentaje de disacárido 4,6-disulfato < 5 %, un porcentaje de disacárido 2,4-disulfato < 1 %, un porcentaje de disacárido no sulfatado < 15 %, y una densidad de carga que varía de 1 a 1,25.
2. Un sulfato de condroitina de acuerdo con la reivindicación 1 obtenido mediante sulfatación química y posterior despolimerización ácida o por radicales del polisacárido capsular K4 de *E. coli* tras la eliminación de los residuos de fructosa mediante hidrólisis.
- 10 3. Un sulfato de condroitina de acuerdo con la reivindicación 1 obtenido mediante sulfatación química de la fracción natural de bajo peso molecular del polisacárido capsular K4 de *E. coli* llevada a cabo después de la eliminación de los residuos de fructosa mediante hidrólisis.
- 15 4. Un sulfato de condroitina de acuerdo con la reivindicación 1 obtenido mediante sulfatación química y posterior despolimerización ácida o por radicales del polisacárido capsular originalmente exento de residuos de fructosa (K4-d), producido por la cepa de *E. coli* DSM23644.
5. Un sulfato de condroitina de acuerdo con la reivindicación 1 obtenido mediante sulfatación química de la fracción de bajo peso molecular del polisacárido capsular originalmente exento de residuos de fructosa (K4-d), producido por la cepa de *E. coli* DSM23644.
- 20 6. Sulfato de condroitina de las reivindicaciones 1-5 para su uso en la prevención y el tratamiento de afecciones inflamatorias crónicas o agudas y/o para la conservación de la salud musculoesquelética en seres humanos y animales.
7. Sulfato de condroitina para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la afección inflamatoria es la artrosis.
- 25 8. Composiciones que comprenden el sulfato de condroitina de las reivindicaciones 1-5 como principio activo, en combinación con excipientes farmacéutica y nutracéuticamente aceptables y, opcionalmente, con otros principios activos.
- 30 9. Composiciones de acuerdo con la reivindicación 8, en las que el otro principio activo se selecciona entre: clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, N-acetilglucosamina, ácido hialurónico, aminoácidos, colágeno, colágeno hidrolizado, ácidos grasos poliinsaturados, queratina, dermatina, metilsulfonilmetano (MSM), folatos, folatos reducidos, vitaminas, vitaminas del grupo B, S-adenosilmetionina (SAMe), ácido ascórbico o ascorbato de manganeso.
10. Composiciones de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en forma de cápsulas, cápsulas de gel blando, comprimidos, bebidas en forma líquida o bebidas en forma de polvo para ser disueltas.

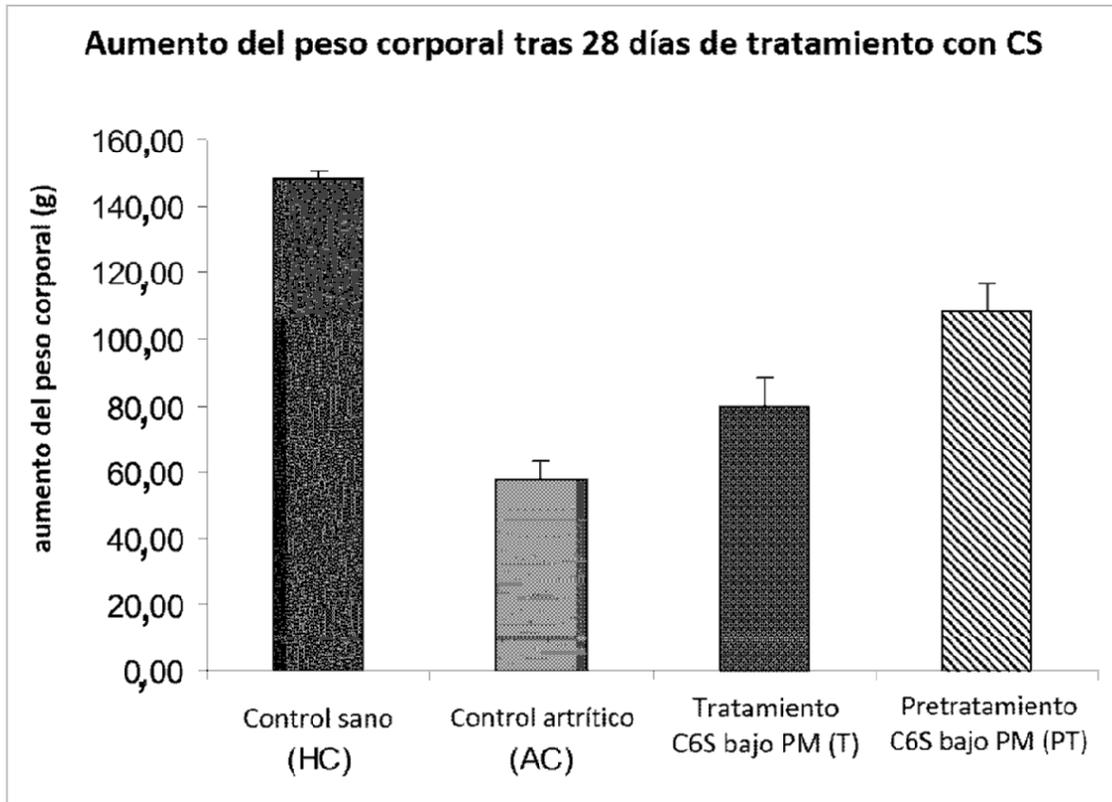


Fig. 1

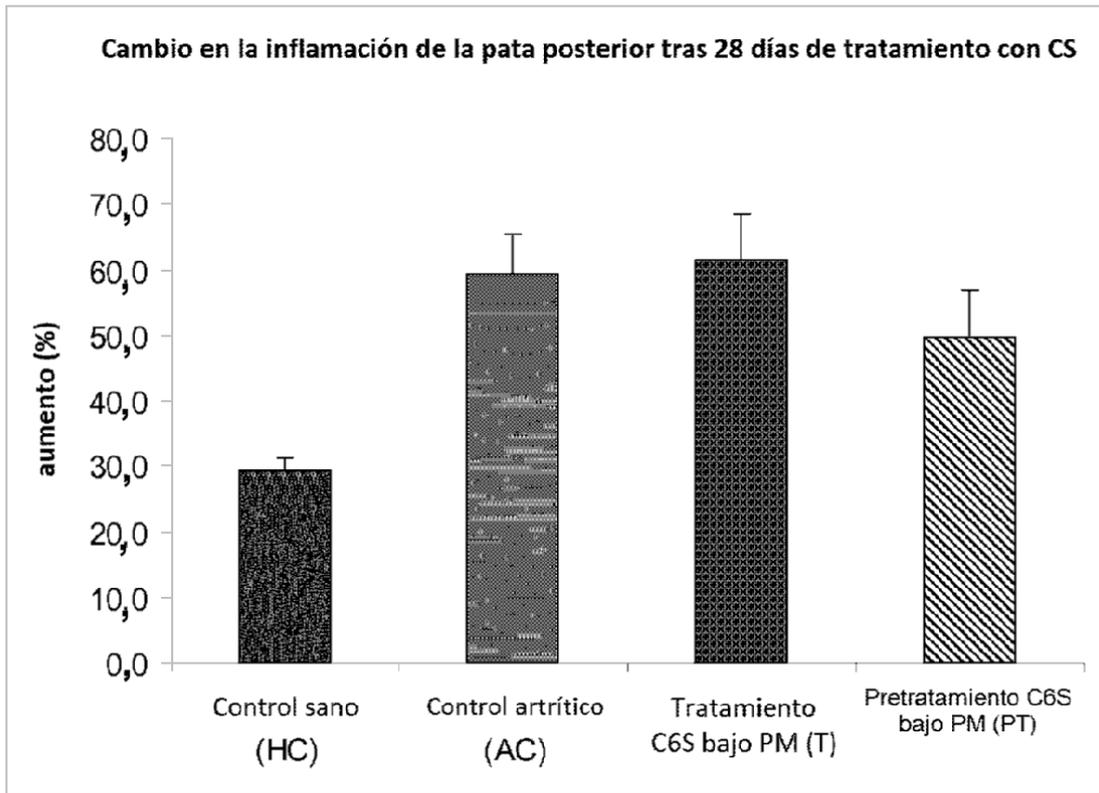


Fig. 2

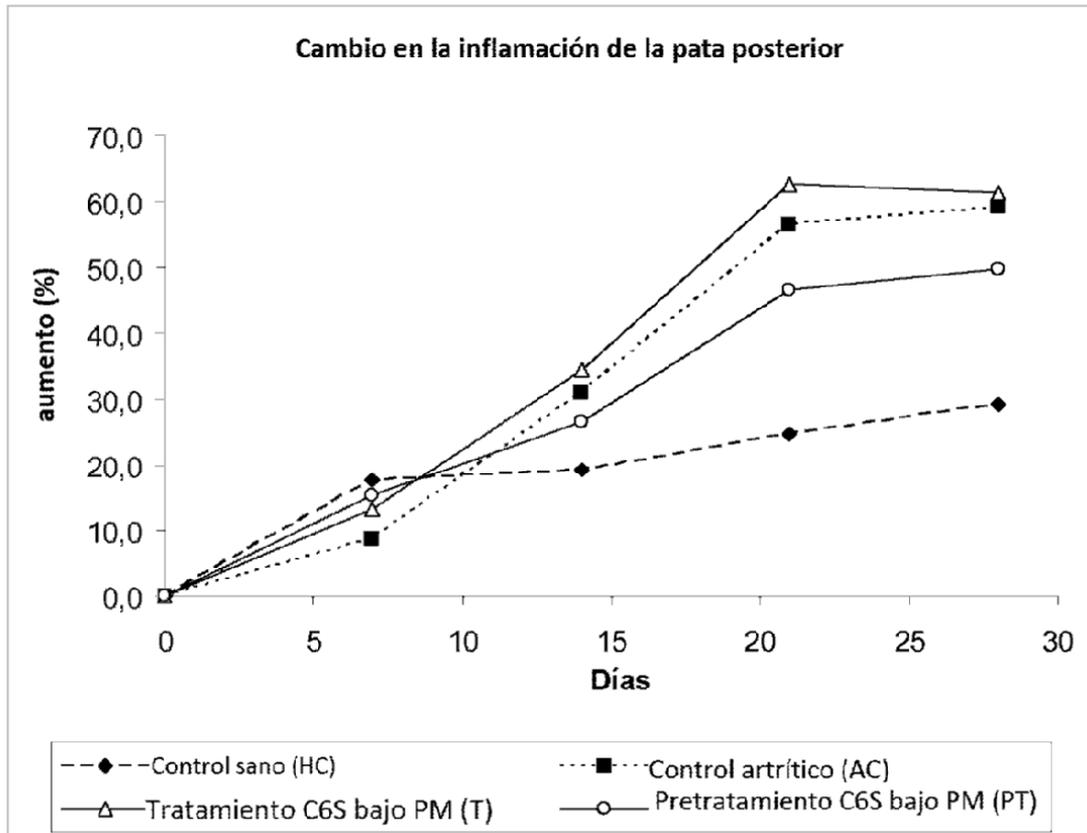


Fig. 3

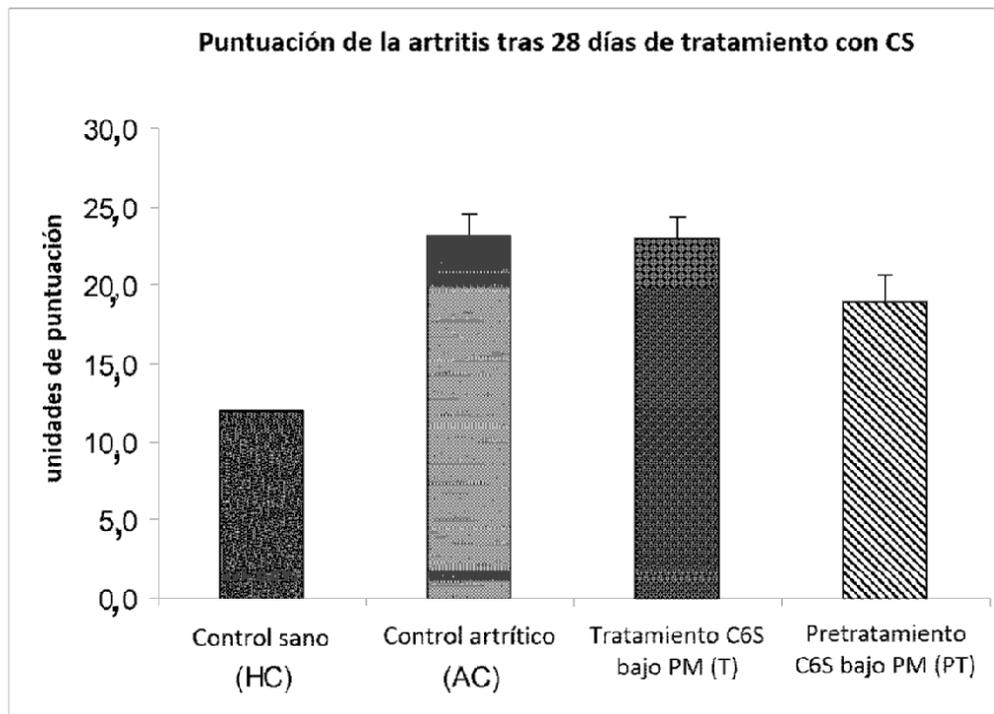


Fig. 4

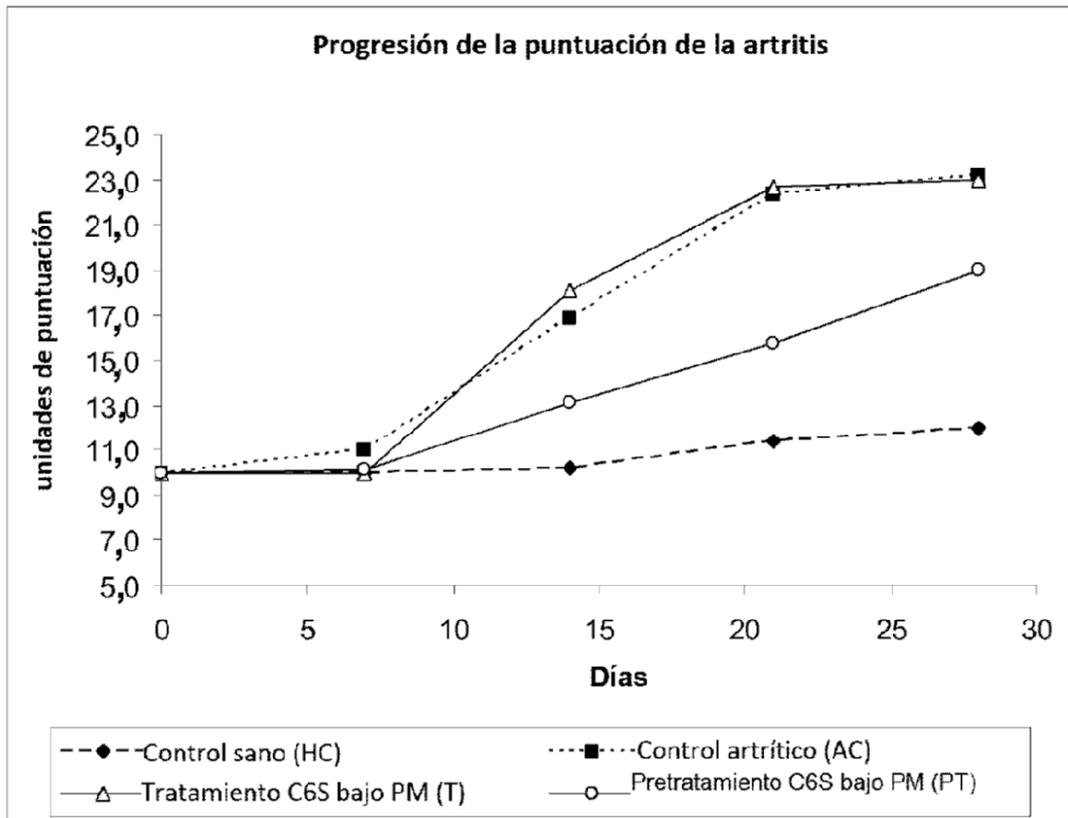


Fig. 5