

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 823**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/EP2014/051347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14703299 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2948481**

54 Título: **Método para la calificación de preparaciones de pentosano polisulfato, materias primas y procesos de producción de estas**

30 Prioridad:

**24.01.2013 IT MI20130112**

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

**30.11.2017**

73 Titular/es:

**CHEMI SPA (100.0%)  
Via Dei Lavoratori, 54  
20092 Cinisello Balsamo (MI), IT**

72 Inventor/es:

**DE FERRA, LORENZO;  
NAGGI, ANNAMARIA;  
ZENONI, MAURIZIO y  
PINTO, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 644 823 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

Método para la calificación de preparaciones de pentosano polisulfato, materias primas y procesos de producción de estas

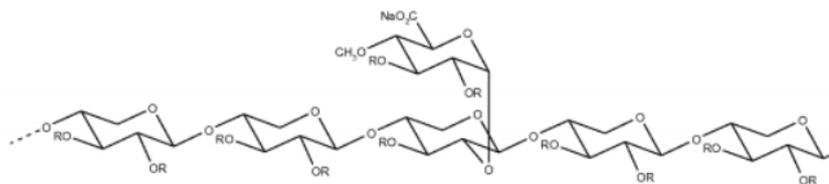
La presente invención se refiere a métodos y productos basados en la identificación de las unidades estructurales características de pentosano polisulfato y el xilano correspondiente sin grupos sulfato, en particular a productos obtenidos mediante un método de calificación y selección de procesos de producción, materias primas, intermediarios, lotes de producción de pentosano polisulfato basado en la identificación de dichas unidades estructurales características.

Estado de la técnica

Diversos productos farmacéuticos (por ejemplo, Elmiron<sup>®</sup>, CCRIS 8869, Fibrase<sup>®</sup>, Fibrezym<sup>®</sup>, HSDB 7294, Hoe/bay 946, NSC 626201, SP-54, Thrombocid<sup>®</sup>, PZ68, Hemoclar<sup>®</sup>, Fibrocid<sup>®</sup> y Tavan<sup>®</sup>) contienen, como ingrediente activo, pentosano polisulfato, un polisacárido cuyo esqueleto principal se constituye de secuencias de unidades de xilosa sulfatada unidas entre sí a través de un enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídico.

Al obtenerse a partir de xilanos extraídos de árboles altos como el haya, las ramificaciones del ácido 4-O-metil-glucurónico se presentan y distribuyen de una manera no necesariamente regular.

La estructura química del pentosano polisulfato informada en la literatura técnica y científica corresponde a la siguiente fórmula 1:



Fórmula 1

en donde R es H o SO<sub>3</sub>Na.

El producto comercial Elmiron<sup>®</sup> tiene un alto grado de sulfatación y su peso molecular es de 4000 - 6000 Dalton. Por lo tanto, el pentosano polisulfato se compone de una mezcla de polisacáridos sulfatados diferentes entre sí en cuanto a longitud de la cadena y ramificación. El pentosano polisulfato se usa en el campo farmacéutico como anticoagulante y en el tratamiento de la cistitis intersticial. Además muestra otras numerosas actividades biológicas que incluyen actividad antitumoral y antimetastásica, actividad antiviral y antiinflamatoria. Se ha propuesto como un agente terapéutico en la prevención y el tratamiento de la enfermedad priónica. Tiene efecto en la inhibición del crecimiento de los cristales de oxalato de calcio los cuales conducen a la formación de cálculos renales. Además mostró eficacia como agente antiartrítico en animales que padecen de osteoartritis.

El grado de polimerización y la variedad estructural pueden influir fuertemente en la actividad biológica, inmunológica y toxicológica de los polisacáridos y de los polisacáridos sulfatados [T.Astrup Scand J Clin Lab Invest 137 (1952)].

Por lo tanto, es extremadamente importante un conocimiento profundo de las características estructurales del pentosano polisulfato para asegurar la eficacia terapéutica y la seguridad de los tratamientos farmacológicos que lo usan.

Debido al origen natural de la materia prima y debido a los procesos de aislamiento y producción, pueden presentarse en la cadena polimérica de xilano polisulfato agrupamientos estructurales que contribuyen a incrementar su complejidad estructural. Por ejemplo, además de xilosa sulfatada y ácido 4-O-metil-glucurónico sulfatado, pueden presentarse diferentes unidades de monosacáridos.

Además, pueden presentarse diferentes especies poliméricas sulfatadas y no sulfatadas, tales como, por ejemplo, las derivadas a partir de otros polisacáridos presentes en la fuente natural de la materia prima.

En particular, la complejidad estructural del pentosano polisulfato puede aumentar adicionalmente en dependencia del método para la extracción del xilano a partir de la fuente natural de la materia prima. De hecho dicho método de extracción, en dependencia de su selectividad, proporcionará xilano con diferentes características y diferentes grados de pureza. Además, durante la transformación del xilano en el producto final, es posible que se introduzcan nuevas impurezas y que se produzca la transformación de los grupos químicos presentes o la introducción de nuevos grupos químicos en la estructura polimérica. Estos factores pueden contribuir además a la complejidad del producto en su conjunto.

En la actualidad, la caracterización estructural del pentosano polisulfato no se ha llevado al nivel de los detalles requeridos en vista de la complejidad del producto y por lo tanto no se adecua a la necesidad de garantizar el estándar de calidad y la equivalencia de la producción de los fármacos en el mercado y a la prueba de la equivalencia de los productos farmacéuticos genéricos.

Por lo tanto, se necesita urgentemente un progreso en la caracterización analítica del pentosano polisulfato y en la identificación de sus unidades estructurales características.

En el presente contexto, unidad estructural característica significa una parte de la estructura química del pentosano polisulfato o del xilano usado para su preparación. Sobre la base de dicha unidad estructural característica pueden calificarse diversas composiciones o métodos de preparación de estos polisacáridos.

La calificación significa el reconocimiento de la idoneidad de una composición de polisacárido o de un método para su preparación para la fabricación de un producto farmacéutico para el uso humano.

#### Resumen de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que la estructura del pentosano polisulfato en los productos farmacéuticos se caracteriza por la presencia de algunas unidades estructurales características que no se han identificado hasta ahora en la estructura química de la fórmula 1 informada en la literatura.

Dichas unidades estructurales características se han identificado por el solicitante y son unidades de monosacáridos acetilados, y en particular unidades de xilosa acetilada sustituida con ácido 4-O-metil-glucurónico.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a métodos para identificar la presencia de dichas unidades estructurales características en el pentosano polisulfato y en el xilano y a su aplicación para la calificación de preparaciones de pentosano polisulfato, sus materias primas tales como el xilano y sus procesos de producción.

Un objeto adicional de la presente invención es un método para la preparación de pentosano polisulfato y xilano que comprende al menos una etapa de calificación basada en dichas unidades estructurales características.

#### Breve descripción de los dibujos

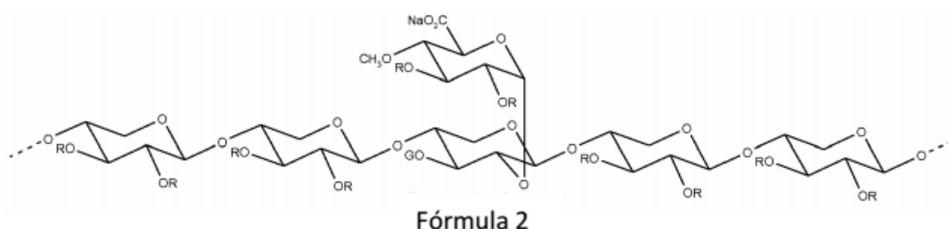
Fig. 1 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de pentosano polisulfato

Fig. 2 - (A) Espectro de RMN HSQC de pentosano polisulfato (XS) y (B) de xilano sin grupos sulfato obtenido mediante desulfatación del pentosano polisulfato (XS<sub>DS</sub>)

Fig. 3 - Espectro Maldi-TOF de xilano XS<sub>DS</sub>

#### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polisacáridos de la fórmula 2



en donde

R es H o SO<sub>3</sub>Na;

G es H, SO<sub>3</sub>Na o acetilo;

obtenido mediante un método que comprende al menos una etapa de identificación o cuantificación de unidades de monosacáridos acetilados, y en particular unidades de xilosa acetilada sustituida con ácido 4-O-metil-glucurónico.

El pentosano polisulfato de la fórmula 2 se caracteriza por la presencia de unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico y acetiladas (G = acetilo) las cuales representan unidades estructurales características identificadas por el solicitante.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a métodos para identificar la presencia de dichas unidades estructurales características en el pentosano polisulfato así como también en el xilano y a su aplicación para la calificación de preparaciones de pentosano polisulfato, sus materias primas (xilanos) y sus procesos de producción.

En una modalidad adicional, la presente invención se refiere al xilano de la fórmula 2 en donde R es hidrógeno y G es hidrógeno o acetilo caracterizado por la presencia de unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico y acetiladas (G = acetilo) las cuales representan unidades estructurales características identificadas por el solicitante.

5 La invención se basa en el descubrimiento de que la estructura del pentosano polisulfato presente en productos farmacéuticos se caracteriza por la presencia de algunas unidades estructurales características las cuales pueden correlacionarse con la eficacia terapéutica y la seguridad del pentosano polisulfato.

10 En el presente contexto, los términos "pentosano polisulfato para uso farmacéutico", "productos farmacéuticos que contienen pentosano polisulfato" y "pentosano polisulfato comercial" significan productos en el mercado y/o productos conocidos los cuales contienen pentosano polisulfato como ingrediente activo para uso farmacéutico, con referencia preferida al producto medicinal comercializado bajo el nombre de Elmiron®.

15 Mediante el análisis de muestras de pentosano polisulfato comercial mediante espectroscopía RMN-<sup>1</sup>H, en particular Elmiron®, se han detectado las señales que corresponden a la estructura de polisulfato con alto grado de sulfatación de la fórmula 1, en donde los grupos R son principalmente grupos sulfato, y además se ha encontrado inesperadamente que el espectro muestra la presencia de señales a aproximadamente 2,3 ppm que corresponde a la presencia de grupos acetilo y la división de algunos picos. En particular, se destaca la división de la señal a aproximadamente 3,48 ppm que corresponde al grupo metoxi de las unidades de ácido 4-O-metil-glucurónico (Figura 1). Además, se han detectado  
20 señales en la región de 8,8 - 9,3 ppm debido a grupos piridinio derivados del procedimiento de sulfatación usado para la producción de pentosano polisulfato para uso farmacéutico.

25 La presencia de grupos piridinio unidos al pentosano polisulfato se informa en la literatura, por ejemplo en WO03073106 y Carbohydrate Polymers 16 (1991) 211 - 214.

Por el contrario, no se espera la división de la señal de RMN-<sup>1</sup>H con relación al grupo metoxi de la unidad del ácido 4-O-metil-glucurónico y la presencia de señales que corresponden a grupos acetilo sobre la base de la estructura química del pentosano polisulfato informada en la literatura técnica y científica y representada por la fórmula 1.

30 El solicitante ha tomado en consideración la posibilidad de que la señal de RMN a aproximadamente 2,3 ppm se causó por trazas de solventes o sales usadas en el proceso de producción de pentosano polisulfato y no eliminadas completamente durante la purificación. Los análisis químicos tales como la determinación de los aniones libres mediante HPLC, el análisis de solventes residuales por cromatografía gaseosa y la comparación de los desplazamientos químicos RMN-<sup>1</sup>H en la región de 2,3 ppm, permitieron excluir la presencia de especies tales como ion acetato y solventes tales como ácido acético y acetato de etilo en cantidades tales como para justificar la presencia de la señal de RMN-<sup>1</sup>H a  
35 aproximadamente 2,3 ppm en el espectro de pentosano polisulfato mostrado en la Figura 1.

Dicha señal de RMN-<sup>1</sup>H se atribuyó entonces a la presencia de un grupo acetilo unido químicamente al pentosano polisulfato.

40 El xilano de haya se usa como una materia prima en la fabricación de productos farmacéuticos de pentosano polisulfato para uso humano.

45 El xilano nativo de haya se constituye de cadenas de xilosa 1-4 beta acetilada parcialmente en las posiciones 2 y 3; además existen unidades de ácido alfa 4-O-metil-glucurónico unidas a la posición 2 de la unidad de xilosa de la cadena de polisacárido [ver por ejemplo Carbohydrate Research 337 (2002) 373 - 377]. Los procesos usados comúnmente para el aislamiento de xilano de haya implican el uso de soluciones fuertemente alcalinas en las cuales el xilano muestra una solubilidad bastante buena; bajo estas condiciones se produce la desacetilación completa del xilano.

50 Por lo tanto, es sorprendente haber identificado la presencia de la función acetilo unida al pentosano polisulfato; en vista de las implicaciones potenciales sobre las actividades biológicas y toxicológicas del pentosano polisulfato para uso farmacéutico, el grupo acetilo es una unidad estructural característica del producto.

55 Para la identificación estructural de la unidad que caracteriza al pentosano polisulfato, se llevaron a cabo experimentos basados en espectroscopía de RMN, lo que explota el potencial de esta técnica en el análisis estructural de polisacáridos y polisacáridos sulfatados.

60 El espectro de RMN de Coherencia Heteronuclear Cuántica Simple (HSQC) de muestras de pentosano polisulfato muestra una serie de señales que corresponden a las diferentes posiciones de las unidades de xilosa y ácido 4-O-metil-glucurónico del polisacárido (Figura 2-A).

65 La atribución de cada señal detectada a posiciones químicamente definidas específicas se dificulta por el gran número de combinaciones estructurales similares entre sí presentes en el polisacárido, y por lo tanto por la presencia de una multitud de señales en el espectro de RMN de HSQC; esas señales están cercanas entre sí en el espectro y parcialmente solapadas. La multiplicidad de posiciones similares químicamente, pero distinguibles espectroscópicamente, se deriva a partir de la combinación de los diversos patrones posibles de sustitución con grupos funcionales (sulfato, hidrógeno o acetilo) o ramificaciones de la unidad xilosa de la cadena, extremo reductor o extremo

no reductor. Las señales que corresponden a las unidades de ácido 4-O-metil-glucurónico, las cuales están presentes en las diversas variedades estructurales posibles, solapan las señales que corresponden a las especies informadas anteriormente.

5 Esta situación obstaculiza el trabajo de atribución de todas las señales de RMN de HSQC a contextos estructurales específicos.

Al repetir el experimento de RMN en muestras de pentosano polisulfato para uso farmacéutico que se habían sometido a un procedimiento de desulfatación exhaustiva para obtener el correspondiente xilano sin grupos sulfato, se encontró una mayor resolución de las señales y la simplificación del espectro HSQC. Los ambientes químicos que corresponden a las diferentes posiciones del polisacárido están aparentemente más diferenciados entre sí en el producto desulfatado que en el producto sulfatado. Además, la eliminación de los grupos sulfato reduce la variabilidad estructural de las diferentes unidades constituyentes del polisacárido al tener en consideración que además en el pentosano polisulfato, a pesar de su alto grado de sulfatación, están presentes unidades de sacárido no completamente sulfatadas y que cada una de ellas puede asociarse con una serie de señales de RMN. Por lo tanto, una reducción de la variedad estructural corresponde a una simplificación del espectro de RMN (Figura 2-B).

Por lo tanto fue posible, mediante la combinación de varias técnicas de RMN tales como el análisis HSQC, HMBC, TOCSY y COSY, encontrar que el grupo acetilo no se distribuye equitativamente entre las posiciones 2 y 3 de las unidades repetitivas las cuales constituyen el pentosano polisulfato, pero está presente principalmente en la posición 3 de las unidades repetitivas de xilosa.

Además, el solicitante encontró que dichos grupos acetilo se unen principalmente a la posición 3 de las unidades de xilosa, las cuales tienen además una unidad de ácido 4-O-metil-glucurónico en la posición 2.

Por lo tanto, el solicitante ha determinado experimentalmente que el pentosano polisulfato para uso farmacéutico se caracteriza por la presencia de unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico y acetiladas, las cuales representan unidades estructurales características.

Esta determinación de las unidades estructurales del polisacárido se ha confirmado mediante el análisis de espectroscopía de masas del xilano obtenido mediante desulfatación exhaustiva de pentosano polisulfato sobre el cual se llevó a cabo un análisis MALDI-TOF. La Fig. 3 muestra el espectro resultante que muestra la presencia de tres conjuntos diferentes de secuencias que difieren por el valor que corresponde a la masa de la unidad repetitiva de xilosa (132 daltons), que tiene las siguientes masas:

- la primera serie que tiene picos con masa de 701, 833, 965, 1165 Da, etcétera, que corresponden a oligómeros de polixilano (Xil)<sub>n</sub>
- la segunda serie que tiene picos con masa de 759, 891, 1023, 1155 Da, etcétera, que corresponden a oligómeros de polixilano con una ramificación de ácido 4-O-metil-glucurónico (Xil)<sub>n</sub>-(Xil-GlcAOMe)-(Xil)<sub>m</sub>
- la tercera serie que tiene picos con una masa de 801, 933, 1065 Da, etcétera, que corresponden a oligómeros de polixilano con una ramificación de ácido 4-O-metil-glucurónico en la cual además está presente un grupo acetilo (Xil)<sub>n</sub>-(Xil-OAc-GlcAOMe)-(Xil)<sub>m</sub>

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización mediante espectroscopía de masas MALDI-TOF muestran que el grupo acetilo se une a la estructura del polisacárido. Dichos resultados muestran además que el grupo acetilo está presente principalmente en especies en las cuales además existe un grupo ácido 4-O-metil-glucurónico. Al combinar adecuadamente los resultados del análisis de RMN fue posible llenar la Tabla 1 siguiente con la asignación de las señales de RMN con relación a la muestra obtenida mediante el procedimiento de desulfatación.

Tabla 1

Posición	Sacárido	Tipo	<sup>1</sup> H ppm	<sup>13</sup> C ppm
1	Xil	interno	4.47	104.61
	Xil	nr	4.44	104.87
	Xil	redα	5.17	94.98
	Xil	redβ	4.57	99.47
	Xil	que tiene 4-MGA unido en 2	4.74	103.61
	Xil	acetilado en 3 + 4-MGA unido en 2	4.63	104.17
	4-MGA	unido a Xil	5.27	100.88
	4-MGA	unido a Xil acetilado en 3	5.30	101.16

ES 2 644 823 T3

2	Xil	interno	3.29	75.69
	Xil	nr	3.29	75.69
	Xil	red $\alpha$	3.53	74.39
	Xil	red $\beta$	3.24	77.00
	Xil	que tiene 4-MGA unido en 2		
	Xil	acetilado en 3 + 4-MGA unido en 2	3.68	78.41
	4-MGA	unido a Xil	3.58	73.93
	4-MGA	unido a Xil acetilado en 3	3.58	73.93
3	Xil	interno	3.55	76.68
	Xil	nr	3.42	78.66
	Xil	red $\alpha$	3.75	74.00
	Xil	red $\beta$	3.55	76.68
	Xil	que tiene 4-MGA unido en 2		
	Xil	acetilado en 3 + 4-MGA unido en 2	5.09	76.99
	4-MGA	unido a Xil	3.65	75.21
	4-MGA	unido a Xil acetilado en 3	3.80	75.22
4	Xil	interno	3.78	79.36
	Xil	nr	3.62	72.22
	Xil	red $\alpha$	3.78	79.36
	Xil	red $\beta$	3.78	79.36
	Xil	que tiene 4-MGA unido en 2	3.78	79.36
	Xil	acetilado en 3 + 4-MGA unido en 2	3.94	78.87
	4-MGA	unido a Xil	3.80	84.31
	4-MGA	unido a Xil acetilado en 3	3.82	84.46
5	Xil	interno	4.10	65.96
	Xil	nr	3.96	68.21
	Xil	red $\alpha$	3.81	61.86
	Xil	red $\beta$	4.10	65.96
	Xil	que tiene 4-MGA unido en 2	4.10	65.96
	Xil	acetilado en 3 + 4-MGA unido en 2	4.10	65.96
	4-MGA	unido a Xil	4.03	73.22
	4-MGA	unido a Xil acetilado en 3	4.64	72.67
5'	Xil	interno	3.37	65.95
	Xil	nr	3.30	68.21
	Xil	red $\alpha$	3.74	61.86
	Xil	red $\beta$	3.37	65.95
	Xil	que tiene 4-MGA unido en 2	3.37	65.95
	Xil	acetilado en 3 + 4-MGA unido en 2	3.37	65.95

65

ES 2 644 823 T3

5  10	Otros	4-MGA	O-CH <sub>3</sub> unido a Xil	3.49	63.00
		4-MGA	O-CH <sub>3</sub> unido a Xil acetilado en 3	3.49	63.00
		4-MGA	-COOH MGA unido a Xil		176.50
		4-MGA	-COOH MGA unido a Xil acetilado en 3		177.00
		Xil	O-Ac (metilo)	2.17	23.89
		Xil	O-Ac (carbonilo)		176.60
			TSP	0	
15	Xil - xilosa 4-MGA -4-O-metil-glucurónico TSP - trimetilsililpropionato Ac - acetilo nr- unidad de sacárido en el extremo no reductor red $\alpha$ - unidad de sacárido en el extremo reductor $\alpha$ red $\beta$ - unidad de sacárido en el extremo reductor $\beta$				

20

Mediante el uso de la información recogida a partir del análisis de muestras de xilano obtenidas mediante desulfatación de pentosano polisulfato, fue posible completar la asignación de las señales de RMN para el producto no desulfatado. Al combinar esta información con los resultados de los experimentos de RMN, tales como HSQC, HMBC, TOCSY y COSY, llevados a cabo directamente sobre muestras no desulfatadas, se confirmaron los resultados del análisis estructural y se preparó la tabla 2 siguiente sobre la base de señales de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de pentosano polisulfato.

25

Tabla 2

Posición	Sacárido	Tipo	<sup>1</sup> H ppm	<sup>13</sup> C ppm	
30  35	1	Xil(S)	interno	5.17	102.40
		Xil(S)	nr	5.17	102.40
		Xil(S)	red $\alpha$	5.39	93.68
		Xil(S)	red $\beta$	5.10	101.38
		Xil(S)	que tiene 4-MGA(S) unido a 2		
		Xil(S)	acetilado en 3 + 4-MGA(S) unido a 2	5.00	106.73
		4-MGA(S)	unido a Xil(S)	5.79	96.86
		4-MGA(S)	unido a Xil(S) acetilado en 3	5.76	96.99
40  45  50	2	Xil(S)	interno	4.47	75.85
		Xil(S)	nr	4.49	75.39
		Xil(S)	red $\alpha$	4.35	78.16
		Xil(S)	red $\beta$	4.42	75.88
		Xil(S)	que tiene 4-MGA(S) unido a 2		
		Xil(S)	acetilado en 3 + 4-MGA(S) unido a 2	3.93	76.85
		4-MGA(S)	unido a Xil(S)	4.32	78.22
		4-MGA(S)	unido a Xil(S) acetilado en 3	4.31	77.76

55

60

65

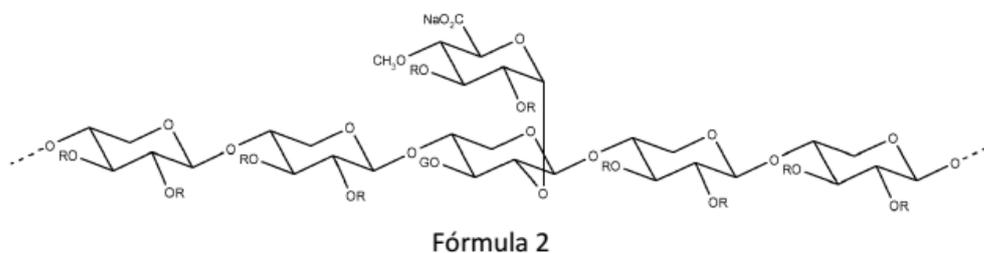
ES 2 644 823 T3

5	3	Xil(S)	interno	4.80	75.36
		Xil(S)	nr	4.83	74.20
		Xil(S)	red $\alpha$	4.76	78.55
10		Xil(S)	red $\beta$	4.74	75.99
		Xil(S)	que tiene 4-MGA(S) unido a 2		
		Xil(S)	acetilado en 3 + 4-MGA(S) unido a 2	5.25	75.96
		4-MGA(S)	unido a Xil(S)	4.95	80.04
15		4-MGA(S)	unido a Xil(S) acetilado en 3	4.42	80.83
	4	Xil(S)	interno	3.97	77.38
20		Xil(S)	nr	4.57	74.40
		Xil(S)	red $\alpha$	3.89	77.78
		Xil(S)	red $\beta$	3.97	76.70
		Xil(S)	que tiene 4-MGA(S) unido a 2		
25		Xil(S)	acetilado en 3 + 4-MGA(S) unido a 2	4.14	76.79
		4-MGA(S)	unido a Xil(S)	3.45	84.04
		4-MGA(S)	unido a Xil(S) acetilado en 3	3.45	84.04
30	5	Xil(S)	interno	4.44	61.92
		Xil(S)	nr	4.51	61.40
		Xil(S)	red $\alpha$	3.94	63.69
35		Xil(S)	red $\beta$	4.44	61.92
		Xil(S)	que tiene 4-MGA(S) unido a 2		
		Xil(S)	acetilado en 3 + 4-MGA(S) unido a 2	4.29	65.60
40		4-MGA(S)	unido a Xil(S)	4.36	75.05
		4-MGA(S)	unido a Xil(S) acetilado en 3	3.92	75.71
45	5'	Xil(S)	interno	3.86	61.92
		Xil(S)	nr	3.89	61.40
		Xil(S)	red $\alpha$	3.94	63.64
		Xil(S)	red $\beta$	3.86	61.92
50		Xil(S)	que tiene 4-MGA(S) unido a 2		
		Xil(S)	acetilado en 3 + 4-MGA(S) unido a 2	3.69	65.60

55

5  10	Otros	4-MGA(S)	O-CH <sub>3</sub> unido a Xil(S)	3.50	63.37
		4-MGA(S)	O-CH <sub>3</sub> unido a Xil(S) acetilado en 3	3.48	63.61
		4-MGA(S)	-COOH 4-MGA(S) unido a Xil(S)		178.90
		4-MGA(S)	-COOH 4-MGA(S) unido a Xil(S) acetilado en 3		178.44
		Xil(S)	O-Ac (metilo)	2.30	23.37
		Xil(S)	O-Ac (carbonilo)		176.14
15	Xil(S) - xilosa sulfato 4-MGA(S) - 4-O-metil-glucurónico sulfato Ac - acetilo nr- unidad de sacárido en el extremo no reductor redα - unidad de sacárido en el extremo reductor α redβ - unidad de sacárido en el extremo reductor β				

Basado en los resultados obtenidos, el solicitante ha atribuido al pentosano polisulfato para uso farmacéutico la estructura de la fórmula 2:



en donde

R es H o SO<sub>3</sub>Na  
 G es H, SO<sub>3</sub>Na o acetilo;  
 en donde el grupo estructural G, el cual puede ser un grupo acetilo, está presente.

El solicitante ha definido experimentalmente que el pentosano polisulfato para uso farmacéutico se caracteriza por la presencia de unidades de xilosa sustituidas por ácido 4-O-metil-glucurónico y acetilado (G = acetilo) como unidades estructurales características.

Esta alta especificidad estructural es un elemento que caracteriza al pentosano polisulfato usado como ingrediente farmacéutico activo para uso humano.

La identificación de esta unidad estructural específica de pentosano polisulfato tiene diversas aplicaciones útiles, tales como la selección del método de aislamiento de la materia prima (xilano de haya), la evaluación del proceso para la transformación de xilano en el producto final que comprende las etapas de despolimerización y sulfatación, los procedimientos para el aislamiento y purificación del pentosano polisulfato resultante, la evaluación de lotes de la producción de intermediarios y de producto final.

Las características anteriores tienen una aplicación práctica adicional de la invención, que consiste en el xilano obtenido mediante la desulfatación de pentosano polisulfato o mediante otros métodos y representado por la fórmula 2 en donde R es hidrógeno y G es hidrógeno o acetilo, así como también en el uso de dicho xilano como materia prima para la preparación de pentosano polisulfato para uso farmacéutico mediante la preservación de sus unidades estructurales.

Otra modalidad práctica adicional de la presente invención es la posibilidad de hacer más significativos los controles del proceso en diferentes etapas de la producción al enlazarlos con parámetros estructurales específicos.

Estos factores se tendrán en cuenta en la producción y comercialización de pentosano polisulfato para uso farmacéutico y además deben considerarse como parte del proceso de registro del producto ante las autoridades reguladoras, tales como la FDA, para la autorización de versiones genéricas del pentosano polisulfato.

Estas evaluaciones no se limitan a la comprobación de la presencia de la unidad estructural característica, sino además a su cuantificación. Para este propósito, todavía puede usarse la espectroscopía de RMN. A través de esta técnica hemos encontrado que la presencia de los grupos acetilo está principalmente en la posición 3 de las unidades de xilosa repetitivas. Además, hemos encontrado que dichos grupos acetilo se unen principalmente a la posición 3 de las

unidades de xilosa que tienen además una unidad de ácido 4-O-metil-glucurónico unida en la posición 2. Mediante la integración en el espectro HSQC de diferentes muestras de xilano y pentosano polisulfato, se determinó la cantidad de unidades de xilosa que tienen tanto un grupo acetilo como una unidad de ácido 4-O-metil-glucurónico (determinada mediante la integración de la señal con relación a la posición 3 de la unidad de xilosa especificada), con respecto a las unidades de xilosa totales que portan una unidad de ácido 4-O-metil-glucurónico en la posición 2 (que integra las señales correspondientes de las posiciones 1). Basado en los datos obtenidos, el solicitante ha podido determinar que el contenido de unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico, las cuales también tienen un grupo acetilo en el pentosano polisulfato para uso farmacéutico y en el xilano correspondiente sin grupos sulfato, es al menos 20 %, preferentemente entre 35 % y 70 %, con respecto a la cantidad total de los residuos presentes del ácido 4-O-metil-glucurónico.

Por lo tanto, las características preferidas de la presente invención son xilano y pentosano polisulfato de la fórmula 2 que contienen al menos 20 % de unidades de xilosa sustituidas con un ácido 4-O-metil-glucurónico acetiladas, como unidades estructurales características obtenidas con un método que comprende al menos una etapa de calificación basada en dichas unidades estructurales características.

En otros aspectos particularmente preferidos, la presente invención se refiere a xilano y a pentosano polisulfato de la fórmula 2 que contienen entre 35 % y 70 % de unidades de xilosa sustituidas con un ácido 4-O-metil-glucurónico acetiladas, como unidades estructurales características obtenidas con un método que comprende al menos una etapa de calificación basada en dichas unidades estructurales características.

Esta evaluación cuantitativa implica múltiples ventajas tales como la selección del método de aislamiento de la materia prima (xilano de haya), la evaluación del proceso de transformación del xilano en el producto final que comprende las etapas de despolimerización y sulfatación, los procedimientos de aislamiento y purificación del pentosano polisulfato resultante, la evaluación de lotes de producción de materia prima, intermediarios y producto final.

Después, se tendrán en cuenta además estas características estructurales relacionadas con la cuantificación de la unidad estructural para la producción y comercialización de pentosano polisulfato para uso farmacéutico; además, estas características estructurales deben considerarse además como parte del proceso de registro del producto ante las autoridades reguladoras, tales como por ejemplo la FDA, para la autorización de versiones genéricas de pentosano polisulfato.

La identificación de las unidades estructurales características del xilano y polisulfato pentosano se llevó a cabo como se describió previamente mediante el uso de técnicas espectroscópicas avanzadas, sin embargo, los métodos de la presente invención no se limitan a estas técnicas, sino que incluyen además el uso de la información relativa a la presencia y cuantificación de dicha unidad estructural característica determinada mediante cualquier técnica analítica tal como espectroscopía IR, análisis HPLC, análisis de los productos de despolimerización, ELISA, electroforesis capilar.

La ausencia o la presencia y la cuantificación de las señales de la unidad estructural característica se determinan mediante cualquier método que permita la identificación en la preparación de xilano o xilano sulfato como tales, sus fracciones o sus productos de hidrólisis. Por ejemplo, pueden usarse uno o más de los siguientes métodos: resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas, por ejemplo espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS), espectrometría de masas por ionización por electrospray (ESI MS), acoplada o no a técnicas de separación cromatográfica (por ejemplo, exclusión por tamaño, iónica, etcétera).

Los métodos de la presente invención usan preferentemente espectroscopía de RMN, aún con mayor preferencia la espectroscopía de RMN de HSQC.

Es de particular importancia el uso de la información relativa a la presencia y la cuantificación de las unidades estructurales características para la calificación y la selección de lotes de ingrediente activo de pentosano polisulfato farmacéutico. En ese caso, sobre la base de esta información puede tomarse la decisión de aprobar, rechazar o posiblemente reelaborar lotes de pentosano polisulfato para uso farmacéutico.

Con el fin de ilustrar mejor la presente invención sin limitarla, se dan a continuación los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1

##### Procedimiento para la desulfatación de pentosano polisulfato

500 mg de pentosano polisulfato (Elmiron<sup>®</sup>) se convirtieron en la forma ácida mediante tratamiento con una resina de intercambio iónico (Amberlite IR 120 H+) y la solución resultante (50 ml) se neutralizó con piridina y después se liofilizó. La sal de piridina se disolvió en una solución de DMSO (2 ml) que contenía 10 % de H<sub>2</sub>O y la solución se calentó a 80 °C durante 4 horas. Después de este tiempo, la solución se añadió a un volumen de agua al menos 3 veces mayor y se enfrió. La muestra de xilano sin grupos sulfato se aisló después de operaciones de purificación adecuadas (precipitación, diálisis, cromatografía de exclusión por tamaño). Este procedimiento se repitió para preparar al menos 3 muestras (P5146, P5211 y P5212).

## Ejemplo 2

## Procedimiento para el registro de espectros de RMN

- 5 Los espectros se registraron con un espectrómetro Bruker AVANCE de 500 o 600 MHz equipado con una criosonda.

Preparación de la muestra: se disolvieron aproximadamente 20 mg en 0,6 ml de D<sub>2</sub>O (agua deuterada D 99,9 %) o en una mezcla D<sub>2</sub>O/DMSO (dimetilsulfóxido deuterado) en relación 1:9 y se transfirió a un tubo para análisis de RMN de 5 mm. Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H se adquirieron a una temperatura de 303 Kelvin con saturación previa de la señal de agua con un intervalo de reciclado de 12 s, para una serie de barridos de 16 a 24 para calibrar el espectro con respecto a TSP.

## Ejemplo 3

- 15 Identificación de los parámetros característicos de la estructura del pentosano polisulfato o xilano sin grupos sulfato mediante RMN bidimensional (2D)

Los experimentos de RMN 2D pueden ser homonucleares (por ejemplo, COSY, TOCSY, etcétera) o heteronucleares (HSQC, HSQC-DEP, HMQC, HMBC, etcétera). Todos los espectros 2D (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY y HSQC-TOCSY) se llevaron a cabo en muestras preparadas en las mismas condiciones descritas para el espectro RMN-<sup>1</sup>H y se adquirieron a una temperatura de 303 Kelvin, se calibró el espectro con respecto a TSP si se realizó en solvente D<sub>2</sub>O y con respecto al pico del solvente DMSO, si los espectros se llevaron a cabo en el solvente DMSO/D<sub>2</sub>O.

Los espectros bidimensionales DQF (filtro de doble cuanto)-COSY y 2D-TOCSY se adquirieron mediante el uso de 16 a 24 barridos por conjunto de 2048 × 512 puntos con llenado de ceros en F1 (4096 × 2048), se aplicó una función "coseno cuadrado desplazada ( $\pi/3$ )" antes de la transformada de Fourier. El espectro HSQC (coherencia heteronuclear cuántica simple) se obtuvo en "modo de absorción pura potenciada, fase sensible" con desacoplamiento durante la adquisición. Las dimensiones de la matriz fueron de 1024 x 320 puntos de datos que se "llenaron de ceros" a 4096 x 2048 mediante la aplicación de una función coseno cuadrado antes de la transformada de Fourier.

Un experimento HMBC en una muestra de xilano sin grupos sulfato mostró una correlación a larga distancia entre la señal del residuo de xilosa y un grupo carboxilo del grupo acetilo.

Esta señal se identificó mediante un experimento COZY y HSQC-TOCSY como la posición 3 de un residuo de xilosa que porta el grupo acetilo. Se encontró que la posición 2 de dicho residuo correlaciona en el espectro de HMBC con un residuo de ácido glucurónico lo que destaca la presencia de ácido glucurónico en la posición 2 y del grupo acetilo en la posición 3 del mismo residuo de xilosa. Esto explicó la división de las señales relacionadas con el residuo de ácido glucurónico en las posiciones 1, 3, 4 y 5 además de la división de la señal del grupo O-Me.

Los experimentos bidimensionales descritos anteriormente permitieron además identificar los desplazamientos químicos de los residuos reductores/no reductores y los parámetros característicos de la estructura como se muestra en la Tabla 1. El experimento HMBC en la muestra de Elmiron® (pentosano polisulfato) mostró correlaciones a larga distancia similares entre la señal correspondiente a la posición 3 del residuo de xilosa acetilado y el grupo carboxilo del grupo acetilo. El espectro bidimensional permitió además la asignación de las señales informadas en la Tabla 2.

## Ejemplo 4

## Cuantificación de parámetros característicos de la estructura de xilano sin grupos sulfato y pentosano polisulfato

50 La ausencia o la presencia y la cuantificación de las señales de las unidades estructurales características se determinó con espectros de RMN-2D de xilanos sin grupos sulfato obtenidos mediante desulfatación como se describió en el ejemplo 1 y con los espectros de pentosano polisulfato y se asociaron con la presencia de una señal en la región correspondiente a residuos de xilosa que portan el grupo acetilo. Resultó que el grupo acetilo no se distribuyó de manera equivalente entre las posiciones 2 y 3 de las unidades repetitivas que forman la estructura de polisacárido, pero se concentró principalmente en la posición 3 de las unidades de xilosa repetitivas.

Resultó además que estos grupos acetilo se unieron principalmente a la posición 3 de unidades de xilosa que portaban además una unidad de ácido 4-O-metil-glucurónico en la posición 2. La presencia de la señal significó que la unidad estructural característica puede detectarse y cuantificarse mediante integración como % en comparación con el número total de residuos presentes de ácido 4-O-metil-glucurónico.

La tabla 3 siguiente informa los valores de la cuantificación llevada a cabo en diferentes muestras.

Tabla 3

5		Muestras de pentosano polisulfato Elmiron®			Muestras de Xilano sin grupos sulfato obtenidas mediante desulfatación del pentosano polisulfato Elmiron®		
		P5093	P5196	P5197	P5146	P5211	P5212
10	Unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico que portan además el grupo acetilo (% Ac)	60,5 %	54,5 %	44,0 %	58,8 %	46,0 %	37,5 %

15 La cuantificación del porcentaje de las unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico que portan además el grupo acetilo (% Ac) se calculó al procesar las integrales de las señales de RMN de conformidad con la

$$\%Ac = \frac{\int C3\text{-XilAc}}{\int \sum C1\text{-Glc}}$$

20

en donde:

$\int C3\text{-XilAc}$  = integral de la señal de la posición 3 de la xilosa que porta el grupo acetilo en 3 y el ácido 4-O-metil-glucurónico en 2

25

$\int \sum C1\text{-Glc}$  = integral de la suma de las señales de la posición C1 del ácido 4-O-metil-glucurónico, unido a xilosa con grupo acetilo y unido a xilosa sin grupo acetilo.

30

El análisis además se llevó a cabo en una muestra de pentosano polisulfato para uso farmacéutico de un fabricante diferente y comprado en el mercado indio. Las señales del grupo OAc a 2,3 ppm, del grupo C3-XilAc a 5,25/75,96 ppm y del grupo C1-XilAc a 5,00/106,73 ppm no se detectaron en sus espectros de RMN.

35

El análisis por RMN de esta muestra mostró la presencia de estructuras las cuales no están presentes en pentosano sulfatos extraídos a partir del producto comercial Elmiron®, asociado con señales en diferentes regiones del espectro, y en particular entre 5,8/6,2 ppm y 95/115 ppm, lo que destaca la capacidad diagnóstica de esta técnica para la investigación estructural.

Ejemplo 5

40

Análisis de masa de xilano

45

La espectrometría de masas se aplicó como una técnica ortogonal de análisis estructural. La muestra de xilano sin grupos sulfato obtenida como se describió en el ejemplo 1 se analizó mediante espectrometría de masas MALDI al seguir el procedimiento siguiente. La muestra se disolvió en H<sub>2</sub>O a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml. Se añadió 1 microlitro de la solución de analito a 5 microlitros de una solución de matriz DHB a una concentración de 10 mg/ml en EtOH al 80 %. Se colocó 1 microlitro de la mezcla en el objetivo y se analizó con un espectrómetro Bruker Daltonics Autoflex MALDI-TOF en polaridad positiva y en modo reflectrón.

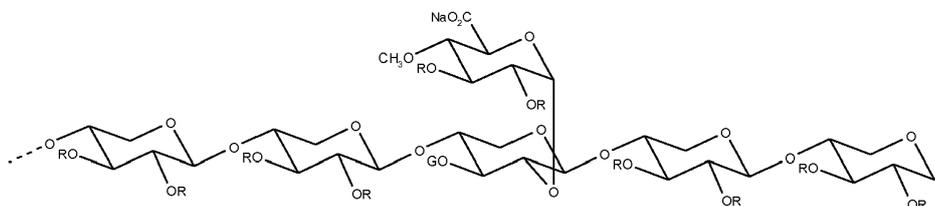
50

Reivindicaciones

1. Un método para la preparación de polisacáridos de la fórmula

5

10



en donde

15

R es H o SO<sub>3</sub>Na

G es H, SO<sub>3</sub>Na o acetilo

que comprende al menos una etapa de identificación o cuantificación de las unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico y acetilado (G = acetilo).

20

2. Un método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el polisacárido contiene al menos 20 % de unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico acetiladas (G = acetilo).

25

3. Un método de conformidad con la reivindicación 2, en donde el polisacárido contiene del 35 % al 70 % de unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico acetiladas (G = acetilo).

30

4. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha etapa de identificación o cuantificación se lleva a cabo mediante espectroscopía de RMN.

35

5. Un método de conformidad con la reivindicación 4, en donde la identificación comprende la detección de una o más señales a 2,17(1H), 23,89(13C); 176,60(13C); 4,63(1H), 104,17(13C); 3,68(1H), 78,41(13C); 5,09(1H), 76,99(13C); 3,78(1H), 79,36(13C); 4,10(1H), 65,96(13C); 3,37(1H), 65,95(13C); 5,30(1H), 101,16(13C); 3,58(1H), 73,93(13C); 3,80(1H), 75,22(13C); 3,82(1H), 84,46(13C); 4,64(1H), 72,67(13C); 3,49(1H), 63,00(13C); 177,00(13C); 2,30(1H), 23,37(13C); 176,14(13C); 5,00(1H), 106,73(13C); 3,93(1H), 76,85(13C); 5,25(1H), 75,96(13C); 4,14(1H), 76,79(13C); 4,29(1H), 65,60(13C); 3,69(1H), 65,60(13C); 5,76(1H), 96,99(13C); 4,31(1H), 77,76(13C); 4,42(1H), 80,83(13C); 3,45(1H), 84,04(13C); 3,92(1H), 75,71(13C); 3,48(1H), 63,61(13C); 178,44(13C).

40

6. Un método de conformidad con la reivindicación 4, en donde la cuantificación se calcula de conformidad con la fórmula %Ac =  $\frac{[C3-XilAc]}{\sum C1-Glc}$ , en donde [C3-XilAc = integral de la señal de la posición 3 de la xilosa que porta el grupo acetilo en 3 y el ácido 4-O-metil-glucurónico en 2 y  $\sum C1-Glc$  = integral de la suma de las señales de la posición C1 del ácido 4-O-metil-glucurónico, unido a xilosa con grupo acetilo y unido a xilosa sin grupo acetilo.

45

7. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la preparación de pentosano polisulfato.

8. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la preparación de xilano.

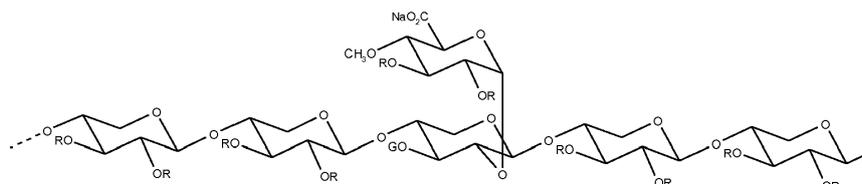
50

9. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la calificación del pentosano polisulfato para uso farmacéutico, las materias primas de este y los productos de fabricación de este.

10. Un polisacárido de fórmula

55

60



en donde

R es H y G es H o acetilo; y

al menos el 20 % de las unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico tienen además G = acetilo.

65

11. Un polisacárido de conformidad con la reivindicación 10, en donde del 35 % al 70 % de las unidades de xilosa sustituidas con ácido 4-O-metil-glucurónico tienen además G = acetilo.

Figura 1

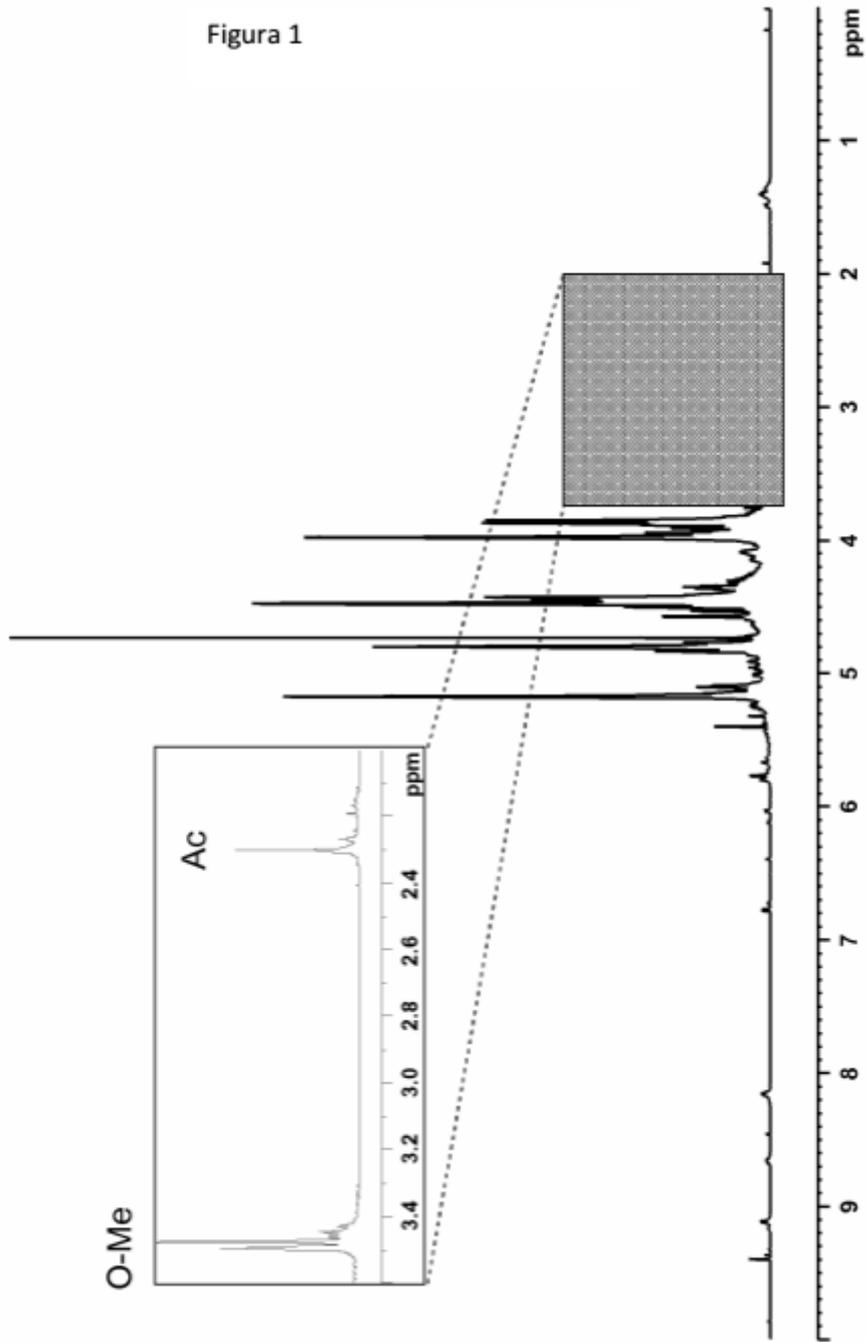


Figura 2

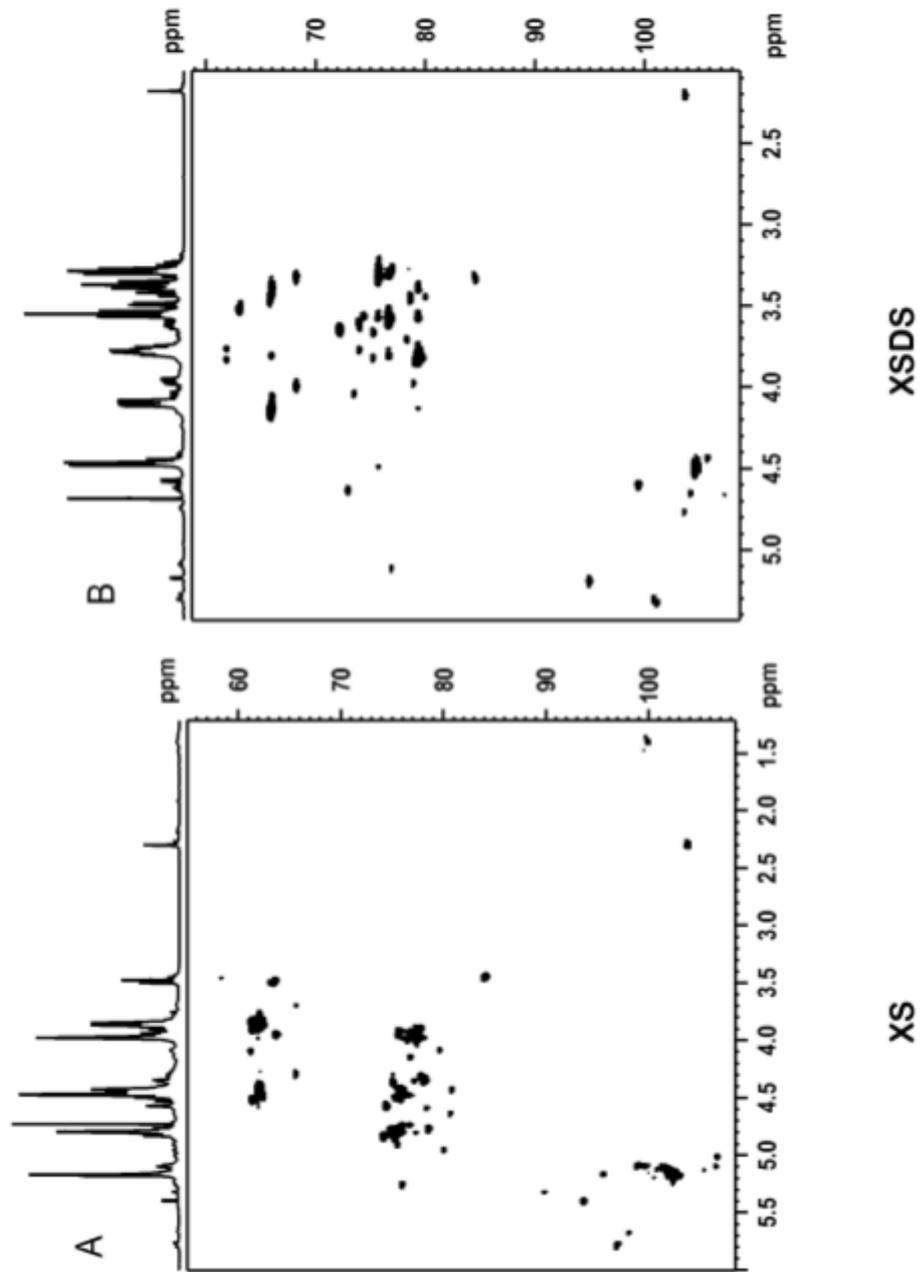


Figura 3

