

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 038**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2011** **E 11720309 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2710043**

54 Título: **Sulfato de condroitina similar al de tiburón, y procedimiento para la preparación del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2016

73 Titular/es:

GNOSIS S.P.A. (100.0%)
Via Laboratori Autobianchi, 1
20033 Desio (MB), IT

72 Inventor/es:

VALOTI, ERMANNO;
MIRAGLIA, NICCOLO;
BIANCHI, DAVIDE;
VALETTI, MARCO y
BAZZA, PAOLA

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 584 038 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

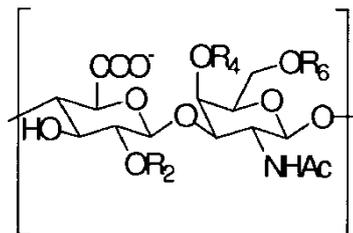
Sulfato de condroitina similar al de tiburón, y procedimiento para la preparación del mismo.

5 La presente invención se refiere a un sulfato de condroitina similar al de tiburón, y un procedimiento para la preparación del mismo. En particular, la presente invención se refiere a un sulfato de condroitina similar al de tiburón, que muestra una cantidad muy baja de 4-sulfato, una alta densidad de carga y una actividad biológica comparable a los sulfatos de condroitina naturales; la invención se refiere asimismo a un procedimiento para la preparación del sulfato de condroitina similar al de tiburón.

10 El sulfato de condroitina (de aquí en adelante CS), que pertenece a la clase de polisacáridos complejos naturales llamados glucosaminoglucanos (GAGs), está compuesto de secuencias disacáridas alternadas de restos diferentemente sulfatados de ácido D-glucurónico (GlcA) y de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) enlazados por enlaces beta (1->3).

15 Dependiendo de la naturaleza del disacárido, se conocen CS con diferentes cadenas principales de carbohidratos. De hecho, incluso si tanto los CS naturales como sintéticos conocidos están principalmente compuestos por diversos porcentajes de dos tipos de unidades disacáridas, es decir, sulfatadas en la posición 4 o 6 de GalNAc, los disacáridos con un número y posición diferentes de grupos sulfato pueden estar localizados, en diversos porcentajes, dentro de las cadenas polisacáridas. Por ejemplo, el disacárido no sulfatado está presente, en general en bajas cantidades, en la cadena principal de CS, mientras que los disacáridos disulfatados que tienen dos grupos sulfato enlazados mediante O en diversas posiciones, tales como 2 de GlcA y 6 de GalNAc (disacárido D), o en la posición 4 y 6 de GalNAc (disacárido E), pueden estar presentes en la cadena principal de CS en diversos porcentajes con relación a las fuentes animales específicas [Volpi N., J Pharm Pharmacol 61, 1271, 2009. Volpi N., J Pharm Sci 96, 3168, 2007].

El CS muestra una unidad repetida disacárida que presenta la siguiente fórmula estructural:



30 en la que R_2 , R_4 y R_6 son independientemente H o SO_3^-

A continuación se da a conocer el significado de algunos de los acrónimos más recurrentes, actualmente utilizados para identificar brevemente los restos diferentemente sulfatados de las secuencias disacáridas alternadas que constituyen los CS.

Di-0S	($R_2=H$; $R_4=H$; $R_6=H$)
Di-6S (C)	($R_2=H$; $R_4=H$; $R_6=\text{SO}_3^-$)
Di-4S (A)	($R_2=H$; $R_4=\text{SO}_3^-$; $R_6=H$)
40 Di-4,6diS (E)	($R_2=H$; $R_4=\text{SO}_3^-$; $R_6=\text{SO}_3^-$)
Di-2,6diS (D)	($R_2=\text{SO}_3^-$; $R_4=H$; $R_6=\text{SO}_3^-$)
Di-2,4diS (B)	($R_2=\text{SO}_3^-$; $R_4=\text{SO}_3^-$; $R_6=H$)
Di-2,4,6triS	($R_2=\text{SO}_3^-$; $R_4=\text{SO}_3^-$; $R_6=\text{SO}_3^-$)

45 Las muestras de CS tanto naturales como sintéticas pueden ser caracterizadas y diferenciadas por medio de enfoques analíticos sensibles, específicos, validados y publicados, capaces de dar la caracterización estructural y los parámetros de CS (por ejemplo, grupos sulfatados específicos, densidad de carga, masa molecular, y pureza) así como las actividades biológicas.

50 Las muestras de CS extractivas naturales pueden ser caracterizadas en busca de la estructura y las propiedades [Volpi N., J Pharm Pharmacol 61, 1271, 2009; Volpi N., J Pharm Sci 96, 3168, 2007; Mucci A. et al., Carbohydr Polymers 41, 37, 2000; Volpi N., Analyt Biochem 277, 19, 2000].

55 Respecto a las formas tri- y tetrasulfatadas de CS ("triS" y "tetraS", respectivamente), se puede observar que éstas son inusualmente detectadas en muestras de CS extractivas naturales, mientras que típicamente caracterizan el CS sintético; Di-2,4,6-triS es tomado como un estándar con el fin de evaluar la presencia de triS CS en productos de CS sintéticos ya que las otras formas de triS teóricamente posibles no están presentes en los productos derivados naturalmente.

La tabla 1 siguiente ilustra los principales disacáridos identificados en las muestras naturales de CS extraídas y purificadas de diversos órganos y tejidos, principalmente cartílagos.

5 Tabla 1

	CS bovino	CS porcino	CS de pollo	CS de tiburón	CS de raya	CS de calamar
Mn (kDa)	12-17	9-14	8-13	25-40	27-34	60-80
Mp (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 (C)	33	14	20	44	39	15
Di-4S (A)	61	80	72	32	43	50
Di-2,6diS (D)	ND	ND	ND	18	13	0
Di-4,6diS (E)	ND	ND	ND	2	1	22
Di-2,4diS (B)	ND	ND	ND	1	1	0
triS	ND	ND	ND	ND	ND	ND
tetraS	ND	ND	ND	ND	ND	ND
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
Relación 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

Mn = peso molecular medio numérico; Mp = peso molecular medio en peso; Índice de Polidispersidad = Mp/Mn; la densidad de carga es el número de grupos sulfato por unidades disacáridas; ND = No Detectado

La tabla 1 ilustra los parámetros estructurales principales para la caracterización de las muestras de CS naturales principales purificadas de diversas fuentes.

10 En particular, los parámetros de masa molecular son muy similares para las muestras de CS terrestres (muestras bovinas, porcinas y de pollo) pero bastante diferentes de las muestras de peces (muestras de tiburón, raya y calamar), teniendo las últimas valores de masas moleculares mayores que las primeras.

15 Además, las muestras de CS de peces presentan unos valores de densidad de carga peculiares, superiores a aproximadamente 1,0, debido a la presencia de disacáridos disulfatados, y diferentes de las muestras terrestres, que presentan unos valores de densidad de carga inferiores a aproximadamente 1,0, debido a la ausencia de los disacáridos disulfatados.

20 Una peculiaridad adicional de todos los CS naturales es que cuando son digeridos con condroitinasa ABC, una enzima hidrolítica específica para disacáridos sulfatados 4S o 6S, así como para disacáridos no sulfatados, la cadena polisacárida es completamente digerida en unidades disacáridas. Esto puede ser observado fácilmente con el análisis de electroforesis de carbohidratos asistida por flúorforo (FACE). La digestión completa de CS natural es debida a la ausencia de estructuras tri- y tetra-sulfatadas en la cadena polisacárida. Los disacáridos tri- y tetra-sulfatados, si están presentes, no son reconocidos por la condroitinasa ABC, no permitiendo una digestión completa del polisacárido, esto produce parcialmente cadenas oligosacáridas no digeridas fácilmente determinadas en el análisis FACE.

30 Finalmente, debido las rutas biosintéticas, todos los CS naturales conocidos muestran la presencia contemporánea de disacáridos monosulfatados en la posición 4 y posición 6 de GalNAc (con el disacárido 4-sulfatado nunca menor de 30%), incluso si su relación cambia dependiendo de la fuente.

35 Como se ilustró anteriormente, CS es una macromolécula heterogénea muy compleja que tiene estructura y propiedades variables, dependiendo de la fuente de extracción. Además, como resultado de los procesos biosintéticos relacionados con los tejidos y especies específicos, se pueden biosintetizar CS con diferentes grados de polimerización, produciendo macromoléculas que tienen diversas masas moleculares y polidispersidad. Debido a estas variaciones estructurales, y además de la posible presencia de secuencias oligosacáridas específicas, y la pureza de las preparaciones para aplicaciones en terapia o en productos nutracéuticos, los CS pueden tener diferentes propiedades y capacidades.

40 De hecho, han sido dado a conocer actividades diferentes y peculiares dependiendo de la estructura de CS [Volpi N., Biomaterials 23, 3015, 2002; Volpi N. et al., Biochimie 81, 955, 1999; Volpi N., Biomaterials 20, 1359, 1999; Suzuki S. et al., J Biol Chem 243, 7, 1968].

45 El CS extractivo natural es actualmente recomendado por la European League Against Rheumatism (EULAR) como fármaco de acción lenta sintomático para la osteoartritis (SYSADOA) en Europa en el tratamiento de OA de rodilla

[Jordan KM et al., Ann Rheum Dis 62, 1 145, 2003], cadera [Jordan KM et al., Ann Rheum Dis 62, 1 145, 2003], y mano [Zhang W. et al., Ann Rheum Dis 66, 377, 2007] sobre la base de las pruebas de investigación y el metaanálisis de numerosos estudios clínicos.

5 Además, CS solo o en combinación con otros ingredientes, es ampliamente utilizado como un producto nutracéutico, principalmente en Europa y en los Estados Unidos de América [McAlindon TE et al., JAMA 283, 1469, 2000. Volpi N. et al., Food Anal Meth 1, 195, 2008. Volpi N. et al., Separation Sc 1, 22, 2009].

10 La efectividad de CS está estrictamente relacionada con su actividad antiinflamatoria, tal como su habilidad para inhibir la actividad de las enzimas degradantes como elastasa leucocitaria humana (HLE) [Ronca F. et al., Osteoarthritis Cartilage 6 Suppl A, 14, 1998. Egea J. et al., Osteoarthritis Cartilage 18 Suppl 1, S24, 2010].

15 El CS utilizado mundialmente en aplicaciones farmacéuticas o nutracéuticas es obtenido por la extracción de tejidos de diversos animales tales como bóvidos y porcinos [Fuentes EP et al., Acta Farm Bonaerense 17, 135, 1998], aves [Luo XM et al., Poultry Sci 81, 1086-1089, 2002], peces cartilaginosos [Sugahara K. et al., Eur J Biochem 239, 871, 1996. Lignot B et al., J Biotechnol 103, 281, 2003], etc.

20 Incluso, el origen animal de estos productos plantea problemas potenciales de seguridad a los consumidores, asociados con la posible presencia de agentes infecciosos transmisibles, tales como los que provocan las encefalopatías espongiiformes en bovinos, o un uso restringido relacionado con asuntos religiosos.

Además, la naturaleza extractiva de estos productos convierte su suministro en potencialmente no fiable a partir de una demanda creciente y volúmenes del mercado cada vez mayores.

25 Tales consideraciones han promovido la investigación de fuentes de CS alternativas, más dependientes, un ejemplo de lo cual es la producción biotecnológica partiendo del polisacárido capsular K4 de *E. coli* como se describe en la bibliografía científica y de patentes.

30 En este contexto, la expresión producción biotecnológica se refiere a un método de producción en el que una porción sustancial del producto final es producida por un microorganismo, o por células aisladas de un organismo superior, o un sistema de cultivo artificial, habitual y variadamente denominado como fermentación.

Básicamente, se han utilizado tres enfoques principales hasta el momento en la técnica.

35 El primero puede ser identificado con la producción de productos similares a CS utilizando como material de partida el polisacárido capsular K4 de *E. coli* O5:K4:H4, el cual se somete después a transformación química, mientras que el segundo enfoque puede ser visto como la biosíntesis directa de compuestos similares a CS por microorganismos, y el tercero se reconoce que es la producción biosintética de condroitina no sulfatada, seguida de la sulfatación química o bioquímica.

40 El documento EP-A-1304338, que pertenece al primer enfoque mencionado anteriormente, describe la producción de CS partiendo del polisacárido K4 producido en cultivos líquidos, que es inicialmente extraído y purificado, y a continuación redisoluto y sometido a hidrólisis ácida, cuyo efecto principal es la eliminación de los restos de fructosa enlazados a los restos de GlcA presentes en el polímero lineal. Un efecto secundario es la hidrólisis parcial de la cadena polisacárida, que conduce a productos de menor masa molecular. A continuación, el polímero desfructosilado, que es idéntico a la condroitina no sulfatada, es sulfatado de manera diversa en las posiciones C-4 o en las posiciones C-6 de los restos de GalNAc por medios químicos utilizando grupos protectores apropiados en las posiciones 4 o 6. También, se describe en este documento un CS, consistiendo al menos 70% de su contenido en mono- y/o di-sulfatado en las posiciones 4 y 6 del resto de galactosamina, estando no sulfatada la posición 2 del resto glucurónico, que tiene un Mp de 6-25 kDa y una relación de grupo carboxilo/sulfato (es decir, densidad de carga) de 0,7-2,0.

55 El documento WO 2009/149155, que ejemplifica el segundo enfoque anteriormente mencionado, describe la producción directa de compuestos similares a CS por diversos microorganismos, tanto bacterias como hongos. También se describe en este documento un compuesto similar a CS terrestre, estando sulfatadas ambas posiciones 4 y 6 del resto de galactosamina; se da a conocer que el compuesto muestra un peso molecular (Mp) de aproximadamente 300 Da hasta 35 kDa y una relación de sulfato 4S/6S comprendida entre menos de 1 y más de 1.

60 El tercero de los enfoques anteriores incluye varias estrategias diferentes para la producción de la condroitina no sulfatada, la principal de las cuales es la síntesis enzimática del polímero en sistemas libres de células, como la descrita por ejemplo en los documentos EP-A-1950308 y EP-A-1964924, y la biosíntesis en células recombinantes obtenidas que se expresan en hospedantes capaces de producir, a partir de UDP-GlcA, los genes *kfoA* y *kfoC* extraídos de *E. coli* K4, descrita, por ejemplo, en el documento WO 2008/133350.

65 Otro ejemplo más de la producción biosintética de condroitina no sulfatada se describe mediante la solicitud de patente italiana nº MI2010A001300, la cual, entre otros, se refiere a un método para la producción biotecnológica de

condroitina, que comprende cultivar en un medio adecuado un microorganismo recombinante, preferentemente *Escherichia coli* DSM23644, recuperar y purificar la condroitina no sulfatada presente en el cultivo microbiano, y después sulfatar químicamente esta última. Una característica común para los procedimientos para la producción de CS descritos hasta el momento es una reducción sustancial de la masa molecular del material original tanto durante la eliminación catalizada por ácido de los restos de fructosa como durante las etapas de síntesis química requeridas para la sulfatación de los restos de GalNAc.

Como un ejemplo, el documento EP-A-1304338 describe un CS de 6-25 kDa de masa molecular, mientras que se describe que la masa molecular del polisacárido K4, utilizado como el material de partida, es de 150-400 kDa.

Kenji Uchimura et al.: "Mouse chondroitin 6-sulfotransferase: molecular cloning, characterization and chromosomal mapping", *Glycobiology*, 1 de enero de 1998, páginas 489-496, describen la caracterización de una 6-sulfotransferasa capaz potencialmente de producir de manera específica 6-sulfato de condroitina, no habiéndose caracterizado todavía de este último la estructura primaria, es decir, la composición disacárida, y las propiedades físico-químicas, es decir, parámetros de densidad de carga y masa molecular. Uchimura et al. también describen condroitina químicamente desulfatada mediante un ensayo no específico, y no distinguen entre condroitina y los oligómeros que tienen un peso molecular bajo y ninguna actividad biológica.

H. Kitagawa: "Molecular cloning and expression of a novel chondroitin 6-O-sulfotransferase", *J. of Biol. Chem.*, vol. 275, nº 28, 25 de abril de 2000, páginas 21075-21080, describen a utilización de condroitina químicamente desulfatada, resulfatada después mediante un procedimiento enzimático, pero sin describir si la desulfatación es total o si existe cualquier residuo de la sulfatación en la posición 6 (u otras). Además, no existe ninguna mención ni ninguna estimación de disacáridos no sulfatados, ya que la composición disacárida se evalúa separando solamente los disacáridos sulfatados.

Tsutsumi et al.: "Functional expression and genomic structure of human chondroitin 6-sulfotransferase", *Febs Letters*, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 441, nº 2, 18 de diciembre de 1998, páginas 235-241 y Fukuta et al.: "Molecular cloning and expression of chick chondrocyte chondroitin 6-sulfotransferase", *J. of Biol. Chem.*, The American Society Of Biological Chemists, Inc., US, vol. 270, nº 31, 4 de agosto de 1995, páginas 18575-18580, describen la caracterización de 6-sulfotransferasa humana capaz de producir 6-sulfato de condroitina (y otros derivados de condroitina) de manera específica y aún sin ninguna caracterización de sulfato de condroitina.

El documento WO 2010/136435 describe la producción de concentraciones elevadas de condroitina no sulfatada por medio de bacterias recombinantes, genéticamente mutadas insertando en ellas secuencias genéticas específicas; los Ejemplos nº 10 y 11 describen la producción de sal sódica de condroitina. El procedimiento se ilustra y explica adicionalmente por Chiara Schiraldi et al. "Purification of chondroitin precursor from *Escherichia coli* K4 fermentation broth using membrane processing", *Biotechnology Journal*, vol. 6, nº 4, 7 de marzo 2011, páginas 410-419.

El documento WO 98/34958 describe un procedimiento para la preparación de los polisacáridos K4, K5 y K40 O-sulfatados útiles para el tratamiento de patologías tumorales, por VIH-1 y de coagulación y en preparaciones cosméticas.

Chiara Schiraldi et al. "Production of chondroitin sulphate and chondroitin", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 87, nº 4, 3 de junio 2010, páginas 1209-1220, describen un repaso de las diversas aplicaciones y procedimientos de condroitina a fin de proporcionar alternativas de sulfato de condroitina a productos extraídos de fuentes naturales.

Un primer aspecto de la presente invención es un sulfato de condroitina similar al de tiburón, libre de los disacáridos tri-, tetra- y 2,4-di- sulfatados, que consiste en 60-99% de 6-sulfato, 0,5-30% de 2,6-disulfato, 0,1-5% de 4,6-disulfato, 0,1-5% de condroitina no sulfatada y 0,1-1% de 4-sulfato, expresándose todos los porcentajes con respecto al contenido total de disacárido del sulfato de condroitina similar al de tiburón, mostrando este último un peso molecular medio en número (Mn) de 40-85 kDa y un peso molecular medio en peso (Mp) de 50-95 kDa.

Preferentemente, el sulfato de condroitina similar al de tiburón de la presente invención consiste en 70-90% de 6-sulfato, 8,5-20% de 2,6-disulfato, 0,1-5% de 4,6-disulfato, 0,1-5% de condroitina no sulfatada y 0,1-1% de 4-sulfato, expresándose todos los porcentajes con respecto al contenido total de disacárido del sulfato de condroitina similar al de tiburón, mostrando este último un peso molecular medio en número (Mn) de 40-65 kDa y un peso molecular medio en peso (Mp) de 50-70 kDa.

El CS objeto de la presente invención se caracteriza por una masa molecular elevada y por grupos sulfatados peculiares, principalmente en la posición 6, así como por una cantidad muy pequeña de disacárido 4-sulfatado.

Examinando las características del CS de la presente invención y comparándolas con las mostradas en la tabla 1 anterior que se refieren a las muestras de CS extractivas naturales, se puede observar que el CS de la presente invención se asemeja aproximadamente al CS de tiburón.

También, el CS objeto de la presente invención no muestra polisacáridos polisulfatados, en particular no muestra ni

disacáridos tri- ni tetra-sulfatados que caracterizan típicamente el CS obtenido por los métodos sintéticos descritos en la técnica anterior y detectables, después de la digestión con condroitinasa ABC, como un producto no degradado.

5 Además, el CS objeto de la presente invención resulta estar altamente purificado (sobre la base de la cantidad de producto no degradado después de la digestión con condroitinasa ABC), y se distingue evidentemente del CS descrito en el documento EP-A-1304338 que tiene una masa molecular de 6-25 kDa y una cantidad elevada de condroitina no sulfatada (> 10%) y amplio intervalo de densidad de carga (0,7-2), mientras que los intervalos de la densidad de carga del CS de la invención son más estrechos y ascienden preferentemente hasta 1,05-1,30.

10 Tanto Mn como Mp pueden ser calculados de acuerdo con los métodos habituales conocidos por los expertos en la materia; por ejemplo la Cromatografía de Exclusión de Tamaños de Altas Prestaciones (HPSEC); preferentemente, Mn y Mp pueden ser determinados por HPSEC, equipado con software especializado integrado para la Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).

15 Preferentemente, la suma de 2,6-disulfato y 4,6-disulfato en el CS de la presente invención asciende hasta 10-25% del contenido total de disacárido.

20 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el sulfato de condroitina similar al de tiburón de la presente invención y un vehículo farmacéutica o nutracéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, celulosa microcristalina, dextrina, maltodextrina, ciclodextrina, sulfobutiléter beta-ciclodextrina, lecitina de soja, ácido palmitoleico, liposomas, ésteres de sacarosa, y similares.

25 Como apreciará el experto en la materia, la composición de la invención puede ser formulada en diversas formas, ya sea sólida (es decir, comprimidos, cápsulas duras, cápsulas de gel blandas) o líquida (por ejemplo, disoluciones o mezclas para beber en polvo), preferentemente en forma de una preparación farmacéutica y/o nutracéutica parenteral y/u oral, y puede comprender además otros principios inactivos y/o activos.

30 Entre tales ingredientes adicionales, la composición de la invención puede comprender también y preferentemente al menos una de las siguientes sustancias: hidrocloreuro de glucosamina, sulfato de glucosamina, N-acetilglucosamina, ácido hialurónico, heparina, queratina, dermatina, metilsulfonilmetano, folatos o folatos reducidos, vitaminas del grupo B, S-adenosilmetionina (SAME), ácido ascórbico o ascorbato de manganeso, y pueden ser administradas en una cantidad efectiva a un sujeto que lo necesite, dependiendo de las necesidades y las circunstancias que el caso pueda requerir. Únicamente a título de ejemplo, el CS similar al de tiburón y/o la composición de la presente invención pueden ser administrados en una cantidad de 100-3000 mg/día, preferentemente en una cantidad de 1000-2000 mg/día, más preferentemente en una cantidad de 1200-1800 mg/día, en general dividida en dos/tres dosis por día.

40 De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al sulfato de condroitina similar al de tiburón o a la composición de la presente invención, para uso en la prevención o tratamiento de osteoartritis, o para el mantenimiento de la salud musculoesquelética, por ejemplo como un principio activo en un fármaco o en un aditivo alimentario o un suplemento nutricional.

45 Únicamente a título de ejemplo, el CS similar al de tiburón o la composición de la presente invención, como se definió anteriormente, puede ser utilizado para la preparación de un medicamento, un aditivo alimentario o un suplemento nutricional, para la prevención y/o el tratamiento de osteoartritis (OA) de cadera, mano y rodilla y sus síntomas principales, tales como dolor, hinchazón de las articulaciones, inflamación, enfermedad de Alzheimer, infecciones microbianas, arterioesclerosis, osteoporosis y como un adyuvante en la terapia contra el cáncer y la regeneración de tejidos, incluyendo la regeneración del tejido nervioso.

50 De acuerdo con todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar la condroitina similar al de tiburón anteriormente definida, que comprende:

- 55 a) salificar condroitina no sulfatada, como ácido libre, previamente disuelta en un ambiente acuoso, con una sal seleccionada del grupo que consiste de tetrametil-, tetraetil- y tetrabutíl-amonio o piridinio;
- b) secar la condroitina no sulfatada salificada que resulta de la etapa a) hasta 5-15% de contenido de agua;
- 60 c) secar la condroitina no sulfatada salificada que resulta de la etapa b), a una temperatura de 100°C-170°C, hasta un contenido de agua de 0,1-3%;
- 65 d) sulfatar selectivamente la posición 6 de la condroitina no sulfatada salificada resultante de la etapa c), solubilizada en N-metil-pirrolidona o dimetilformamida, a una temperatura de 0°C-30°C, añadiendo 1-2 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-piridina o el complejo de trióxido de azufre-dimetilformamida, a intervalos de tiempo de 1-3 horas, hasta que se añada un total de 2-15 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-piridina o del complejo de trióxido de azufre-dimetilformamida; dejando la disolución

resultante bajo agitación durante 2-24 horas;

- 5 e) interrumpir ("quenching") la reacción llevada a cabo en la etapa d) con una disolución acuosa de bicarbonato o carbonato de sodio, filtrando y concentrando hasta sequedad la disolución resultante para obtener un sólido seco;
- f) disolver el sólido seco en una disolución acuosa de cloruro de sodio, ultrafiltrando y dializando la disolución resultante;
- 10 g) recuperar el producto de la disolución resultante de la etapa f);
- h) purificar el producto resultante de la etapa g), y obtener este último ya sea en forma ácida o como la sal de sodio del mismo;
- 15 i) recuperar el producto resultante de la etapa h).

20 La salificación de la condroitina no sulfatada en la etapa a) se lleva a cabo preferentemente con una sal seleccionada de entre el grupo que consiste en tetrametil-, tetraetil- y tetrabutyl-amonio, todavía más preferentemente con tetrabutyl-amonio, mientras que el secado de la condroitina no sulfatada en la etapa b) se puede llevar a cabo mediante liofilización o secado por rocío.

25 El secado de la sal de condroitina no sulfatada en la etapa c) se lleva a cabo preferentemente hasta 0,5-2% agua, mientras que la solubilización de la sal de condroitina no sulfatada que resulta de dicha etapa se lleva a cabo preferentemente en dimetilformamida.

30 La sulfatación selectiva en la etapa d) se lleva a cabo preferentemente añadiendo un total de 6-12, más preferentemente 6-9, equivalentes de complejo de trióxido de azufre-piridina. Alternativamente, cuando la sulfatación selectiva en la etapa d) se lleva a cabo por el complejo de trióxido de azufre-dimetilformamida, se añade un total de 1-9, preferentemente 2-4, equivalentes.

35 Además, la sulfatación selectiva en la etapa d) se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de 10°C-20, mientras que, al final de la etapa d), la disolución resultante se deja preferentemente bajo agitación durante 2-6 horas.

40 De acuerdo con todavía otra forma de realización preferida del procedimiento de la invención, el producto de la disolución resultante de la etapa f) es recuperado mediante liofilización, secado por pulverización o precipitación en un ambiente alcohólico.

El procedimiento de la invención permite el mantenimiento sin cambio del peso molecular del polisacárido nativo.

45 Sorprendentemente, el procedimiento de la invención permite evitar llevar a cabo cualquier etapa dirigida a proteger cualquiera de los grupos hidroxilo secundarios, probablemente debido a que la reactividad de los grupos hidroxilo primarios en la posición 6 del GalNAc que garantiza la selectividad de la reacción.

Además, el procedimiento de la invención permite obtener una productividad sustancialmente más alta y una mejor reproducibilidad de la calidad del producto en comparación con la técnica anterior; por ejemplo, con respecto al documento EP-A-1304388, en el que las etapas de sulfatación dan como resultado un intervalo más amplio de relación de grupos carboxilo/sulfato, que asciende a 0,7-2,0.

50 También, el procedimiento de la invención permite obtener un producto que muestra cantidades muy bajas de disacárido 4-sulfatado y sustancialmente libre de disacáridos polisulfatados; en particular, permite obtener un producto libre ya sea de sacáridos triS o tetraS.

55 Típicamente, el procedimiento de la invención puede ser llevado a cabo mediante disolviendo condroitina no sulfatada, como ácido libre o la sal de sodio, preparada por ejemplo desfructosilando el polímero capsular K4 obtenido mediante fermentación, como se describe por Manzoni (Biotechnology Letters 18, 383-6, 1996) y Rodríguez (Eur. J. of Biochem 177, 117-24, 1988), en un ambiente acuoso.

60 En el caso en que la condroitina no sulfatada esté bajo la forma de su sal de sodio, después de su disolución completa, la disolución resultante es eluida, convenientemente a una temperatura de 0°C-30°C, en una columna que contiene una resina de intercambio catiónico (tal como, por ejemplo, Amberjet 1200 H, Rohm and Haas y similar) recolectando las porciones eluidas convenientemente a un pH de 1,5-4,0, preferentemente 1,5-3,0, y recuperando las porciones ácidas acuosas.

65 Alternativamente, esta etapa puede ser llevada a cabo en lotes: después de la disolución de la sal de sodio de condroitina no sulfatada, en agua, la cual es preferentemente obtenida agitando 20-60 minutos a 0°C-30°C, se le

añade la resina catiónica (Amberjet 1200 H, Rohm and Haas y similar), el pH de la disolución después de la adición de la resina resulta que está entre 1,5 y 3,0. Después, la disolución se filtra, y se recoge el filtrado ácido resultante.

5 La disolución ácida de la condroitina no sulfatada, obtenida ya sea directamente disolviendo la condroitina no sulfatada como ácido libre o purificando su disolución de sal de sodio como se describió anteriormente, ya sea en forma continua o en lotes, se añade después con una disolución acuosa de un ion seleccionado del grupo que consiste en tetrametil-, tetraetil- y tetrabutil-, amonio o piridinio, convenientemente hasta un pH de 6,0-8,0, preferentemente 6,0-7,0, la disolución es evaporada hasta sequedad, por ejemplo mediante liofilización o secado por pulverización, hasta un contenido de agua de 5-15%, para recuperar así la sal de condroitina correspondiente.

10 La sal de condroitina resultante se somete después a una segunda etapa de secado, a una temperatura de 100°C-170°C, hasta un contenido de agua de 0,1-3%, para recuperar así finalmente la sal de condroitina no sulfatada correspondiente.

15 La sal de condroitina no sulfatada correspondiente, obtenida como se describió anteriormente, se sulfata después selectivamente en la posición 6, sin la necesidad de proteger ninguna de los restos funcionales, al solubilizarla en un disolvente seleccionado de N-metilpirrolidona o dimetilformamida, a una temperatura de 0°C-30°C, preferentemente 10°C-20°C, eluyendo convenientemente la sal de condroitina no sulfatada completamente disuelta en una columna que contiene una resina de intercambio catiónico (tal como, por ejemplo, Amberjet 1200 H, Rohm and Haas y similar), añadiendo 1-2 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-piridina o del complejo de trióxido de azufre-dimetilformamida, a intervalos de tiempo de 1-3 horas, hasta que se añade un total de 2-15 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-piridina o dimetilformamida, dejando la disolución resultante bajo agitación durante 2-24 h, preferentemente 2-6 h.

25 La masa de reacción resultante se interrumpe después en una disolución acuosa de bicarbonato o carbonato de sodio, y después se recupera, por ejemplo mediante tratamiento con bicarbonato de sodio y filtración de las sales insolubles resultantes, se evapora hasta sequedad y nuevamente se disuelve en una disolución acuosa de cloruro de sodio, se recupera y finalmente se trata, por ejemplo mediante ultrafiltración y diálisis, para eliminar así las sales remanentes y las impurezas de bajo peso molecular, y finalmente recuperando el producto, por ejemplo, mediante liofilización, secado por pulverización o precipitación en un ambiente alcohólico.

30 El 6-sulfato de condroitina resultante obtenido como se ilustró anteriormente se purifica después; por ejemplo mediante cromatografía en columna de resina de intercambio catiónico, para obtenerlo así en su forma ácida, y – posiblemente – se obtiene a continuación como la sal de sodio del mismo añadiendo, por ejemplo, hidróxido de sodio.

35 El 6-sulfato de condroitina así obtenido se recupera finalmente, por ejemplo secándolo en un horno, a vacío, a 50°C-70°C, o se purifica cromatográficamente, obteniendo un sulfato de condroitina similar al de tiburón, libre de disacáridos tri-, tetra- y 2,4-di- sulfatados, que muestra un Mn de 40-85 kDa, un Mp de 50-95 kDa.

40 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

45 Salificación

50 Se disolvieron en agua desmineralizada (500 ml) 20 g de sal sódica de condroitina, preparada desfructosilando el polímero capsular K4 obtenido mediante fermentación como se describe por Manzoni (Biotechnology Letters 18, 383-6, 1996) y Rodriguez (Eur. J. of Biochem 177, 117-24, 1998). Tras la disolución total, la disolución resultante se eluyó a 5°C en una columna que contiene una resina de intercambio catiónico (160 ml de Amberjet 1200 H, Rohm and Haas), previamente hidratada y preparada en forma ácida. Las porciones eluidas se recuperaron a un pH de 1,9, recogiendo las porciones ácidas acuosas y añadiéndoles una disolución acuosa al 16% de tetrabutilamonio, hasta un pH de 7,0; la disolución se evaporó entonces hasta sequedad liofilizando para recuperar 20,8 g de condroitina como sal de tetrabutilamonio.

55 La sal resultante se sometió entonces a un segundo tratamiento térmico en una secadora estática a 105°C durante 4 h, a vacío, hasta una humedad residual menor de 0,2%. Se obtuvieron así 18,5 g de condroitina como sal de tetrabutilamonio.

60 **Ejemplo 2**

Salificación

65 Se disolvieron en 20 ml de agua desmineralizada 12 g de condroitina no sulfatada preparada desfructosilando el polímero capsular K4 obtenido mediante fermentación como se describe por Manzoni (Biotechnology Letters 18,

383-6, 1996) y Rodriguez (Eur. J. of Biochem 177, 117-24, 1998), y, tras acidificar hasta pH 2,5 mediante HCl 1M y añadir 80 ml de etanol, la condroitina no sulfatada precipitó como ácido libre.

5 Tras filtrar y lavar con etanol, se obtuvieron 10,3 g del producto como un sólido blanco que, después de haberlo secado a vacío a 50°C, mostró un título ácido de 90%, calculado en el producto *per se* y que contenía 8% de agua residual. El sólido resultante se suspendió en 20 ml de agua y se añadió con una disolución acuosa al 40% p/p de hidróxido de tetrabutilamonio hasta pH 8. La disolución resultante se liofilizó entonces hasta 2,5% de agua residual, para obtener 15,9 g de condroitina sólida como sal de tetrabutilamonio.

10 La sal resultante se sometió entonces a un segundo tratamiento térmico en una secadora estática a 105°C durante 4 h, a vacío, hasta una humedad residual menor de 0,2%. Se obtuvieron así 15,4 g de tetrabutilcondroitina.

Ejemplo 3

15 Sulfatación

Se cargaron 1,4 g de tetrabutilcondroitina, obtenida como se ilustra en el ejemplo 1, y 84 ml de DMF en un matraz de cuatro bocas de 250 ml, en una atmósfera inerte (N₂), agitando mecánicamente y en presencia de un sistema de enfriamiento de burbujeo, con trampa de cloruro de calcio y termómetro.

20 La suspensión resultante se dejó agitando hasta la disolución total, ajustando a continuación la temperatura a 23°C.

25 Una vez que se ajustó la temperatura, se añadió en porciones el complejo sólido de trióxido de azufre-piridina (1,07 g, 3 eq.) a la disolución, manteniendo la reacción en agitación durante 1 h y añadiendo después más complejo sólido de trióxido de azufre-piridina (1,07 g; 3 eq.). Después de agitar 1 h adicional a la misma temperatura, la mezcla de reacción se transfirió a un matraz de 500 ml, que contiene una disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y se enfrió a 10°C.

30 Después de dejar que la temperatura se elevase hasta 20°C, se llevó a cabo la filtración en un Buchner, recuperando el filtrado y evaporándolo hasta sequedad a vacío.

35 El sólido seco resultante (2,3 g) se molió finamente y se redisolvió en una disolución 0,3M de NaCl (130 ml), sometiendo la disolución así obtenida a ultrafiltración usando una membrana de 3 kDa de corte y manteniendo el pH del retenido a 7,0. La disolución ultrafiltrada se dializó entonces para eliminar las sales, recuperando el producto mediante liofilización.

40 El producto resultante se secó finalmente a 50°C y 10 mbares, hasta que se obtuvo 1 g de sustancia, que muestra un título (calculado determinando la detección amperométrica pulsada "PAD" de ácido glucurónico) de 95%, un Mn de 60 kDa y un Mp de 67,3 kDa, determinado mediante cromatografía de exclusión de tamaños de altas prestaciones (HPSEC) equipada con un software especializado integrado para GPC.

Ejemplo 4

45 Sulfatación

Se cargaron 1,21 g de condroitina como sal de tetrabutilamonio, obtenida como se ilustra en el ejemplo 1, y 72 ml de DMF en un matraz de cuatro bocas de 250 ml mantenido en una atmósfera inerte (N₂), agitando mecánicamente y en presencia de un sistema de enfriamiento de burbuja, con trampa de cloruro de calcio y termómetro.

50 La disolución resultante se dejó agitar hasta la disolución total, ajustando a continuación la temperatura a 10°C.

55 Una vez que se ajustó la temperatura, se añadió complejo sólido de trióxido de azufre-DMF (0,88 g, 3 eq.) a la disolución, manteniendo la reacción bajo agitación durante 1 h. Se añadió hidrogenocarbonato de sodio (0,97 g, 6 eq.), manteniendo la misma temperatura, y la agitación se continuó durante 1 h dejando que la temperatura se elevase hasta 20°C. La suspensión resultante se filtró en un Buchner, y el filtrado recuperado se evaporó hasta sequedad a vacío.

60 El sólido seco resultante (2,05 g) se molió finamente y se redisolvió en una disolución 0,3M de NaCl (130 ml), sometiendo la disolución así obtenida a ultrafiltración usando una membrana de 3 kDa de corte y manteniendo el pH del retenido a 7,0. La disolución ultrafiltrada se dializó entonces para eliminar sales, recuperando el producto mediante liofilización.

65 El producto resultante se secó finalmente a 50°C y 10 mbares, hasta que se obtuvieron 0,95 g de sustancia, que muestra un título (calculado determinando PAD de ácido glucurónico) de 94%, un Mn de 62 kDa y un Mp de 68,3 kDa, determinado mediante cromatografía de exclusión de tamaños de altas prestaciones (HPSEC) equipada con un software especializado integrado para GPC.

Ejemplo 5

Análisis de 6-sulfato de condroitina

5 La composición del CS obtenido de los ejemplos 3 y 4, se estudió mediante HPLC de sus productos de digestión tratando el CS obtenido como se describe anteriormente con condroitinasa ABC, de acuerdo con el método descrito por Joon-Soo Sim et al. (J. Chromatography B, 2005 vol. 818, páginas 133-139).

10 El análisis se llevó a cabo usando una columna HPLC-SAX, 250 x 4,6 mm 10 µm, eluyendo con gradiente, partiendo de 3,5 mM de HCl (pH = 3,5) (100%) de fase inicial hasta una concentración igual a 1M de NaCl en HCl 3,5 mM (pH = 3,5) (100%). Los mismos productos que resultan de la digestión con condroitinasa ABC se analizaron en análisis de FACE (electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo) a fin de señalar la presencia de polisacárido no digerido. Los resultados muestran una tasa de digestión de aproximadamente 95%. La tasa elevada de digestión
15 indica la ausencia sustancial de disacáridos tri- y/o tetra-sulfatados en la estructura del CS obtenido.

La siguiente tabla 2 presenta los disacáridos principales identificados para los productos preparados en los ejemplos 3 y 4.

20

Tabla 2

	CS (Ejemplo 3)	CS (Ejemplo 4)
Masa molecular:		
Mn (kDa)	55,2	62
Mp (kDa)	67,3	68,3
Polidispersidad	1,2	1,2
Diasacáridos:		
Di-0S	3,5	2,8
Di-6S	72,1	83,1
Di-4S	0,1	0,2
Di-2,6diS	18,9	13,8
Di-4,6diS	3,5	0,1
Di-2,4diS	ND	ND
triS	ND	ND
tetraS	ND	ND
Densidad de carga	1,21	1,10
<i>Mn = peso molecular medio en número; Mp = peso molecular medio en peso; índice de polidispersidad = Mp/Mn; la densidad de carga es el número de grupos sulfato por unidades disacáridas; ND = no detectado</i>		

25

Comparando la tabla anterior con la tabla 1, se puede apreciar que la composición del CS objeto de la presente invención muestra que se parece estrechamente a CS de tiburón, puesto que el primero muestra cantidades muy bajas de Di-4S y está compuesto principalmente de Di-6S mientras que Di-0S, Di-2,6diS y Di-4,6diS resultaron ser aproximadamente superponibles con los valores dados a conocer para CS de tiburón; además, el CS de la presente invención mostró una densidad de carga mayor que 1,0. También, los productos obtenidos llevando a cabo tanto el ejemplo 3 como 4 no mostraron formas triS ni tetraS de CS.

30

Además, el CS objeto de la presente invención muestra un contenido de sulfato peculiar cuando se compara con algunos de los productos descritos en la técnica anterior, como se ilustra en la siguiente tabla 3.

Tabla 3

	Di-0S	Di-4S	Di-6S	Di-4,6diS	Di-2,6diS
EP-A-1304388	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO
WO 2009/149155	NO	SÍ	SÍ	NO	NO
EP-A-1964924	SÍ	NO	NO	NO	NO
EP-A-1950308	SÍ	NO	NO	NO	NO
MI2010A001300	SÍ	NO	NO	NO	NO
CS similar al de tiburón (Ejemplo 3)	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
CS similar al de tiburón (Ejemplo 4)	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ

35

Ejemplo 6

Puesto que la eficacia de CS está estrictamente relacionada con su actividad antiinflamatoria, tal como su capacidad para inhibir la actividad de enzimas degradantes como elastasa leucocitaria humana (HLE), el CS objeto de la presente invención se ensayó *in vitro* para determinar su capacidad para inhibir tal actividad de HLE, y se comparó con CS bovino (1st European Pharmacopoeia CS Standard) y CS extraído de muestras de cartílago de tiburón.

5 Los resultados comparativos se muestran en la Figura 1.

10 Una muestra de CS similar al de tiburón, de acuerdo con la presente invención, según se obtiene de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, se comparó con CS bovino (1st European Pharmacopoeia CS Standard) vendido por Bioiberica y con CS extraído de cartílagos de tiburón.

15 La actividad de elastasa se determinó mediante ensayo espectrofotométrico utilizando un sustrato artificial cromogénico (N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida) específico para HLE. Tras la preincubación de la enzima con cantidades crecientes de CS, la actividad se determinó mediante incubación con sustrato cromogénico (N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida). Tras detener la reacción, el producto resultante se determinó cuantitativamente mediante evaluación espectrofotométrica.

Tabla 4

µg	Inhibición de HLE (%)		
	CS bovino (comparativo)	CS de tiburón (comparativo)	CS similar al de tiburón (invención)
1,0	0,0	0,0	0,0
2,5	0,0	10,5	6,7
5,0	12,8	33,7	21,9
7,5	24,9	51,4	36,1
10,0	40,6	68,0	50,3

20 La figura 1 ilustra los datos dados a conocer en la tabla 4, y muestra que el CS similar al de tiburón de la presente invención puede inhibir significativamente la actividad de elastasa leucocitaria humana, de manera eficaz, comparable a la mostrada por las muestras de CS naturales.

25 La actividad biológica y las propiedades antiinflamatorias presentadas *in vitro* por el CS objeto de la presente invención hacen a este último comparable a los productos naturales, y por lo tanto potencialmente útil como fármaco en preparaciones farmacéuticas y nutracéuticas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sulfato de condroitina similar al de tiburón, libre de disacáridos tri-, tetra- y 2,4-di- sulfatados, que consiste en 60-99% de 6-sulfato, 0,5-30% de 2,6-disulfato, 0,1-5% de 4,6-disulfato, 0,1-5% de condroitina no sulfatada y 0,1-1% de 4-sulfato, expresándose todos los porcentajes con respecto al contenido de disacárido total del sulfato de condroitina similar al de tiburón, presentando este último un peso molecular medio en número (Mn) de 40-85 kDa y un peso molecular medio en peso (Mp) de 50-95 kDa.
- 10 2. Sulfato de condroitina similar al de tiburón según la reivindicación 1, que consiste en 70-90% de 6-sulfato, 8,5-20% de 2,6-disulfato, 0,1-5% de 4,6-disulfato, 0,1-5% de condroitina no sulfatada y 0,1-1% de 4-sulfato, expresándose todos los porcentajes con respecto al contenido de disacárido total del sulfato de condroitina similar al de tiburón, presentando este último un peso molecular medio en número (Mn) de 40-65 kDa y un peso molecular medio en peso (Mp) de 50-70 kDa.
- 15 3. Sulfato de condroitina similar al de tiburón según la reivindicación 1 o 2, en el que la suma de 2,6-disulfato y 4,6-disulfato asciende a 10-25% del contenido de disacárido total.
- 20 4. Sulfato de condroitina similar al de tiburón según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis, o para el mantenimiento de la salud musculoesquelética.
- 25 5. Composición que comprende el sulfato de condroitina similar al de tiburón según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo farmacéutica o nutracéuticamente aceptable.
- 30 6. Composición según la reivindicación anterior, para su utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis, o para el mantenimiento de la salud musculoesquelética.
- 35 7. Procedimiento para preparar la condroitina similar a la de tiburón según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
- 40 a) salificar una condroitina no sulfatada, preparada desfructosilando el polímero capsular de *E. coli* K4 obtenido mediante fermentación, como ácido libre, disuelta previamente en un ambiente acuoso, con una sal seleccionada de entre el grupo que consiste en tetrametil-, tetraetil- y tetrabutil-, amonio o piridinio;
- 45 b) secar la condroitina no sulfatada salificada, como ácido libre y/o sal de sodio, que resulta de la etapa a) hasta 5-15% de contenido de agua;
- 50 c) secar la condroitina no sulfatada salificada resultante de la etapa b), a una temperatura de 100°C-170°C, hasta 0,1-3% de contenido de agua;
- 55 d) sulfatar selectivamente la posición 6 de la condroitina no sulfatada salificada resultante de la etapa c), solubilizada en N-metil-pirrolidona o dimetilformamida, a una temperatura de 0°C-30°C, añadiendo 1-2 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-piridina o el complejo de trióxido de azufre-dimetilformamida, a unos intervalos de tiempo de 1-3 horas, hasta que se añade un total de 2-15 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-piridina o del complejo de trióxido de azufre-dimetilformamida; dejando la disolución resultante bajo agitación durante 2-24 horas;
- 60 e) interrumpir la reacción llevada a cabo en la etapa d) con una disolución acuosa de bicarbonato o carbonato de sodio, filtrar y concentrar hasta sequedad la disolución resultante para obtener un sólido seco;
- 65 f) disolver el sólido seco en una disolución acuosa de cloruro de sodio, ultrafiltrar y dializar la disolución resultante;
- g) recuperar el producto de la disolución resultante de la etapa f);
- h) purificar el producto resultante de la etapa g), y obtener este último o en forma ácida o como la sal de sodio del mismo;
- i) recuperar el producto resultante de la etapa h) que presenta un peso molecular medio en número (Mn) de 40-85 kDa y un peso molecular medio en peso (Mp) de 50-95 kDa.
8. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la salificación de la condroitina no sulfatada en la etapa a) se lleva a cabo con una sal seleccionada de entre el grupo que consiste en tetrametil-, tetraetil- y tetrabutil-amonio.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que la salificación de la condroitina no sulfatada en la etapa a) se lleva a cabo con tetrabutilamonio.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el secado de la condroitina no sulfatada en la etapa b) se lleva a cabo mediante liofilización o secado por pulverización.
- 5 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el secado de la sal de condroitina no sulfatada en la etapa c) se lleva a cabo hasta 0,5-2% de agua.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la solubilización de la sal de condroitina no sulfatada resultante de la etapa c) se lleva a cabo en dimetilformamida.
- 10 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que la sulfatación selectiva en la etapa d) se lleva a cabo añadiendo un total de 6-12 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-piridina.
- 15 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que la sulfatación selectiva en la etapa d) se lleva a cabo añadiendo un total de 6-9 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-piridina.
- 15 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que la sulfatación selectiva en la etapa d) se lleva a cabo añadiendo un total de 1-9 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-dimetilformamida.
- 20 16. Procedimiento según la reivindicación anterior, en el que la sulfatación selectiva en la etapa d) se lleva a cabo añadiendo un total de 2-4 equivalentes del complejo de trióxido de azufre-dimetilformamida.
17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sulfatación selectiva en la etapa d) se lleva a cabo a una temperatura de 10°C-20°C.
- 25 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al final de la etapa d), la disolución resultante se deja en agitación durante 2-6 h.
19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa g), el producto se recupera mediante liofilización, secado por pulverización o precipitación en un ambiente alcohólico.
- 30 20. CS o composición según las reivindicaciones 1 a 3 y 5, para su utilización en un método para el tratamiento o la prevención de la osteoartritis, o para el mantenimiento de la salud musculoesquelética, que comprende administrar a un paciente que la necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un CS o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5.
- 35

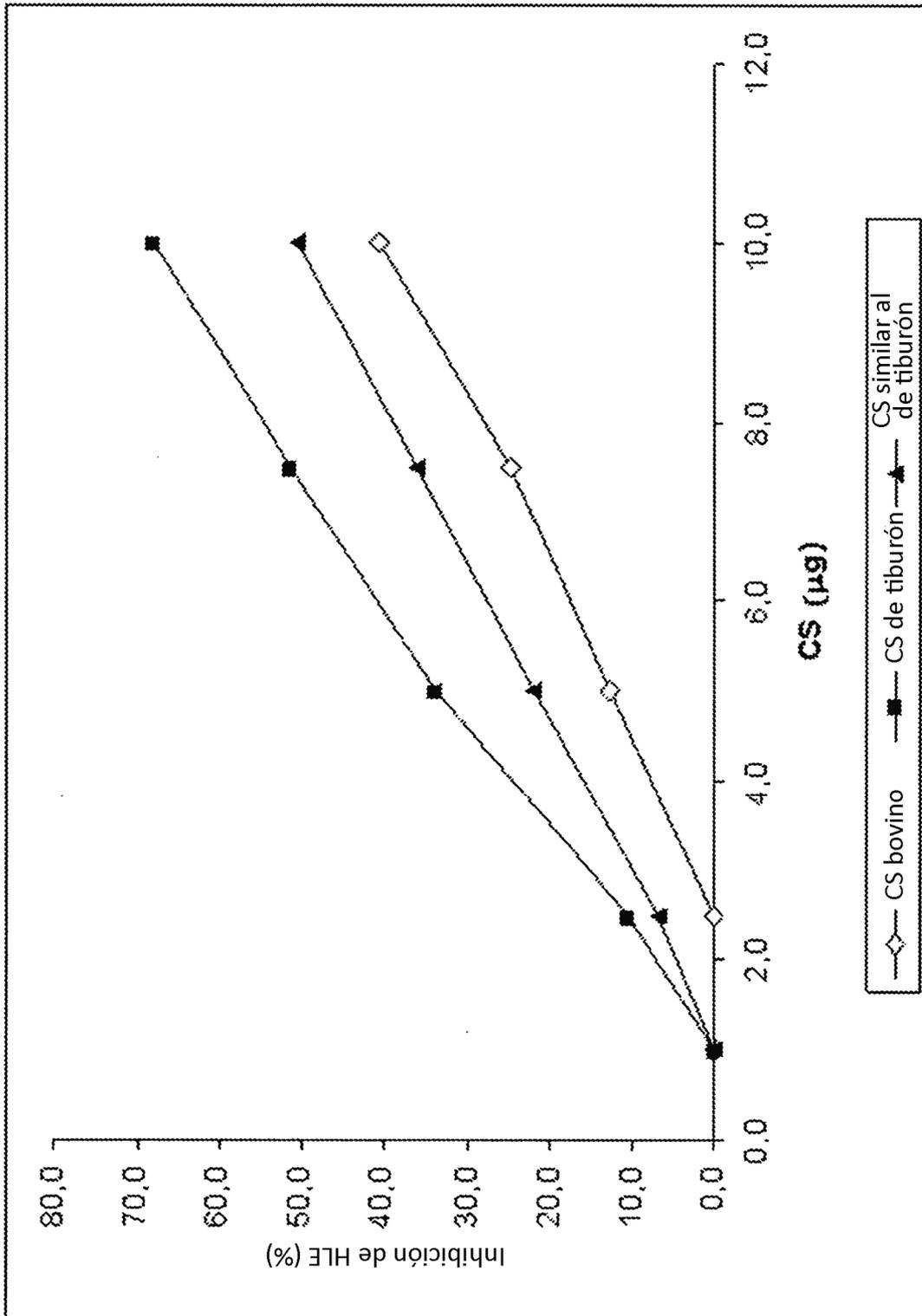


Fig. 1