

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 734**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2012 PCT/EP2012/058654**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12152872**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2012 E 12725644 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2707396**

54 Título: **Sulfato de condroitina biotecnológico sulfatado en la posición 4 o 6 en la misma cadena de polisacárido y proceso para la preparación del mismo**

30 Prioridad:

12.05.2011 IT MI20110829
02.02.2012 IT MI20120136

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 705 734 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 biotecnológico sulfatado en la posición 4 o 6 en la misma cadena de polisacárido y proceso para la preparación del mismo

Campo técnico de la invención

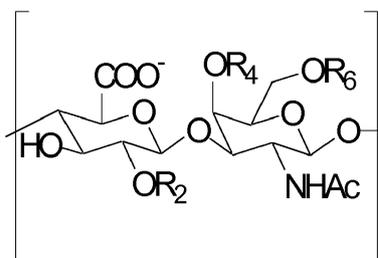
- 5 La presente invención se refiere a un método para la producción de sulfato de condroitina por sulfatación química a partir de un esqueleto de condroitina sin sulfato. El proceso de acuerdo con la invención permite la sulfatación simultánea, dentro de la misma cadena de polisacárido, de la posición 4 o la posición 6 del residuo de N-acetil-D-galactosamina. El sulfato de condroitina así obtenido presenta el mismo patrón de sulfatación que se observa en el sulfato de condroitina natural, a diferencia del obtenido con los métodos de síntesis descritos hasta ahora.
- 10 La invención también describe un sulfato de condroitina que tiene un peso molecular promedio determinado por SEC (Mw) de 4-9 kDa, y una distribución de grupos monosulfatados que van desde 90% de 4-sulfato y 10% de 6-sulfato hasta 10% de 4-dulfato y 90% de 6-sulfato.

Antecedentes técnicos

- 15 El sulfato de condroitina (CS) es un polisacárido natural complejo perteneciente a la clase del glicosaminoglicano (GAG), que consiste en secuencias de disacáridos formadas por residuos de ácido glucurónico (GlcA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) sulfatadas en diferentes posiciones y unidas por enlaces beta 1-3.

- 20 El CS está presente en tejidos animales, con funciones estructurales y fisiológicas. Dependiendo de su origen, el CS consiste principalmente en porcentajes variables de dos tipos de unidades de disacáridos monosulfatados en la posición 4 o en la posición 6 de GalNAc (disacáridos A y C, respectivamente). Sin embargo, los disacáridos en los que los grupos sulfato están presentes en diferentes números y diferentes posiciones pueden estar presentes en varios porcentajes en las cadenas de polisacáridos. El esqueleto de CS también contiene disacárido sin sulfato, generalmente en pequeñas cantidades. Disacáridos disulfatados que tienen dos grupos sulfato unidos a través del átomo de oxígeno en varias posiciones, como la posición 2 de GlcA y 6 de GalNAc (disacárido D), posición 2 de GlcA y 4 de GalNAc, o posiciones 4 y 6 de GalNAc (disacárido E), pueden estar presentes en el esqueleto de CS en porcentajes variables,
- 25 dependiendo de las fuentes animales específicas (Volpi N. J PharmPharmacol 61, 1271, 2009. Volpi N. J Pharm Sci 96, 3168, 2007. Volpi N. Curr Pharm Des 12, 639, 2006).

La unidad de disacáridos de repetición que se encuentra en CS tiene la siguiente fórmula química:



en donde R_2 , R_4 y R_6 son independientemente H o SO_3^- .

- 30 Las cargas negativas de los grupos carboxilato y sulfato en la unidad de disacáridos de repetición son neutralizadas por iones de sodio.

Los significados de los acrónimos más comúnmente utilizados para identificar los disacáridos sulfatados son los siguientes:

Di-0S ($R_2=H$; $R_4=H$; $R_6=H$)

- 35 Di-6S (C) ($R_2=H$; $R_4=H$; $R_6=\text{SO}_3^-$)

Di-4S (A) ($R_2=H$; $R_4=\text{SO}_3^-$; $R_6=H$)

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) ($R_2 = \text{SO}_3^-$; $R_4 = \text{SO}_3^-$; $R_6 = H$)

- 40 Di-2,4,6 triS ($R_2 = \text{SO}_3^-$; $R_4 = \text{SO}_3^-$; $R_6 = \text{SO}_3^-$)

ES 2 705 734 T3

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

5 La Tabla 1 muestra los principales disacáridos encontrados en el CS natural extraído de cartílago y otros tejidos de diversas especies animales:

Tabla 1 - Mn = peso molecular promedio en número; Mw = peso molecular promedio en peso; índice de polidispersidad = Mw/Mn; la densidad de carga es el número de grupos sulfato por unidad de disacárido; ND = no identificado

	CS Bovino	CS Porcino	CS Pollo	CS Tiburón	CS Raya	CS Calamar
Mn (kDa)	12-17	9-14	8-13	25-40	27-34	60-80
Mw (kDa)	20-26	14-20	16-21	50-70	50-70	80-120
Índice de polidispersidad	1.8-2.2	1.4-1.8	1.6-2.0	1.0-2.0	1.2-2.5	0.8-1.3
Di-0S	6	6	8	3	3	13
Di-6S	33	14	20	44	39	15
Di-4S	61	80	72	32	43	50
Di-2,6diS	ND	ND	ND	18	13	0
Di-4,6diS	ND	ND	ND	2	1	22
Di-2,4diS	ND	ND	ND	1	1	0
Densidad de carga	0.90-0.96	0.92-0.96	0.90-0.94	1.15-1.25	1.08-1.20	1.00-1.20
Proporción 4S/6S	1.50-2.00	4.50-7.00	3.00-4.00	0.45-0.90	1.00-1.40	2.50-4.00

10 Como se muestra en la Tabla 1, el CS derivado de animales terrestres tiene parámetros de masa molecular similares (Mn y Mw), mientras que es diferente del que se origina en especies de peces, que tiene valores de masa molecular más altos. Las muestras de CS terrestres también se caracterizan por valores de densidad de carga (CD) por debajo de 1.0, mientras que las muestras de CS marino siempre tienen valores de CD que superan 1.0. Esta característica se debe a la diferente distribución de los disacáridos sulfatados. En general, los disacáridos disulfatados se encuentran en cantidades traza en CS terrestres, y no se observan disacáridos polisulfatados (tri- y tetra-sulfatos) en CS natural.

15 La ausencia de disacáridos tri y tetra-sulfatados se puede evidenciar fácilmente mediante análisis después de la digestión del polisacárido con condroitinasa ABC, una enzima lítica específica para disacáridos monosulfatados (Di-4S y Di-6S) y para disacáridos sin sulfato (Di-0S), que es capaz de digerir disacáridos disulfatados pero no pueden hidrolizar la cadena de polisacárido en correspondencia con los disacáridos polisulfatados. El análisis FACE (Electroforesis de Carbohidratos Asistida por Fluoróforo) de CS natural digerido con condroitinasa ABC no detecta las
20 bandas de electroforesis características de los oligosacáridos parcialmente sin digerir que se encuentran en CS sintéticos o semisintéticos derivados de la técnica anterior.

También es bien sabido que, debido a los procesos de biosíntesis, todos los CS naturales siempre muestran la presencia simultánea de disacáridos monosulfatados en la posición 4 o 6 de GalNAc en las mismas cadenas de polisacáridos (D'Arcy SM et al., Carbohydr Res. 1994 Mar 4;255:41-59. Hardingham TE et al., Carbohydr Res. 1994
25 Mar 4;255:241-54. Cheng F, et al., Glycobiology. 1992 Dec; 2(6):553-61. Chai W et al., Anal Biochem. 1996 May

15:237(1):88-102. Zaia J et al., Anal Chem. 2001 Dec 15;73(24):6030-9. Desaire H et al., Anal Chem. 2001 Aug 1;73(15):3513-20).

5 Se han reportado diferentes actividades para CS en relación con su estructura molecular (Kimata K et al., Mol Cell Biochem 1, 211, 1963. Volpi N. Biomaterials 23, 3015, 2002. Volpi N, Tarugi P. Biochimie 81, 955, 1999. Volpi N. Biomaterials 20, 1359, 1999. Suzuki S et al., J Biol Chem 243, 7, 1968).

10 El CS tiene actividad antiinflamatoria y actualmente se recomienda en el tratamiento de la osteoartritis (OA) como un fármaco sintomático de acción lenta para la osteoartritis (SYSADOA) en Europa, en particular para el tratamiento de la osteoartritis de rodilla (Jordan KM et al., Ann Rheum Dis 62, 1145, 2003), cadera (Jordan KM et al. Ann Rheum Dis 62, 1145, 2003) y mano (Zhang W et al., Ann Rheum Dis 66, 377, 2007) sobre la base de evidencia clínica y metaanálisis correspondientes de numerosos ensayos clínicos. El CS también se usa ampliamente como nutracéutico en Europa y los Estados Unidos, ya sea solo o en combinación con otros ingredientes (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).

15 El CS comercial se obtiene por extracción de tejido animal, como tejido bovino y porcino (Fuentes EP et al., Acta Farm Bonaerense 17, 135, 1998), tejido de aves (Luo XM et al., PoultSci 81, 1086-1089, 2002) y cartilago de pescado (Sugahara K et al., Eur J Biochem 239, 871, 1996. Lignot B et al., J Biotechnol 103, 281, 2003).

El origen animal del CS comercial implica problemas de seguridad asociados con agentes infecciosos transmisibles que causan enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) y restringe las posibles fuentes disponibles para satisfacer la creciente demanda mundial. Estos factores han estimulado la investigación de métodos alternativos para producir CS.

20 Se han realizado esfuerzos intensos para encontrar un método biotecnológico para producir CS, utilizando un microorganismo como fuente de un polisacárido precursor que tiene una estructura parcialmente similar a la de CS y dirige la sulfatación química para producir un CS similar al natural.

25 Un ejemplo de esta estrategia es la producción de CS biotecnológico a partir del polisacárido capsular K4 de E. coli O5:K4:H4, como se describe en el documento EP 1304338 B1. Dicha patente describe un proceso en donde el polisacárido K4 producido en cultivos líquidos se extrae y se purifica, y luego se vuelve a disolver y se somete a hidrólisis ácida para eliminar los residuos de fructosa unidos a los residuos GlcA del polímero. El polímero desfructosilado, idéntico al esqueleto no sulfatado de CS (CH), se sulfata en la posición 4 o en la posición 6 del residuo de GalNAc de acuerdo con dos métodos de síntesis química diferentes. Dicha patente también describe un tercer método mediante el cual se obtiene un CS disulfatado en ambas posiciones 4 y 6. El CS descrito en el presente documento tiene un contenido de al menos 70% de polisacáridos sulfatados que consisten en mono- y/o disulfatados en la posición 4 y 6 del residuo de GalNAc, estando la posición 2' del residuo de GlcA sin sulfatar, y tiene un peso molecular (Mw) de 6-25 kDa y una densidad de carga (CD) de 0.7-2.0.

En el documento EP 1304338 B1, los autores revelan y afirman, según la estrategia de síntesis utilizada, la posibilidad de:

35 a) sintetizar CS 4S protegiendo selectivamente la posición 6 de todos los residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) presentes, obteniendo así un polímero sulfatado selectivamente solo en la posición 4 de todos los residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc)

b) obtener un polímero en el cual, de manera similar, los grupos hidroxilo en la posición 6 de todos los residuos de GalNAc están sulfatados, protegiendo adecuadamente los residuos hidroxilo presentes en la posición 4.

40 En el proceso descrito en el documento EP 1304338 B1, la sulfatación simultánea nunca tiene lugar en las posiciones 4 o 6 en la misma cadena, a diferencia de la situación con CS natural.

45 Una publicación reciente (Bedini E et al., Angew Chem Int Ed Engl. 2011 May 18) describe un proceso en donde el polisacárido K4 producido se sulfata en la posición 4 y/o la posición 6 del residuo de GalNAc en la misma cadena. Sin embargo, el CS biotecnológico descrito por Bedini et al. tiene un peso molecular similar al del CS natural, es decir, alrededor de 17 kDa, lo que lleva a la baja biodisponibilidad típica de los productos naturales extraídos. Bedini et al. no reportan ninguna caracterización farmacológica del producto que obtuvieron.

Lista de Figuras

50 La Figura 1 se refiere al sulfato de condroitina natural de origen bovino tratado con condroitinasa C. Se forman diversos oligosacáridos de diferente longitud que demuestran la presencia de grupos sulfato en la posición 4 o 6 del residuo GalNAc en la misma cadena de polisacárido. El cromatograma se obtuvo por separación en gradiente en una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) y detección UV a 232 nm. El gradiente se obtuvo mediante NaCl 50 mM hasta NaCl 1.2 M de 0 a 60 minutos.

La Figura 2 se refiere al sulfato de condroitina natural de origen porcino tratado con condroitinasa C. Se forman diversos oligosacáridos de diferente longitud que demuestran la presencia de grupos sulfato en la posición 4 o 6 del

residuo GalNAc en la misma cadena de polisacárido. El cromatograma se obtuvo por separación en gradiente en una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) y detección UV a 232 nm.

5 La Figura 3 se refiere al sulfato de condroitina biotecnológico de acuerdo con la presente invención tratado con condroitinasa C. También para este polisacárido, se forman diversos oligosacáridos de diferente longitud que demuestran la presencia de grupos sulfato en la posición 4 o 6 del residuo GalNAc en la misma cadena de polisacárido. El cromatograma se obtuvo por separación en gradiente en una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) y detección UV a 232 nm.

Descripción de la invención

10 La presente invención describe un método para la producción de CS después de la sulfatación química a partir de un esqueleto de condroitina sin sulfato (CH), obteniéndose este CH por hidrólisis ácida de un polisacárido microbiano natural i.l. (K4), o producido directamente a partir de una E. coli modificada genéticamente, como la cepa DSM23644 de E. coli, descrita en las solicitudes de patente MI2010A001300 y MI2010A001264. La cepa bacteriana descrita en este documento conlleva una mutación que causa la inactivación del gen KfoE para la fructosilación de K4.

15 El CS obtenido por el proceso de acuerdo con la invención presenta las características de un CS natural con un título superior al 95% sobre la base de los métodos analíticos descritos en la Farmacopea Europea.

El CS obtenido con el proceso de acuerdo con la invención tiene un peso molecular promedio (Mw), medido por SEC, de 10-30 kDa, preferiblemente de 20-30 kDa, y presenta una distribución de grupos monosulfatados que va desde 90% de 4-sulfato y 10% de 6-sulfato a 10% de 4-sulfato y 90% de 6-sulfato (Tabla 2).

Tabla 2

Características del CS descrito en esta invención	
Mw (kDa)	10-30
Digestibilidad con condroitinasa ABC	> 95%
Di-0S	< 10%
Di-6S	10 - 90%
Di-4S	90 - 10%
Di-2,6diS	< 5%
Di-4,6diS	< 5%
Di-2,4diS	< 5%
Di-triS	ND
Di-tetraS	ND
Título (p/p)	> 95% (o.d.b.)*
Densidad de carga	0.8-1.0
Ratio 4S/6S	0.1-9.0
* - o.d.b. : sobre base seca	

El CS obtenido con el proceso de acuerdo con la invención contiene una pequeña cantidad (<10%) de disacárido no sulfatado y porcentajes muy bajos (<5%) de disacáridos disulfatados; no se pueden identificar disacáridos trisulfatados.

5 El CS obtenido con el proceso de acuerdo con la invención se caracteriza por valores de densidad de carga de 0.8-1.0.

En algunas formas de implementación de la presente invención, el CS obtenido muestra una relación entre el disacárido sulfatado en la posición 4 (Di-4S) y el disacárido sulfatado en la posición 6 (Di-6S) menor que 1, mientras que en otras formas muestra una relación entre el disacárido (4S) y el disacárido (6S) mayor que 1.

10 El proceso de acuerdo con la presente invención permite modular la sulfatación específica del sitio para producir un CS con una relación 4S/6S específica dentro del rango especificado anteriormente.

15 La presente invención también se refiere a la producción de sulfato de condroitina (CS) con bajo peso molecular (LMW-CS BIOTEC, 4000-9000 daltons) por sulfatación química a partir de un esqueleto de condroitina no sulfatada, que a su vez se obtiene por hidrólisis ácida del polisacárido capsular K4 producido por la cepa O5: K4: H4 de E. coli, o producido directamente a partir de una E. coli modificada genéticamente. El sulfato de condroitina obtenido con bajo peso molecular se caracteriza por un intervalo de peso molecular de 4000-9000 daltons, que es mucho menor que el de los sulfatos de condroitina de origen natural, ya sea terrestre, en particular de origen bovino, porcino o aviar (14000-26000 daltons) o de origen marino, por ejemplo, obtenidos de tiburones, calamares, rayas o peces óseos (generalmente > 40000 daltons). En vista de estas características, el sulfato de condroitina obtenido por el proceso de la invención presenta una mayor absorción después de la administración oral y, por lo tanto, una mejor biodisponibilidad en humanos que el sulfato de condroitina natural o sulfato de condroitina altamente puro producido por procesos biotecnológicos/químicos. El sulfato de condroitina obtenido por el proceso de la invención posee una actividad antiinflamatoria y antiartrítica comparable con la del sulfato de condroitina natural altamente puro. El sulfato de condroitina obtenido por el proceso de la invención es adecuado para su uso en el tratamiento de procesos inflamatorios y artríticos o artrósicos.

25 El LMW-CS BIOTEC obtenido por el proceso de la invención tiene un peso molecular promedio, medido por SEC (Mw), de 4-9 kDa, y una distribución de grupos monosulfatados que van desde 90% de 4-sulfato y 10% de 6-sulfato al 10% de 4-sulfato y 90% de 6-sulfato. Las características del CS de bajo peso molecular son sustancialmente idénticas a las de los derivados de mayor peso molecular que se indican en la Tabla 2 anterior.

30 El LMW-CS BIOTEC tiene una pequeña cantidad (<10%) de disacáridos no sulfatados y porcentajes muy bajos (<5%) de disacáridos disulfatados, mientras que no se pueden identificar disacáridos trisulfatados.

LMW-CS BIOTEC se caracteriza por valores de densidad de carga de 0.8-1.0, que son comparables con los de CS natural de origen terrestre (ver Tabla 1).

35 El proceso de acuerdo con la invención también permite modular la sulfatación específica del sitio para suministrar un CS con una relación 4S/6S específica dentro de los límites especificados anteriormente, que son similares a los presentes en CS de origen natural.

El LMW-CS BIOTEC es reconocido y digerido por la condroitinasa ABC, una enzima lítica que tiene la tarea de catabolizar el CS natural en organismos específicos, demostrando así que las cadenas de polisacáridos de la LMW-CS biotecnológica no han sufrido modificaciones estructurales susceptibles de perjudicar el reconocimiento altamente sensible de enzimas naturales.

40 Finalmente, el LMW-CS BIOTEC digerido con condroitinasa C, una endoliasa que hidroliza el polisacárido en residuos sulfatados en la posición 6, pero no en la posición 4, produce secuencias de oligosacáridos típicas de la presencia de unidades Di-4S que alternan con unidades Di-6S la misma cadena de polisacárido, como ocurre en el CS natural (Figuras 1, 2 y 3). La Figura 1 describe en particular sulfato de condroitina natural de origen bovino tratado con condroitinasa C. Se pueden ver oligosacáridos de diferentes longitudes que indican la presencia de grupos sulfato en la posición 4 o 6 del residuo GalNAc en la misma cadena de polisacárido. El cromatograma se obtuvo por separación en gradiente en una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) y detección UV a 232 nm. El gradiente se obtuvo con NaCl 50 mM a NaCl 1.2 M de 0 a 60 minutos; la Figura 2 describe sulfato de condroitina natural de origen porcino tratado con condroitinasa C. Se pueden ver oligosacáridos de diferentes longitudes que indican la presencia de grupos sulfato en la posición 4 o 6 del residuo GalNAc en la misma cadena de polisacárido. El cromatograma se obtuvo por separación en gradiente en una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) y detección UV a 232 nm; la Figura 3 describe el LMW-CS BIOTEC, tratado con condroitinasa C. Una vez más, son visibles oligosacáridos de diferentes longitudes que indican la presencia de grupos sulfato en la posición 4 o 6 del residuo GalNAc en la misma cadena de polisacárido.

55 El cromatograma se obtuvo por separación en gradiente en una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) y detección UV a 232 nm.

- 5 El LMW-CS BIOTEC ha sido evaluado para determinar la absorción oral y la biodisponibilidad en humanos en comparación con el CS natural altamente puro de origen bovino, el primer estándar de la Farmacopea Europea. Esto es particularmente importante porque la presencia de una bacteria capaz de biosintetizar una enzima lítica específica para la descomposición de CS (y derivados con bajo peso molecular) se ha descrito en flora bacteriana humana pero no animal (Ahn MY, et al., *Can J Microbiol* 1998; 44: 423-9).
- La absorción oral y la biodisponibilidad de LMW-CS BIOTEC se han evaluado en seres humanos mediante técnicas conocidas.
- 10 El LMW-CS BIOTEC se evaluó en busca de una posible actividad antiinflamatoria mediante pruebas específicas como: la capacidad de inhibir una enzima proteolítica producida durante los procesos inflamatorios por los leucocitos, a saber, la elastasa de leucocitos humanos (Kostoulas G. et al., *Biol Chem* 378, 1481, 1997; Volpi N. *Chem Biol Interact* 105, 157, 1997; Ying QL et al., *Am J Physiol.* 272, L533, 1997); la capacidad de inhibir la actividad antiquimiotáctica, fagocítica, liberación de lisozima y daños a la membrana biológica por radicales libres en neutrófilos humanos (Matzner Y. et al., *Thromb Haemost* 52, 134, 1984; Ronca F, Palmieri L et al., *Osteoarthritis, Cartilage* 6 Suppl A, 14, 1998).
- 15 Estas pruebas se realizaron sobre el LMW-CS BIOTEC en comparación con un compuesto de referencia, un CS natural altamente puro de origen bovino que es el primer estándar de la Farmacopea Europea.
- 20 El LMW-CS BIOTEC también se evaluó por sus propiedades antiartríticas en un modelo animal, el "Modelo de Artritis Adyuvante (AA)", que es ampliamente reconocido por la comunidad científica y ha sido publicado en numerosos artículos científicos. Una vez más, los resultados se compararon con los obtenidos previamente con la molécula de referencia: el estándar de la Farmacopea Europea, un CS natural altamente puro de origen bovino (Volpi N. *J Pharm Sci* 96, 3168, 2007). De hecho, los modelos animales de OA y la artritis reumatoide (AR) son herramientas útiles para el estudio de estos procesos patógenos. La "artritis adyuvante" (AA) es uno de los modelos más utilizados. La AA en la rata es un modelo experimental de poliartritis que se ha utilizado ampliamente para probar numerosos agentes y medicamentos antiartríticos antes y después de ensayos clínicos completos (Bendele A et al., *Toxicol Pathol* 27, 134, 1999; Rovinsky J et al., *RheumatolInt.* 31, 507, 2011; Bauerova K et al., *Interdisc Toxicol* 4, 101, 2011). También se
- 25 han realizado numerosos estudios en los que los datos sobre animales obtenidos con la prueba de AA se compararon con los resultados en humanos (Kannan K et al., *Pathophysiology* 12, 167, 2005).
- La monosulfatación simultánea en la posición 4 o 6 de la cadena del polímero, la pureza y el bajo peso molecular le dan al LMW-CS BIOTEC una mayor absorción oral y una mejor biodisponibilidad.
- 30 Las composiciones del CS obtenidos de acuerdo con el proceso de la invención que incluye un vehículo aceptable en el campo farmacéutico o nutracéutico pueden formularse en diversas formas sólidas, como tabletas, cápsulas rígidas, cápsulas de gelatina blanda o mezclas en polvo para bebidas, o en forma líquida (soluciones), preferiblemente en forma de preparaciones farmacéuticas o nutracéuticas para administración parenteral u oral. La composición puede contener otros ingredientes activos o inactivos.
- 35 La composición también puede contener, preferiblemente, al menos una de las siguientes sustancias: clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, N-acetil glucosamina, ácido hialurónico, heparina, queratina, dermatina, metilsulfonil metano, folatos y folatos reducidos, vitaminas del grupo B, S-adenosilmetionina (S-AdoMet), ácido ascórbico o ascorbato de manganeso. La composición se puede administrar a pacientes en cantidades efectivas según sus necesidades.
- 40 Por ejemplo, el CS o la composición descrita en la presente invención se pueden administrar en una cantidad de entre 100 y 3000 mg por día, preferiblemente entre 1000 y 2000 mg por día, y más preferiblemente entre 1250 y 1750 mg por día, divididos en dos dosis de aproximadamente 600 mg o tres dosis de 400 mg al día.
- 45 Por ejemplo, el CS descrito o una composición del mismo se puede usar para hacer una preparación farmacéutica, un aditivo dietético o un suplemento nutricional para la prevención y/o el tratamiento de osteoartritis de cadera, mano o rodilla y sus principales síntomas (dolor, inflamación de las articulaciones, inflamación), enfermedad de Alzheimer, infecciones microbianas, arteriosclerosis y osteoporosis, y como adyuvante en el tratamiento antitumoral y la regeneración de tejidos, incluido el tejido nervioso.
- 50 Una característica ventajosa del proceso de acuerdo con la invención es que la sulfatación en la posición 4 o 6 del residuo GalNAc tiene lugar simultáneamente en la misma cadena de polisacárido, simulando el patrón de sulfatación observado en CS natural, a diferencia del obtenido con los métodos de síntesis descritos hasta ahora. Este aspecto se confirma con los datos obtenidos con el uso de dos sistemas enzimáticos diferentes, a saber, condroitinasa ABC, que es capaz de digerir unidades sulfatadas en la posición 6 y posición 4 y unidades no sulfatadas, y condroitinasa C, una endolisasa que es capaz de hidrolizarse en correspondencia con los residuos sulfatados en la posición 6 y residuos no sulfatados, pero incapaz de realizar una escisión lítica similar a la de los residuos sulfatados en la posición 4. Los productos de la digestión, obtenidos con la condroitinasa ABC y con la condroitinasa C sola, se analizan con técnicas
- 55 de cromatografía de HPLC, según lo descrito por Joon-Soo Sim et al. (*J. Chromatography B*, 2005 vol. 818, 133-139), indicando cualitativamente y cuantitativamente la presencia de disacáridos Di-0S, Di-4S y Di-6S y cualquier oligosacárido no digerido por las enzimas.

El análisis de los productos de la digestión con condroitinasa ABC demuestra una digestión casi total del producto con la formación del disacárido no sulfatado Di-0S, los disacáridos monosulfatados Di-4S y Di-6S, y trazas de disacárido disulfatado Di-4,6S.

5 Sin embargo, el mismo análisis realizado en los productos de digestión con condroitinasa C muestra claramente la presencia de secuencias de disacáridos, y sobre todo de secuencias de oligosacáridos, lo que indica la incapacidad de la enzima para descomponer el polisacárido completamente debido a la presencia en las mismas cadenas de GalNAc sulfatado en 4. Esto se debe a que cuando un residuo sulfatado está presente en 4, la enzima es incapaz de actuar y, en consecuencia, deja residuos de oligosacáridos. Dichos residuos también se detectan claramente mediante técnicas de cromatografía y electroforesis, como la cromatografía en gel y la electroforesis capilar (CE), como se muestra, por ejemplo, en los registros cromatográficos de las Figuras 1, 2 y 3 relacionados con la digestión con condroitinasa C de CS natural (bovina y porcina) y CS biotecnológica obtenida de acuerdo con la presente invención. Contienen diversos oligosacáridos de diferentes longitudes en los que los grupos sulfato están presentes en la posición 4 o 6 del residuo GalNAc en la misma cadena de polisacárido.

15 Todas estas propiedades dan al CS obtenido con el proceso según la presente invención la estructura de un CS natural que tiene las siguientes características:

- a) todos o casi todos los residuos de GalNAc están monosulfatados en la posición 6 o 4;
- b) dependiendo de las condiciones de síntesis utilizadas, la relación entre los residuos 4S y 6S (4S/6S) es completamente análoga a la encontrada en CS de origen tanto terrestre como piscícola.

20 Típicamente, el CS se puede obtener utilizando como sustrato de partida el polisacárido capsular K4 producido naturalmente por la cepa O5:K4:H4 de *E. coli* (EP 1304338 B1) u otro polisacárido que tiene la estructura de la condroitina sin sulfato (CH).

En el primer caso, el polisacárido K4, obtenido a partir de un caldo de cultivo de la cepa O5:K4:H4 de *E. coli*, se desfigura al final de la fermentación mediante hidrólisis termoácida, y la condroitina se purifica de acuerdo con una adaptación de los métodos descritos por Rodríguez y Jann (Eur. J. Biochem. 117, 117-124, FEBS 1988).

25 Alternativamente, el polisacárido de partida se obtiene, por ejemplo, del cultivo de la cepa DSM23644 de *E. coli* descrito en MI2010A001300 que, debido a una mutación inducida en el gen KfoE responsable de la fructosilación de K4, produce un polisacárido idéntico al CH sin sulfato natural. La desfructosilación no es necesaria en este caso; sin embargo, la etapa de hidrólisis termoácida se mantiene para eliminar algunas impurezas, incluidas las endotoxinas bacterianas que precipitan como resultado del tratamiento. La condroitina (CH) se purifica luego por centrifugación, diálisis y secado por pulverización.

30 La hidrólisis se lleva a cabo en el sobrenadante del cultivo, separado de la biomasa por centrifugación continua. La hidrólisis parcial y la desfructosilación de K4 se realizan por incubación a 90-95°C durante 30-50 min a pH 2.8-3.0.

35 Después del período de incubación, la suspensión resultante se enfría a una temperatura inferior a 40°C, preferiblemente 20-30°C, para detener la reacción de hidrólisis, y el pH se ajusta simultáneamente a 4-4.5. La suspensión resultante se somete, en secuencia, a una clarificación por centrifugación continua, ultrafiltración y, finalmente, diálisis con agua a través de una membrana de 30 kDa.

40 El retenido dializado (aproximadamente 1/10 del volumen del caldo de cultivo inicial) se filtra y finalmente se seca con un secador de pulverización para obtener un polisacárido que tiene la estructura de CH, para someterlo al proceso de sulfatación. El CH obtenido tiene un título del 80-90% en base seca (p/p), según lo determinado por electroforesis capilar (CE) o HPLC.

El CH así obtenido toma la forma de la sal de sodio, y para ser sulfatado necesita convertirse en ácido libre o una sal del mismo.

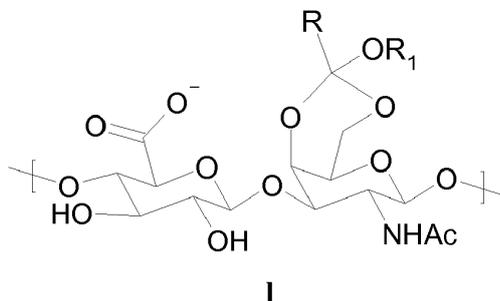
45 El proceso de sulfatación de acuerdo con la presente invención, que permite que las posiciones 4 o 6 del residuo GalNAc de la misma cadena de polisacárido se monosulfaten al azar, comprende la formación de un ortoéster que involucra simultáneamente las posiciones 4 y 6 de GalNAc y su posterior reordenamiento a un éster que, sorprendentemente, se puede modular para liberar principalmente el hidroxilo en 4 o en 6, permitiendo así la sulfatación selectiva de esos hidroxilos. El proceso de acuerdo con la invención comprende los siguientes pasos:

50 a) Conversión de la sal sódica de condroitina en ácido libre o, alternativamente, en una sal del mismo con un ion de amonio cuaternario, como tetrametil, tetraetil o tetrabutilamonio, o con piridina. Preferiblemente se usa sal de tetrabutilamonio (TBA).

Alternativamente, la condroitina (CH) en forma ácida se convierte en su éster metílico después de la reacción en metanol y cloruro de acetilo.

b) Reacción de la sal de condroitina, o éster metílico de condroitina, con un ortoéster de fórmula $RC(OR_1)_3$, en donde R se selecciona de hidrógeno, metilo, etilo o fenilo, y R_1 se selecciona de metilo o etilo, en presencia de catálisis ácida,

obteniendo así un ortoéster cíclico formado por el movimiento de dos alcoxilos del ortoéster de partida por las funciones alcohólicas 4 y 6 del residuo de GalNAc. En el compuesto obtenido en esta etapa, todas o casi todas las unidades de disacáridos presentes poseen una estructura ortoéster cíclica representada por la fórmula I,

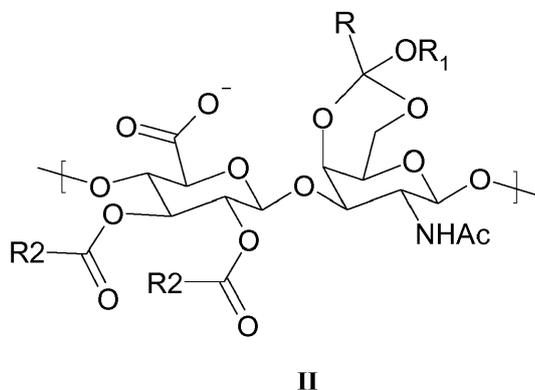


5 en donde R, R₁ son como se definen más arriba.

Ejemplos de ortoésteres que pueden usarse son ortoacetato de trimetilo, ortoacetato de trietilo, ortoformiato de trimetilo, ortoformiato de trietilo, ortopropionato de trimetilo, ortopropionato de trietilo u ortobenzoato de trimetilo. Se usa preferiblemente ortoacetato de trimetilo o ortoacetato de trietilo. El uso de ortoacetato de trimetilo es particularmente preferido.

10 Se utiliza como catalizador ácido un ácido seleccionado de ácido canforsulfónico, ácido paratoluenosulfónico, ácido metanosulfónico o una resina sulfona, preferiblemente ácido canforsulfónico o una resina sulfónica, más preferiblemente ácido canforsulfónico.

c) Protección de los grupos alcohol en las posiciones 2' y 3' del residuo GlcA por acilación con un anhídrido de un ácido carboxílico de fórmula (R₂CO)₂O, en donde R₂ se selecciona preferiblemente de metilo, etilo o propilo en presencia de piridina o una base orgánica terciaria, como trietilamina o triisopropiletilamina, y de cantidades catalíticas de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), para dar un producto en donde la unidad de disacáridos repetida encontrada en la condroitina tiene una estructura ortoéster cíclica acilada en 2' y 3', la cual está representado por la fórmula II

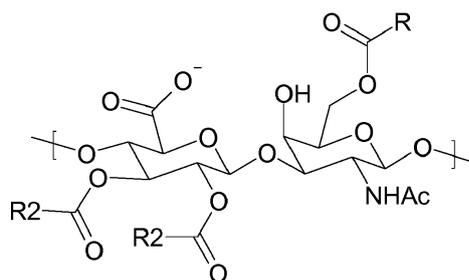


en donde R, R₁ y R₂ son como se definen más arriba.

20 Se usa preferiblemente anhídrido acético.

d) Reordenamiento del ortoéster cíclico a éster, una reacción que se realiza en una mezcla de un ácido orgánico soluble en agua y agua, o solo en agua. Este reordenamiento, que tiene lugar aleatoriamente en las distintas unidades de GalNAc de la secuencia de polisacáridos, puede modularse para promover la liberación de uno u otro hidroxilo (en 4 o 6 respectivamente), con la formación simultánea del éster con el ácido orgánico soluble usado en la posición restante (6 o 4 respectivamente). El resultado es la formación, en la misma cadena de polisacáridos, de dos unidades de disacáridos diferentes, a saber:

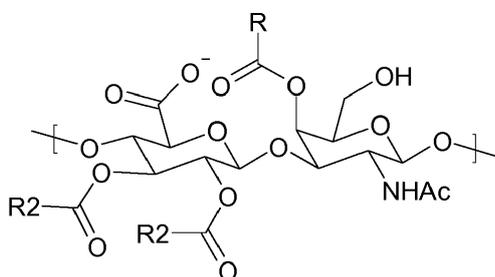
- aquellos con una estructura en donde los hidroxilos en las posiciones 6, 2' y 4' están acilados y el hidroxilo en 4 está libre, dichas unidades están representadas por la fórmula IIIa;



IIIa

en donde R y R₂ son como se definen más arriba; o

- aquellos con una estructura en donde los hidroxilos en las posiciones 4, 2' y 4' están acilados y el hidroxilo en 6 está libre, dichas unidades están representadas por la fórmula IIIb



IIIb

5

en donde R y R₂ son como se definen más arriba.

- Al realizar la reacción a una temperatura de entre 20 y 40°C, preferiblemente a temperatura ambiente durante un tiempo de entre 1 y 48 horas, preferiblemente entre 3 y 38 horas, y más preferiblemente durante 38 horas, se observa sorprendentemente una mayor cantidad de compuesto que tiene el hidroxilo libre en 6, mientras que cuando la reacción se realiza a una temperatura de entre 40 y 70°C, preferiblemente 60°C, durante un tiempo de entre 1 y 48 horas, preferiblemente entre 3 y 38 horas, y más preferiblemente durante 18 horas, prevalece el producto con el hidroxilo libre en la posición 4. El ácido orgánico soluble en agua se selecciona entre ácido cítrico acético, fórmico, propiónico, tartárico o una resina catiónica tal como, por ejemplo, Sepra SCX 50 µm 65A, preferiblemente ácido acético o ácido propiónico, y más preferiblemente ácido acético.

- d) A esto le sigue la sulfatación con trióxido de azufre piridina en DMF de acuerdo con el método ya descrito en el documento EP 1304338 B1, o con el complejo de trióxido de azufre de DMF, para obtener un CS que, de acuerdo con las condiciones de reordenamiento utilizadas y, en consecuencia, el porcentaje de las estructuras IIIa y IIIb presentes en las mismas, se sulfatarán simultáneamente y de manera diversa en la posición 4 del disacárido IIIa o en la posición 6 del disacárido IIIb. La reacción de sulfatación es seguida por la eliminación, por tratamiento básico, de los grupos acilo presentes en las posiciones 2' y 3' del residuo GlcA y las posiciones 4 o 6 del residuo GalNAc, de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento EP 1304338 B1, dando CS sal sódica parcialmente sulfatada en 4 y 6.

Algunas técnicas utilizadas durante el proceso conducen a la despolimerización de la cadena de polisacárido para producir un CS sulfatado en la posición 4 o 6 del residuo de GalNAc caracterizado por un bajo peso molecular (LMW).

- La condroitina también puede ser despolimerizada en la etapa de reordenamiento ortoéster, utilizando el ácido como solvente o cosolvente de la reacción. La alta concentración de ácido en esta etapa conduce a la ruptura de la cadena de polisacárido, con la consiguiente producción de cadenas de bajo peso molecular, en el rango de 4-9 kD.

- El LMW-CS BIOTEC, 4000-9000 daltons, obtenido por el proceso descrito, se evaluó para determinar su eficacia en un modelo experimental de artritis animal (artritis adyuvante AA) en ratas, y los resultados se compararon con los de CS natural de grado farmacéutico de origen extraído utilizado en el mismo modelo experimental (Bauerova K. et al., Osteoarthritis Cartilage 2011, E pub. ahead of print) después de tratamiento oral diario con 900 mg/kg.

La AA fue inducida por una sola inyección intradérmica de Mycobacterium butyricum en adyuvante incompleto de Freund. Los experimentos incluyeron animales sanos, animales artríticos no tratados y animales artríticos tratados.

Entre los animales tratados, un grupo de animales se sometió a un tratamiento previo que consistió en la administración de 900 mg/kg de LMW-CS BIOTEC al día durante 14 días antes de que se indujera la artritis, continuando durante 28 días después de la inducción con AA. Otro grupo de animales se trató con 900 mg/kg de LMW-CS BIOTEC al día únicamente durante los 28 días posteriores a la inducción con AA.

- 5 El edema que se desarrolló en la pata trasera se redujo significativamente en los animales pretratados. El tratamiento previo con LMW-CS BIOTEC (900mg/kg/día) redujo significativamente el edema a lo largo del experimento en comparación con los controles no tratados. El tratamiento previo con LMW-CS BIOTEC también restaura el peso corporal en aproximadamente 8-15% en comparación con el control artrítico no tratado.

- 10 La gravedad de la artritis se cuantificó sobre la base del aumento de los niveles de inflamación y eritema periarticular. 900 mg/kg/día de LMW-CS BIOTEC, administrado como pretratamiento y como tratamiento, es significativamente efectivo para reducir el nivel de la artritis. Además, el tratamiento previo es efectivo en toda la etapa subaguda (desde el día 14 hasta el día 28 después de la inducción con AA), mientras que el tratamiento solo es efectivo a medio-largo plazo, en los días 21-28 después de la inducción con AA, no en la fase aguda (los primeros 14 días después de la inducción con AA).

- 15 El estrés oxidativo, una consecuencia de los procesos inflamatorios crónicos que tienen lugar en los procesos artríticos/osteoartríticos, aumenta significativamente en el modelo animal tanto en la fase aguda como en la subcrónica. El aumento del estrés oxidativo induce un alto consumo de antioxidantes endógenos en el plasma y, en consecuencia, provoca una reducción en la capacidad antioxidante del plasma, medida como el estado antioxidante total. El tratamiento previo con LMW-CS BIOTEC es eficaz para corregir el estado total de antioxidantes en el modelo animal, reduciendo significativamente el consumo de antioxidantes endógenos. La actividad de la γ -glutamyl transferasa, que aumenta la correspondencia con el estrés oxidativo y por lo tanto se considera un buen marcador para el estrés oxidativo, medido en homogeneizados de tejidos articulares, demostró ser considerablemente mayor en animales con poliartritis inducida experimentalmente, y considerablemente menor en los animales tratados con LMW-CS BIOTEC, en comparación con los animales no tratados.

- 20 La interleuquina-1 β (IL-1 β) e interleuquina-6 (IL-6), citoquinas proinflamatorias, aumentaron significativamente en el modelo animal de artritis inducida experimentalmente, con un aumento dramático de IL-6 en la fase aguda, presentando un nivel 10 veces más alto que los controles sanos. El efecto terapéutico de LMW-CS BIOTEC ya era evidente desde el día 14, en la fase aguda, reduciendo la concentración de IL-6 en aproximadamente un 30-40% en comparación con los animales que sufren AA.

- 25 El marcador básico para las proteínas inflamatorias, a saber, la proteína C reactiva (CRP), tiene un perfil de tiempo muy similar al de la IL-6. El aumento en la fase aguda fue de aproximadamente 7.5 veces mayor en el modelo de artritis experimental que en los controles sanos. El efecto de LMW-CS BIOTEC en la PCR, al igual que su efecto en el nivel de IL-6, se observa en la fase aguda, con una reducción significativa en la concentración plasmática de PCR.

- 30 En lo que respecta a la actividad fagocítica y al aumento oxidativo intracelular de los neutrófilos, las diferencias observadas entre el control sano y el control que padecen AA experimental inducida fueron significativas en el caso de una mayor actividad fagocítica. La administración de LMW-CS BIOTEC sobre una base de tratamiento previo indujo una reducción significativa en la fagocitosis y la explosión oxidativa.

- 35 El LMW-CS BIOTEC reduce significativamente la gravedad de los procesos artríticos y el estrés oxidativo generado como resultado de procesos inflamatorios crónicos. El tratamiento previo con LMW-CS BIOTEC es efectivo en toda la etapa subaguda, mientras que el tratamiento desde el primer día de inicio de AA solo es efectivo durante el período crónico. Los efectos se confirman por una mejora en el estado total de antioxidantes y la actividad de la γ -glutamyl transferasa. El LMW-CS BIOTEC, administrado como tratamiento previo, también reduce la producción de citoquinas proinflamatorias, la proteína C reactiva en el plasma, la actividad fagocítica y el estallido oxidativo intracelular de los neutrófilos. Finalmente, el LMW-CS BIOTEC ha demostrado ser eficaz para retardar el desarrollo de artritis/osteoartritis experimental tanto en la etapa aguda como en la subcrónica, y en la reducción de los marcadores de la enfermedad, apoyando así su actividad beneficiosa, a la par con la del compuesto de referencia.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de una sal de tetraalquilamonio o piridinio de condroitina

- 50 La sal sódica de CH obtenida después de la hidrólisis, purificación y secado por los métodos descritos anteriormente, a partir del polisacárido K4 o el polisacárido obtenido de la fermentación de E. coli cepa DSM23644, se disuelve en un medio acuoso. Después de la disolución completa, la solución se introduce en una columna rellena con una resina de intercambio catiónico, como Amberjet 1200 H, Rohm and Haas, o equivalente.

- 55 Se recolectan las fracciones eluidas a pH 1.5-4.0, o preferiblemente a pH 1.5-2.0, y se agrega una solución acuosa de un ion seleccionado de tetrametil, tetraetil y tetrabutil-amonio o piridinio hasta que se obtiene un pH de 6.0-8.0, o preferentemente de 6.5 a 7.0. La solución se evapora luego para completar la sequedad mediante liofilización o secado por pulverización para obtener la sal correspondiente.

Ejemplo 2: Protección de las funciones hidroxiladas (4 y 6) de la porción GalNAc con la formación del correspondiente ortoéster metilo cíclico CH (CH-cMOE)

5 La sal obtenida de la condroitina, como la sal de tetrabutilamonio (TBA), se mezcla con dimetilformamida (DMF) en un matraz en cantidades de 5.2 g y 130 ml, respectivamente. Se aplican por goteo 8.49 g de ortoacetato de trimetilo en el matraz, seguido de la adición de 300 mg de ácido canforsulfónico y la mezcla de reacción se mantiene a 70°C durante 72 horas. La reacción se evapora luego al vacío hasta sequedad, y se seca adicionalmente al horno a 40°C durante 20 horas para obtener 6.1 g de condroitina-MOE TBA en forma de un sólido.

10 Los análisis sobre el producto de la reacción se realizaron para confirmar que la protección había tenido lugar. La desaparición del producto de partida y la aparición de un nuevo producto con un peso molecular más alto (48 kDa) se estableció con SEC-HPLC. Los análisis realizados por digestión con condroitinasa ABC, una enzima capaz de hidrolizar el CH libre pero no protegido, demostraron que el porcentaje desprotegido de moléculas CH iniciales era inferior al 15%.

Ejemplo 3: Acetilación en 2',3' de ortoéster cíclico de condroitina (2',3' diacetil CH-cMOE)

15 La condroitina que se origina en la etapa anterior, protegida como ortoéster de metilo cíclico (CH-cMOE) (4.79 g), se introduce en un matraz de reacción con 23.95 ml de acetonitrilo, 15.69 ml de trietilamina (TEA), 6.21 ml de anhídrido acético y 78.96 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Después de 2 horas de agitación a 25-26°C, se agregan 94 ml de diisopropil éter para obtener un sólido viscoso, que luego se filtra a través de papel de filtro y se seca al vacío a 45°C durante 24 horas. El ortoéster cíclico intermedio así obtenido tiene la apariencia de un sólido rosa.

20 Ejemplo 4: Reordenamiento del ortoéster de metilo cíclico a éster con formación prevalente de acetato en la posición 4, y con el hidroxilo libre en la posición 6 (ver figura IIIB)

El intermedio obtenido de la etapa anterior (2.42 g) se introduce en un matraz de reacción, al que se agregan 18.8 ml de ácido acético al 96% y 2.35 ml de agua desmineralizada. La mezcla se agita durante 38 horas a temperatura ambiente, después de lo cual se agregan 100 ml de una solución 0.6 M de NaCl y la mezcla se ultrafiltra a través de una membrana de 5 kDa y se dializa, para recuperar un retenido con un pH de 3.32.

25 La solución se evapora al vacío a 45-50°C; después de un secado adicional al horno durante la noche, se obtienen 1.38 g de un producto con la apariencia de un sólido vítreo.

Ejemplo 5: Reordenamiento del ortoéster de metilo cíclico a éster con formación prevalente del acetato en la posición 6 y con el hidroxilo libre en la posición 4 (ver Figura IIIA)

30 2.42 g de ortoéster cíclico intermedio obtenido de la etapa anterior se introducen en un matraz de reacción con 14.52 ml de ácido acético al 96% y 9.8 ml de agua desmineralizada y se calientan a 60°C durante 17.5 horas, luego se agregan 100 ml de NaCl 0.6 M y la solución (pH 2.27) se ultrafiltra y se dializa para recuperar un retenido con un pH de 3.56.

La solución se evapora al vacío a 45-50°C, y después de un posterior secado al horno durante toda la noche, se obtienen 1.12 g de un producto con la apariencia de un sólido vítreo.

35 Ejemplo 6: Preparación de sulfato de condroitina con complejo de trióxido de azufre piridinio

40 El producto intermedio obtenido como se describe en el ejemplo 4 (0.76 g) se introduce en un matraz con 46.0 ml de DMF agitando la mezcla a 30°C durante 10 min. Se añaden 0.72 g de trióxido de azufre piridinio y, cuando el material de partida se ha disuelto (aproximadamente 10 min), la solución se deja en agitación a 30°C durante 1 hora. Luego se añaden otros 0.72 g de trióxido de azufre piridinio, seguido de otros 0.72 g de trióxido de azufre piridinio. La solución se agita durante una hora más a 30°C.

La reacción se detiene al verter la mezcla en 50 ml de NaHCO₃ al 10% en agua a temperatura ambiente (pH 7.81). Después de la filtración, la solución se evapora al vacío (10 mBar) hasta sequedad, el residuo se redisuelve con 150 ml de NaCl 0.6 M y, finalmente, la solución se ultrafiltra.

45 Después de 6 cambios de volumen, el retenido tiene un pH de 9.22; El pH se ajusta a 6.7 con HCl IN y la ultrafiltración continúa, reemplazando la solución de 0.6N NaCl con agua desmineralizada.

La solución resultante se ultrafiltra de nuevo para obtener 2 volúmenes y luego se dializa a un volumen de 20 ml. La solución dializada se concentra a sequedad al vacío (10 mBar, 45°C).

50 El producto así obtenido (0.88 g) se disuelve con 34.0 ml de sosa 0.2 N (NaOH) y se calienta a 40°C bajo agitación durante 2 horas. Finalmente, la solución se diluye con una solución acuosa 0.6 M de cloruro de sodio, se ultrafiltra a través de una membrana de 5 kDa y se dializa con agua desmineralizada. El retenido se concentra a sequedad al vacío (45°C, 10 mBar), para obtener 0.67 g de sulfato de condroitina. El producto final, que tiene un peso molecular de 29 kDa, determinado por HPLC-SEC, muestra:

- digestibilidad con condroitinasa ABC superior al 95%;
- una relación 4S/6S de 18/82;
- un valor de densidad de carga total de aprox. 0.9;
- solo digestibilidad parcial con condroitinasa C, demostrada por la presencia de oligosacáridos debido a la presencia en la misma cadena de polisacárido de unidades tanto 4-sulfatadas como 6-sulfatadas, característica de la presente invención.

5

Ejemplo 7: Preparación de sulfato de condroitina con complejo de trióxido de azufre piridinio

10 El intermedio obtenido como se describe en el ejemplo 5 (1.12 g) se introduce en un matraz con 67.2 ml de DMF, agitando la mezcla a 50°C durante 10 min. Se añaden 1.05 g de trióxido de azufre piridinio, y cuando el material de partida se ha disuelto (aproximadamente 10 min), la solución se deja en agitación a 50°C durante 1 hora. Luego se añaden otros 1.05 g de trióxido de azufre piridinio. La solución se agita durante una hora más a 50°C.

La reacción se detiene al verter la mezcla en 60 ml de NaHCO₃ al 10% en agua a temperatura ambiente (RT) (pH 7.81). Después de la filtración, la solución se evapora al vacío (10 mBar) hasta sequedad, y el residuo se redissuelve con 30 ml de NaCl 0.6M. Finalmente, la solución es ultrafiltrada.

15 Después de 6 cambios de volumen, el retenido tiene un pH de 9.22; el pH se ajusta a la neutralidad (7.5) con HCl 1 N y la microfiltración continúa, reemplazando la solución de NaCl 0.6 N con agua desmineralizada.

La solución resultante se ultrafiltra de nuevo para 2 volúmenes y luego se dializa a un volumen de 20 ml. La solución dializada se concentra a sequedad al vacío (10 mBar, 45°C), para obtener 1.53 g de producto.

20 Este residuo se disuelve en 59.6 ml de sosa 0.2 N (NaOH) y se calienta a 60°C durante 2 horas. Finalmente, la solución se diluye con una solución acuosa 0.6 M de cloruro de sodio, se ultrafiltra a través de una membrana de 3 kDa y se dializa con agua desmineralizada. El retenido se concentra a sequedad al vacío (45°C, 10 mBar), para obtener 0.76 g de sulfato de condroitina.

25 El producto así obtenido tiene un peso molecular de 15.4 kDa, determinado por HPLC-SEC; digestibilidad con condroitinasa ABC superior al 95%; una relación 4S/6S de 82/18; y un valor de densidad de carga total de aprox. 1.09. La digestión casi completa obtenida con la condroitinasa ABC (más del 95% del producto se descompone), junto con una digestibilidad reducida con la condroitinasa C, que son características de la presente invención, demuestran la existencia de unidades tanto 4-sulfatadas como 6-sulfatadas en la misma cadena de polisacárido.

Más del 95% de digestibilidad con condroitinasa ABC también demuestra la ausencia de disacáridos polisulfatados (tri- y tetra-sulfatados) en la cadena de polisacáridos CS a la que se refiere la presente invención.

30 Ejemplo 8: Preparación de condroitina (CH) metil éster

Se agregan 10.0 g de CH en forma ácida a una solución de 1.3 L de metanol y 14.43 g de cloruro de acetilo colocados bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 horas en un matraz de 3 litros, y la suspensión obtenida se deja bajo agitación durante 20 horas.

35 Cuando haya transcurrido ese tiempo, la suspensión se filtra y el sólido se lava con 100 ml de metanol (2 x 50 ml) y se seca a 50°C al vacío para recuperar 9.4 g de sólido seco.

La reacción se repite una segunda vez con el mismo procedimiento, y cuando el segundo período ha transcurrido, la suspensión se enfría entre 0 y 5°C durante 60 minutos antes de la filtración. El sólido obtenido se lava con metanol frío (0-5°C) y se seca al vacío durante 3 horas a 50°C para recuperar 6.3 g de sólido.

40 Ejemplo 9: Protección de las funciones hidroxiladas (4 y 6) de la porción GalNAc de CH metil éster por formación de ortoéster

Se introducen 150 ml de dimetilformamida (DMF) y 6.0 g del producto obtenido en la etapa anterior en un matraz de 500 ml con una válvula de cloruro de calcio y flujo de nitrógeno. Luego se agregan 20.06 g de ortoacetato de trimetilo y 0.71 g de ácido canforsulfónico. La solución obtenida se calienta a 50°C (temperatura interna) durante 18 horas.

Al final de ese período, se deja enfriar a temperatura ambiente y se concentra al vacío para obtener 8.5 g de producto.

45 Ejemplo 10: Acetilación de los hidroxilos 2',3' del producto derivado del Ejemplo 9

Se introducen 8.0 g del producto obtenido en la etapa anterior, 40 ml de DMF, 28.6 g de trietilamina, 17.15 g de anhídrido acético y 96 mg de dimetilaminopiridina en un matraz de 250 ml con una válvula de cloruro de calcio y flujo de nitrógeno a temperatura ambiente.

50 La solución obtenida se deja en agitación durante 3 horas; cuando haya transcurrido ese tiempo, se añaden 150 ml de éter isopropílico al matraz y precipita un sólido amorfo. Las aguas se eliminan por decantación y se agregan 100

ml de éter isopropílico al sólido y se dejan bajo agitación durante 1 hora. El sólido se filtra y se lava con 50 ml de éter isopropílico y se seca al vacío a 40°C para recuperar 8.52 g de producto.

Ejemplo 11: Reordenamiento del ortoéster derivado del ejemplo 10

- 5 Se introducen 7.0 g del producto obtenido en el paso anterior, 72.8 g de ácido acético glacial y 8.7 ml de agua en un matraz de 250 ml para obtener una solución que se deja en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se diluye luego a 150 ml con cloruro de sodio 0.6 M y la solución resultante se purifica mediante ultrafiltración a través de una membrana de 5 KD. Después de la diálisis, la solución obtenida se concentra al vacío y se recuperan 6.7 g de producto sólido.

Ejemplo 12: Sulfatación de triacetilmetil éster

- 10 Se introducen 670 mg del producto obtenido en la etapa anterior en un matraz de 250 ml con flujo de nitrógeno y una válvula de cloruro de calcio con 40 ml de DMF.

Se añaden 630.44 g de complejo de trióxido de azufre piridinio a la solución obtenida y la solución resultante se calienta a 50°C (temperatura interna) durante 1 hora. Luego se añaden 630.44 g de complejo de trióxido de azufre piridinio al matraz a la misma temperatura y se dejan nuevamente en agitación durante 1 hora.

- 15 Cuando haya transcurrido ese tiempo, la solución se enfría a temperatura ambiente y se agregan al matraz 40 ml de NaHCO₃ al 3% a la misma temperatura para producir una solución que se concentra al vacío para obtener 2.3 g de un sólido mezclado con sales inorgánicas. El producto obtenido se diluye a 150 ml de cloruro de sodio 0.6 M y se ultrafiltra a través de una membrana de 5 KDa.

Después de la diálisis, la solución obtenida se concentra al vacío y se recuperan 1.32 g de producto sólido.

- 20 Ejemplo 13: Para obtener sulfato de condroitina.

El producto obtenido en el paso anterior se introduce en un matraz de 100 ml con 33 ml de soda 0.2 M. La solución se calienta a 40°C (temperatura interna) durante 2 horas, después de lo cual se enfría a temperatura ambiente y se neutraliza con HCl 1M.

- 25 La solución se diluye a 150 ml de cloruro de sodio 0.6 M y se ultrafiltra a través de una membrana de 5 KDa. Después de la diálisis y la concentración de la solución al vacío, se obtienen 350 mg de sólido.

El producto obtenido en este ejemplo tiene un peso molecular de 11 KDa, una relación 4S/6S de 47/53 y un valor de densidad de carga de 0.9.

Ejemplo 14: formación de ortoéster cíclico sobre las funciones hidroxilo en 4 y 6 de la porción de GalNAc, con despolimerización simultánea de la cadena de polisacárido

- 30 Una suspensión de sal de tetrabutilamonio de condroitina, obtenido como se describe anteriormente (4.07 g; 6.535 mmoles), en dimetilformamida (101 ml), se mantuvo bajo agitación y bajo flujo de nitrógeno a temperatura ambiente (20-25°C). Se añadieron ortoacetato de trimetilo (9.03 ml, 71.89 mmoles) y ácido canforsulfónico (1.82 g; 7.84 mmoles). La suspensión se calentó a 70°C (temperatura interna) y se observó una disolución completa después de unos pocos minutos. La reacción se mantuvo bajo agitación a la misma temperatura durante 18-20 horas. Al día siguiente, la reacción se concentró eliminando el disolvente por evaporación al vacío, proporcionando 13.67 g del producto en forma de un residuo de goma amarillo brillante.

El contenido residual de condroitina desprotegida después de la digestión es de 4.6%. La presencia del ortoéster se demuestra mediante la señal correspondiente en FTIR.

- 40 El producto así obtenido se usó en los pasos subsiguientes como se describió anteriormente, hasta que se obtuvo un LOTO-CS BIOTEC sulfatado en la posición 4 o 6 en el residuo de GalNAc.

Ejemplo 15: Apertura del ortoéster cíclico de la condroitina al éster con formación prevalente de acetato en la posición 4 o 6 de la porción de GalNAc, y despolimerización simultánea de la cadena de polisacárido

- 45 Se introdujo ortoéster de condroitina (3.00 g), agua (3.14 ml) y ácido acético (26.25 g; 437 mmoles) en un matraz de tres bocas de 250 ml. La suspensión obtenida se calentó durante 36 h a temperatura ambiente (20-25°C). Luego se añadió agua para completar la solución hasta un volumen total de 100 ml. La solución así obtenida fue ultrafiltrada (membrana 5 KD). El retenido recogido se dializó a un pequeño volumen (20 ml) y luego se concentró hasta sequedad por evaporación al vacío, proporcionando 1.55 g de un residuo sólido correspondiente al producto deseado (triacetil condroitina).

- 50 El producto así obtenido se usó en los pasos subsiguientes como se describió anteriormente, hasta que se obtuvo un LOTO-CS BIOTEC sulfatado en la posición 4 o 6 en el residuo de GalNAc.

Ejemplo 16: inducción de artritis (Artritis Adyuvante, AA) en ratas y tratamiento con LMW-CS BIOTEC

Se asignaron al azar 40 ratas Lewis macho que pesaban entre 150 y 190 g, a cuatro grupos de 10 animales cada uno, se alojaron en jaulas de polipropileno en un entorno mantenido a la temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y se alimentaron con una dieta estándar de laboratorio con acceso ilimitado al agua.

5 Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) Un grupo de control sano no tratado.
- 2) Un grupo de control no tratado con artritis inducida por adyuvante (AA).
- 3) Un grupo de ratas artríticas tratadas por vía oral con LMW-CS BIOTEC a la dosis de 900 mg/día por kg de peso corporal durante 28 días después de la inducción con AA (días 0-28 del experimento).
- 10 4) Un grupo pretratado por vía oral con LMW-CS BIOTEC a la dosis de 900 mg/día por kg de peso corporal durante los 14 días anteriores a la inducción de los artículos de asociación, y durante los 28 días posteriores a la inducción con AA (días -14 a +28 del experimento).

La artritis se indujo experimentalmente en ratas en el día 0 mediante una inyección intradérmica única de 1 ml de una mezcla que consiste en *Mycobacterium butyricum* inactivado por calor en adyuvante incompleto de Freund.

15 El LMW-CS BIOTEC se disolvió en agua destilada a una concentración de 20 mg/ml y se administró por vía oral como una dosis diaria única por sonda.

Al final del tratamiento de 28 días, las ratas se sacrificaron bajo anestesia y se recogieron y analizaron la sangre y los tejidos correspondientes para evaluar los parámetros observados en el estudio.

20 Ejemplo 17: efectos de LMW-CS BIOTEC en la evaluación de AA en ratas registrando el edema desarrollado, el peso corporal y el nivel de la artritis

El edema que se desarrolló como consecuencia de la artritis se midió observando el aumento en el volumen de la pata trasera con un calibre adecuado para la medición. Las mediciones se realizaron antes de la inducción con AA y en el día 28 del estudio.

25 El peso corporal de las ratas se midió antes de la inducción con AA y al final del tratamiento (día 28). El efecto del tratamiento en este parámetro se evaluó comparando los distintos aumentos de peso de los diferentes grupos durante el período de tratamiento.

30 El nivel de la artritis se evaluó atribuyendo un nivel a la inflamación de la articulación de la pata y la extensión del eritema periarticular. El nivel de artritis o artrograma se midió como la suma total de edema (en ml, máximo 8 puntos), más el diámetro de la pata delantera (en mm, máximo 5 puntos), más el diámetro de la costra en el sitio de aplicación de *Mycobacterium butyricum* medido en paralelo a la columna vertebral (en mm, máximo 5 puntos), para cada animal.

Ejemplo 18: Efecto de LMW-CS BIOTEC sobre la actividad de la γ -glutamil transferasa como marcador del estrés oxidativo inducido por AA

35 El estrés oxidativo se evaluó midiendo la actividad de la γ -glutamil transferasa en homogeneizados de tejido articular extraído de ratas al final de los tratamientos con LMW-CS BIOTEC. La γ -glutamil transferasa se considera un marcador para el estrés oxidativo.

40 La actividad de la γ -glutamil transferasa celular se determinó en homogeneizados de tejido tomados de la pata trasera y se evaluó mediante el método de Orłowski y Meister (Orłowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. Proc Natl Acad Sci USA 1970; 67: 1248-1255) modificado por Ondrejickova et al. (Cardioscience 1993; 4: 225-230). Las muestras se homogeneizaron en un regulador (2.6 mM NaH_2PO_4 , 50 mM Na_2HPO_4 , 15 mM EDTA, 68 mM NaCl, pH 8.1) en una solución 1:9 (p/v) con UltraTurax TP 18/10 (Janke & Kunkel, Alemania) durante 1 minuto a 0°C . Los sustratos, 8.7 mM de γ -glutamil p-nitroanilida y 44 mM de metionina, se agregaron al 65% de alcohol isopropílico en concentraciones finales de 2.5 mM y 12.6 mM respectivamente. Después de la incubación durante 60 minutos a 37°C , la reacción se detuvo agregando 2.3 ml de metanol frío y los tubos de ensayo se centrifugaron durante 20 minutos a 5000 rpm. La absorbancia del sobrenadante se midió con un espectrofotómetro Specord 40 (Jena, Alemania) en cubetas de 0.5 cm a 406 nm. Las mezclas de reacción en ausencia de sustrato o aceptor se utilizaron como muestras de referencia.

45

Ejemplo 19: Efecto de LMW-CS BIOTEC en el estado inflamatorio inducido por AA mediante la evaluación de los niveles de citoquinas proinflamatorias (1-1, IL-6) y proteína C reactiva (CRP) en el plasma

50 Las muestras de sangre se extrajeron de las ratas al final del experimento y se colocaron en tubos de ensayo que contenían heparina como anticoagulante; el plasma se separó de la parte corpuscular que consiste en células sanguíneas por centrifugación y las citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6) se analizaron con la técnica ELISA utilizando kits comerciales específicos.

La proteína C reactiva se analizó en el plasma de rata con un kit ELISA (Immunology Consultant Laboratories, Inc., ICL). La reacción del anticuerpo secundario conjugado con biotina con anticuerpos de proteína C reactiva anti-rata se evaluó mediante la actividad de la estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP). La reacción de la metilbencidina con HRP unida a complejos inmunes se midió a 450 nm utilizando un lector de microplacas Labsystems Multiskan RC.

5 Los resultados se calcularon utilizando la curva de calibración estándar de acuerdo con las instrucciones del kit ELISA.

Ejemplo 20: Efecto de LMW-CS BIOTEC sobre la actividad fagocítica y sobre la explosión oxidativa de neutrófilos inducido por AA

La población de neutrófilos se extrajo de la sangre de las ratas al final de la evaluación de su actividad fagocítica y explosión oxidativa. La medición de la fagocitosis, a saber, la ingestión de bacterias, se realizó en condiciones controladas utilizando *Staphylococcus aureus* opsonizado marcado con fluoresceína (SPA-FITC) (Invitrogen Molecular Probes, Estados Unidos). Las partes alícuotas de sangre periférica en heparina de litio se incubaron luego con hidroetidina (Invitrogen Molecular Probes, Estados Unidos) (15.75 mg en 5 ml de dimetilformamida, Merck, Alemania) durante 15 minutos a 37°C. Después del tratamiento con SPA-FITC durante 15 minutos a 37°C, la reacción se interrumpió colocando los tubos de ensayo en hielo. La subsiguiente lisis de los eritrocitos se realizó durante 15 minutos con una solución de lisis consistente en cloruro de amonio frío/cloruro de potasio (200 ml de agua desionizada, 1.658 g de NH₄Cl, 0.2 g de KHCO₃ y 7.4 mg de Na₂EDTA, pH 7.2-7.4). El porcentaje promedio de células fagocitarias representa el porcentaje de granulocitos que ingirieron al menos una partícula de SPA-FITC, y el porcentaje promedio de la explosión respiratoria representa el porcentaje de granulocitos marcados con etidio.

10

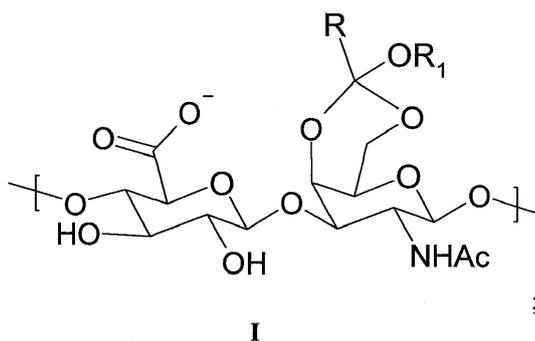
15

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la preparación de sal de sodio de sulfato de condroitina en donde todas las unidades de N-acetil-D-galactosamina en la misma cadena de polisacárido están monosulfatadas ya sea al azar o en la posición 4 o 6, comprendiendo dicho proceso los siguientes pasos:

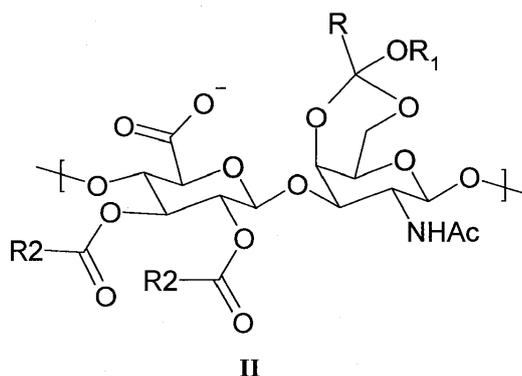
5 a. transformación de la sal de sodio de condroitina en su ácido libre o una de sus sales con un catión de amonio cuaternario seleccionado de tetrametilamonio, tetraetilamonio o tetrabutilamonio, o en la sal de piridinio o el éster metílico;

10 b. reacción del compuesto obtenido en la etapa a) con un ortoéster de fórmula $RC(OR_1)_3$, en donde R se selecciona entre hidrógeno, metilo, etilo o fenilo y R_1 se selecciona entre metilo o etilo, en presencia de catálisis ácida, para dar un compuesto en donde la unidad de disacáridos presente en la condroitina tiene la fórmula I



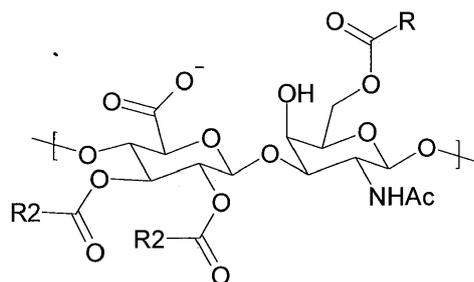
en donde R y R_1 son como se definen más arriba;

15 c. protección de los grupos hidroxilo en las posiciones 2'- y 3'- de las unidades de ácido glucurónico del compuesto obtenido en el paso anterior por reacción con un anhídrido de fórmula $(R_2CO)_2O$ en donde R_2 se selecciona de metilo, etilo o propilo, en presencia de piridina o una base terciaria orgánica seleccionada de trietilamina o triisopropilamina y de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), para dar un compuesto en el cual la unidad de disacáridos repetitiva presente en la condroitina tiene la fórmula II

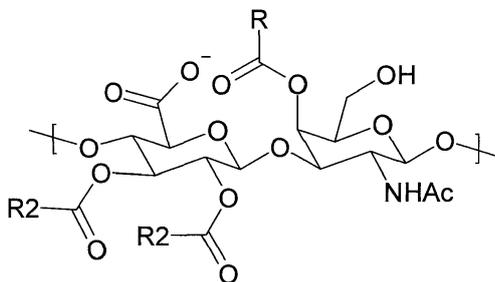


20 en donde R, R_1 y R_2 son como se definen más arriba;

d. reordenamiento de la funcionalidad ortoéster presente en el producto obtenido en la etapa c) con un ácido orgánico soluble en agua para dar un derivado éster en donde las unidades de GalNAc repetidas en el polisacárido consisten en derivados de triacilo que tienen la fórmula IIIa o IIIb



IIIa



IIIb

en donde R y R₂ son como se definen más arriba;

- 5 e. monosulfatación del compuesto obtenido en la etapa d) seguido de la eliminación de los grupos O-acilo presentes en los compuestos IIIa y IIIb obtenidos en la etapa anterior.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la sal de sodio de condroitina de la etapa a) se obtiene a partir del polisacárido capsular K4 producido por un caldo de cultivo de E. Coli cepa O5:K4:H4, o del polisacárido producido por un caldo de cultivo de E. Coli cepa DSM23644.
- 10 3. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa b) se lleva a cabo con un ortoéster seleccionado de ortoacetato de trimetilo, ortoacetato de trietilo, ortoformiato de trimetilo, ortoformiato de trietilo, ortopropionato de trimetilo, ortopropionato de trietilo o ortobenzoato de trimetilo, preferiblemente con ortoacetato de trimetilo o ortoacetato de trietilo. Con ortoacetato de trimetilo.
- 15 4. El proceso de la reivindicación 1, en donde la catálisis ácida de la etapa b) se lleva a cabo con un ácido seleccionado de ácido canforsulfónico, ácido para-toluensulfónico, ácido metanosulfónico o con una resina de sulfona, preferiblemente con ácido canforsulfónico o con una resina sulfónica, más preferiblemente con ácido canforsulfónico.
5. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa c) se efectúa con anhídrido acético.
6. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa d) se efectúa de 20 a 40°C, preferiblemente a temperatura ambiente.
- 20 7. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa d) se efectúa a una temperatura de 40 a 70°C, preferiblemente a 60°C.
8. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa d) se efectúa en una mezcla agua/ácido orgánico soluble en agua o en agua sola.
- 25 9. El proceso de la reivindicación 8, en donde el ácido orgánico se selecciona de ácido acético, fórmico, propiónico, tartárico, cítrico o una resina propiónica, preferiblemente ácido acético o ácido propiónico, más preferiblemente ácido acético.
10. El proceso de la reivindicación 1, en donde la sal sódica de sulfato de condroitina obtenida tiene un peso molecular promedio (Mw) de 10-30 kDa.
- 30 11. El proceso de la reivindicación 10, en donde la sal sódica de sulfato de condroitina tiene una distribución de grupos monosulfato cuya relación varía de 90/10 4S/6S a 10/90 4S/6S.

12. El proceso de la reivindicación 1, en donde la relación entre las unidades sulfatadas de N-acetil-D-galactosamina en la posición 4 y la posición 6 en la sal sódica de sulfato de condroitina obtenida es inferior a 1.

13. El proceso de la reivindicación 1, en donde la relación entre las unidades sulfatadas de N-acetil-D-galactosamina en la posición 4 y la posición 6 en la sal sódica de sulfato de condroitina obtenida es mayor que 1.

5

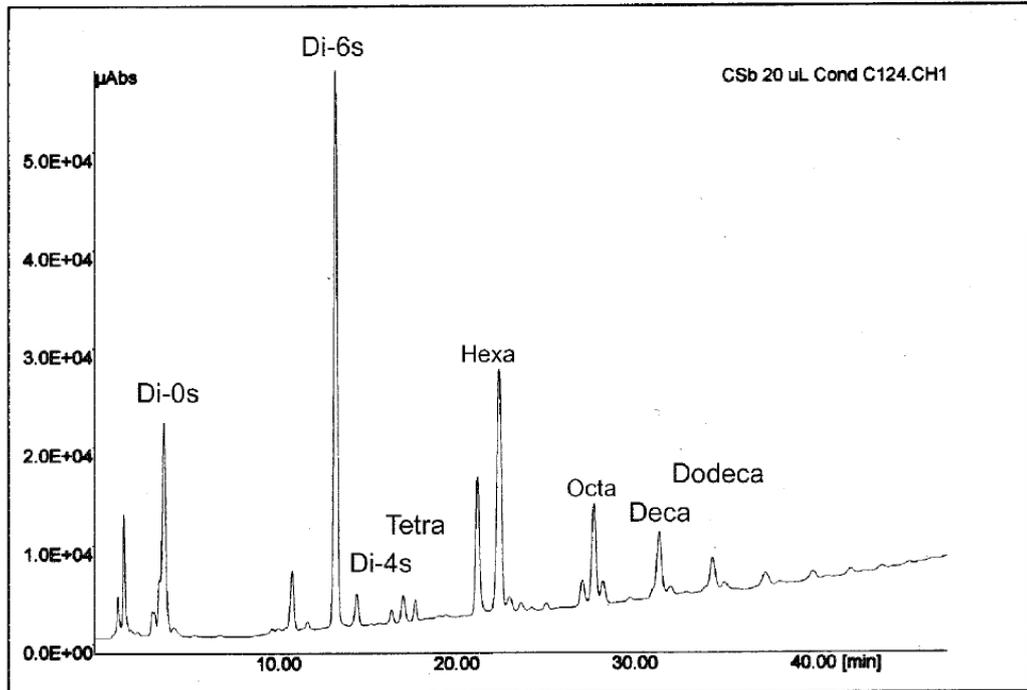


Figura 1

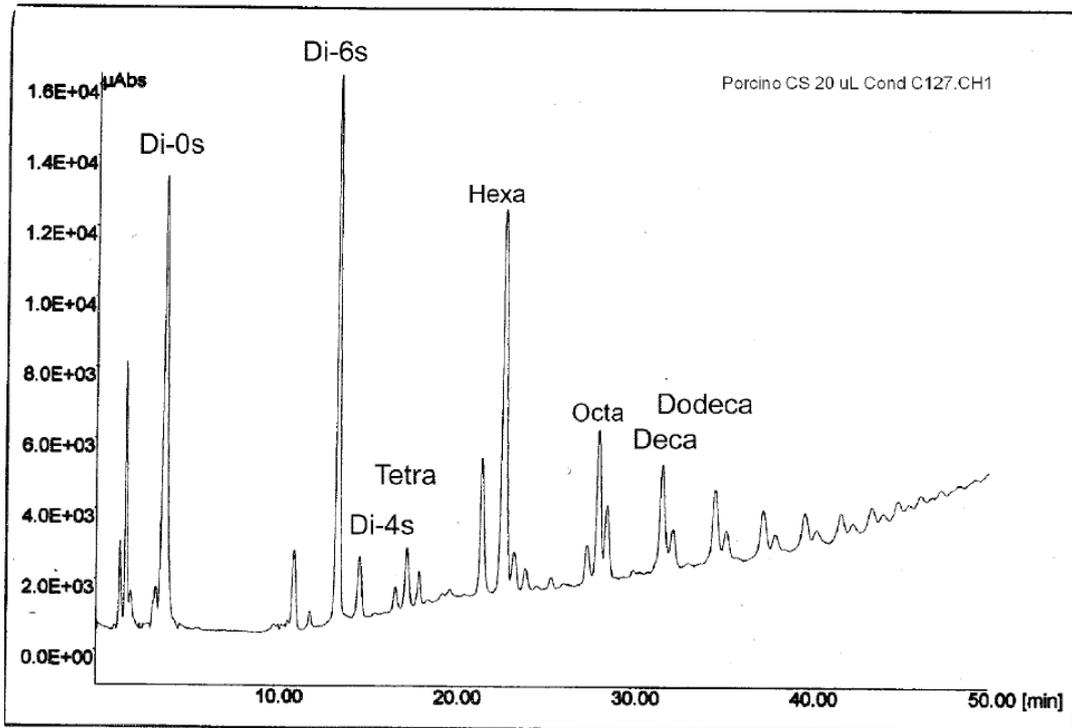


Figura 2

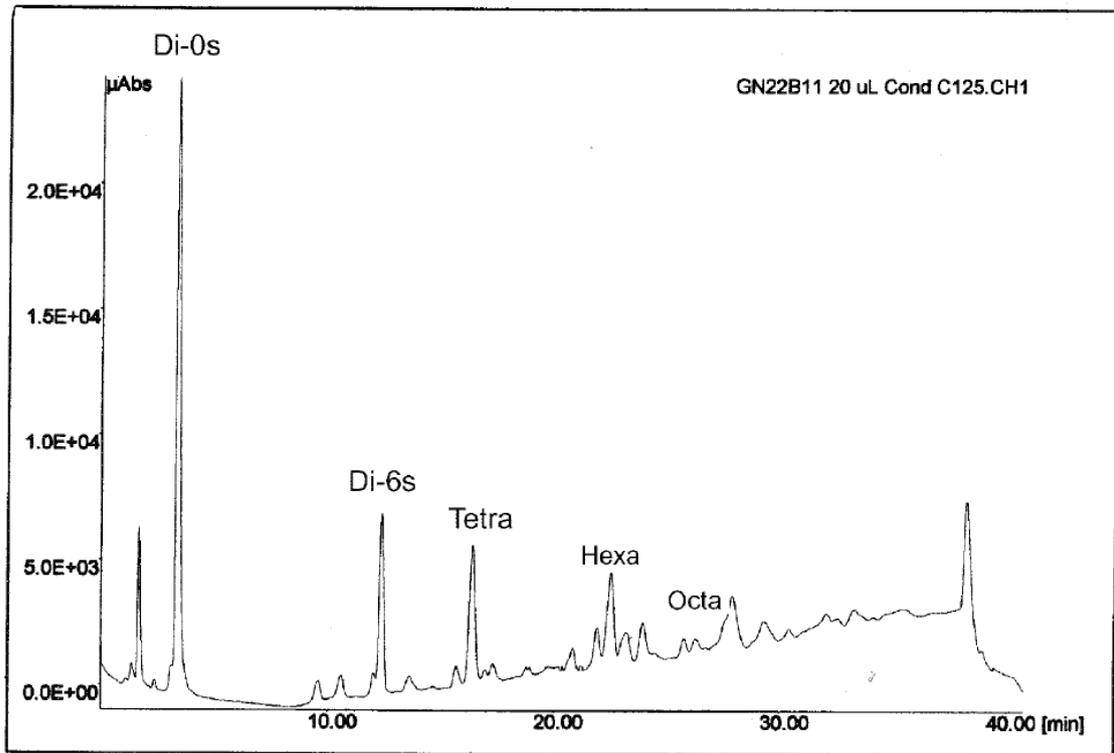


Figura 3