

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 343**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2005** **E 05735125 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 1747007**

54 Título: **Uso de sulfato de condroitina E (SC-E) para el tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con la formación de fibrillas de colágeno**

30 Prioridad:

26.04.2004 SE 0401069

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

26.06.2013

73 Titular/es:

**ANAMAR AB (100.0%)
Kungsportsavenyn 22
411 36 Goteborg, SE**

72 Inventor/es:

**ASPBERG, ANDERS;
HEINEGÅRD, DICK;
JOHNSON, ANNA y
KVIST, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 409 343 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

Uso de sulfato de condroitina E (SC-E) para el tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con la formación de fibrillas de colágeno.

Antecedentes técnicos

- 5 Muchas proteínas de la matriz extracelular (MEC) se modifican postraduccionalmente por la adición de cadenas de oligosacáridos y, por tanto, se conocen como glucoproteínas. Los oligosacáridos están enlazados O-glucosídicamente a residuos de serina o treonina, o bien N-glucosídicamente a un residuo de asparagina. Los proteoglucanos son glucoproteínas que están sustituidos con una clase particular de polímeros de
- 10 MEC, en la superficie celular e intracelularmente en gránulos de almacenamiento. En la MEC, contribuyen a la estructura y organización, y en la superficie celular a menudo funcionan como receptores y/o correceptores. Todos los glucosaminoglucanos (con la excepción de hialuronano) se sintetizan sobre un aceptor de proteínas de núcleo, y, por tanto, son un componente integral de los proteoglucanos (Wight et al., 1981; Heinegård y Paulsson, 1984, revisión).
- 15 Los glucosaminoglucanos (GAG) se nombran para indicar que uno de los monosacáridos en la secuencia de repetición de disacáridos es un aminoazúcar. El otro monosacárido es un ácido urónico (ácido glucurónico o ácido idurónico), con la excepción de sulfato de queratano en el que es una galactosa. Aunque otros sustituyentes oligosacáridos pueden estar ramificados, las cadenas de GAG son lineales (de nuevo, con la excepción de sulfato de queratano). Los proteoglucanos pueden estar sustituidos con una (por ejemplo, decorina) y hasta varios cientos (por ejemplo, agrecano) de cadenas de GAG.
- 20

Existen 4 tipos de glucosaminoglucanos: ácido hialurónico, sulfato de condroitina/ sulfato de dermatano, sulfato de heparano/heparina y sulfato de queratano. Los disacáridos en todas las cadenas de glucosaminoglucano, excepto hialuronano son sulfatos, lo que incrementa su carga negativa y da lugar a una conformación extendida de la cadena. La molécula ocupará dominios de disolvente grandes, observado como

25 una alta viscosidad de una solución. Esta propiedad es esencial en el cartílago y es la base sobre la que radica la resistencia de los tejidos.

La secuencia de disacárido de repetición en SC es ácido glucurónico-N-acetil-galactosamina (GlcA-GalNAc), véase la figura 1. El sulfato de condroitina se encuentra en varias formas, denominado sulfato de condroitina -4, -6 y -D y -E respectivamente. Estas formas difieren en la sulfatación de los sacáridos. El SC-E es una especie altamente sulfatada, que se une a perlecano en los dominios I y V.

30

Figura 1. Estructura básica de sulfato de condroitina. Unidades diméricas de repetición de GlcA β 1-3 GalNAc. Todas las posiciones hidroxilo pueden estar sulfatadas o/y epimerizadas. Las diversas posiciones abiertas para sulfatación están numeradas.

El sulfato de condroitina/sulfato de dermatano se encuentra en todas las matrices extracelulares. El cartílago y el disco intervertebral son los tejidos más ricos en sulfato de condroitina (Wight et al., 1981, revisión). El sulfato de condroitina se sintetiza por enzimas específicas situadas en el aparato de Golgi. Los polímeros están ensamblados sobre un trisacárido de enlace. El grupo hidroxilo de residuos de serina seguido de una glicina en la proteína está sustituido con una xilosa y dos residuos de galactosa sucesivos. Después de esto, se añaden monosacáridos alternantes de ácido glucurónico y N-acetilgalactosamina de forma sucesiva para formar la cadena. Algunos residuos de glucuronato se convierten en iduronato por una epimerasa y la sulfatación es el último acontecimiento justo antes de la secreción (Wight et al., 1981, revisión). En el agrecano del cartílago, un miembro de la familia de hialectinas, es un proteoglucano de sulfato de condroitina y está sustituido con una cadena de un centenar de CS y cadenas de una treintena de sulfato de queratano. Las moléculas de agrecano forman clústeres a lo largo de hebras de AH unidas por medio de su dominio globular N terminal. Una proteína conocida como proteína enlace pone en contacto el dominio G1 de unión a AH de la molécula de agrecano con AH, y estabiliza el complejo. De esta manera, cientos de moléculas de agrecano se unen a un extremo del AH. Por tanto, en la matriz del cartílago, el sulfato de condroitina es, con mucho, el GAG más abundante.

35

40

45

El perlecano se identificó por primera vez como un proteoglucano de sulfato de heparano grande aislado del tumor de membrana basal murino de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). En las membranas basales, se ha demostrado que se unen varias clases diferentes de moléculas. En cada caso, la proteína de núcleo, las cadenas laterales de sulfato de heparano (SH) o ambas en conjunto, están implicadas en la mediación de la interacción. El proteoglucano se une a los componentes de la matriz extracelular integrantes de la membrana basal tales como colágeno IV, nidógeno, laminina, y fibronectina (Timpl, R. y Brown, J. C. (1996) *Bioassays* **18**, 123-132). También se ha demostrado que el perlecano se une a los componentes de la matriz extracelular fuera de la membrana basal, por ejemplo, PRELP y colágeno tipo I (Bengtsson, E., Mörgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegård, D., y Aspberg, A. (2002) *J. Biol. Chem.*). El perlecano soporta la unión celular

50

55

tanto por unión como por formación de clústeres de integrinas (Brown, J. C., Sasaki, T., Gohring, W., Yamada, Y., y Timpl, R (1997) *Eur. J. Biochem.* **250**, 39-46). Se ha demostrado la unión a los factores de crecimiento tanto para las cadenas laterales de SH (FGF-2 (Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., y Yaron, A. (1994) *Cell* **79**, 1005-1013)) como para la proteína de núcleo (progranulina, (Gonzalez, E. M., Mongiat, M., Slater, S. J., Baffa, R., e Iozzo, R V. (2003) *J. Biol. Chem.*)). Basándose en sus interacciones, se asume que el perlecano tiene un papel en la integridad de la membrana basal.

Originalmente se pensó que el perlecano estaba sustituido exclusivamente con SH, pero estudios posteriores revelaron que también está presente en una variante parcialmente sustituida con sulfato de condroitina (SC) (Couchman, J. R., Kapoor, R, Sthanaxn, M., y Wu, R R (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9595-9602). Se han descubierto ambas variantes de perlecano sustituidas con SH y SH/SC en tejidos distintos a la membrana basal, por ejemplo, en el cartílago.

La generación de ratones deficientes en perlecano reveló dos hallazgos particularmente interesantes (Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J. R, y Yamada, Y. (1999) *Nat. Genet.* **23**, 354-358; Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., y Fässler, R (1999) *J. Cell. Biol.* **147**, 1109-1122). En primer lugar, aunque los ratones carentes de perlecano desarrollaron trastornos graves provocados por una integridad o resistencia de la membrana basal comprometida (por ejemplo, rotura del pericardio), el ensamblaje inicial de las membranas basales parecía no tener complicaciones. El segundo hallazgo sorprendente fueron los graves defectos esqueléticos presentados, provocados aparentemente por la ausencia de perlecano en el cartílago.

Después de la publicación de estos resultados, al menos dos enfermedades hereditarias humanas con deficiencias esqueléticas se han atribuido a una subyacente escasez o completa ausencia de perlecano, destacando la relevancia de este hallazgo en el modelo de ratón (Nicole, S., Davoine, C. S., Topaloglu, H., Cattolico, L., Barral, D., Beighton, P., Hamida, C. B., Hammouda, H., Cruaud, C., White, P. S., Samson, D., Urtizberea, J. A., Lehmann-Horn, F., Weissenbach, J., Hentati, F., y Fontaine, B. (2000) *Nat. Genet.* **26**, 480-483; Arikawa-Hirasawa, E., Wilcox, W. R, Le, A. H., Silverman, N., Govindraj, P., Hassell, J. R, y Yamada, Y. (2001) *Nat. Genet.* **27**, 431-434). En el desarrollo esquelético, el depósito de un molde cartilaginoso precede a la formación de los huesos. La integridad de este molde es un prerrequisito para el ensamblaje apropiado del esqueleto. El cartílago de ratones deficientes en perlecano muestra menos fibrillas de colágeno de tipo II y menos organizadas, y una disminución en los niveles de agrecano, lo que indica un fallo al organizar la matriz extracelular (Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R, y Fässler, R (1999) *J. Cell. Biol.* **147**, 1109-1122).

Las fibras de colágeno maduras pueden contener varios tipos diferentes proteínas secundarias unidas. Estas son parte de la organización de estas fibras y regulan enlaces a otras moléculas contribuyendo de este modo a la arquitectura de la red de colágeno fibrilar. Un concepto reciente es el de las moléculas moduladoras, que regulan las etapas tempranas en el ensamblaje de monómeros de colágeno a las fibras. Este laboratorio ha descubierto que la proteína de la matriz oligomérica del cartílago (COMP) acelera la formación de las fibras a partir de monómeros (Mörgelin y Heinegård, manuscrito). Otras moléculas tienen el efecto opuesto y una formación de fibras ralentizada in vitro, por ejemplo, decorina (Vogel, K. G., Paulsson, M., y Hemegard, D. (1984) *Biochem. J.* **223**, 587-597) y fibromodulina (Hedbora, E. y Heinegård, D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6898-6905). La selección genética de estas moléculas da lugar a fibrillas de colágeno anormales y propiedades mecánicas alteradas de los tejidos (Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E., y Iozzo, R. V. (1997) *J. Cell. Biol.* **136**, 729-743; Svensson, L., Aszódi, A, Reinholt, F. P., Fässler, R, Heinegård, D., y Oldberg, A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 9636-9647). Está surgiendo una imagen en la que las proteínas próximas a la célula regulan las etapas tempranas de la formación de fibras de colágeno.

El perlecano existe como formas sustituidas de SH y SC y se ha demostrado que se pueden usar estas formas para facilitar la formación de fibrillas de colágeno. Sorprendentemente, la adición de SC-E libre fue eficaz en la formación de fibrillas de colágeno, pero ninguna de las otras variantes de SC tuvo un efecto significativo (por ejemplo, SC-D o SC-6).

Existen varias publicaciones que describen el efecto de sulfato de condroitina sobre la cicatrización y para el tratamiento de artrosis (documentos US5929050, JP10120577 y RU2216332). La presente invención difiere de estas de forma significativa ya que el uso de SC-E o fragmentos activos del mismo estimula la formación de la matriz extracelular (MEC) a base de colágeno, actuando así como agonistas de fibrologénesis.

Munakata et al. (*Glycobiology* (1999) 9(S):1023-1027) investigan la interacción entre colágenos y glucosaminoglucanos usando un biosensor de resonancia de plasmón superficial.

Descripción de la invención

Está comprendido en la invención el sulfato de condroitina E (SC-E) para su uso en el tratamiento de afecciones y enfermedades relacionadas con la formación de fibrillas de colágeno (FFC), como se define en la reivindicación 1.

- 5 El SC-E está altamente sulfatado y por tanto puede ser un compuesto cargado y la invención también comprende sales aceptables farmacéuticas, tales como sales de metales alcalinos (sodio, potasio, cesio) y sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio, cinc, calcio, estroncio) y amonio, así como sales orgánicas.
- 10 Las indicaciones comprendidas en esta solicitud son afecciones y enfermedades relacionadas con trastornos en la fibrillogénesis de colágeno, incluyendo la cicatrización, en particular cicatrización crónica, artritis reumatoide (AR), formación esquelética reconstructiva y reparación esquelética.

Agonistas de FFC

- 15 La cicatrización crónica se puede estimular por la aplicación de un agonista de FFC, solo o junto con colágeno exógeno. Esto también es útil para el tratamiento de heridas abiertas agudas.
- Los agonistas de FFC también facilita la curación de heridas internas, incluyendo úlceras pépticas.
- Los agonistas de FFC se pueden usar para facilitar la curación después de tratamiento quirúrgico y trasplante.
- Los agonistas de FFC se pueden usar para estimular la reparación en ligamentos y tendones dañados.
- 20 El agonista de FFC se puede usar para facilitar la reparación ósea después de fracturas graves.

Agonistas de FFC en ingeniería de tejidos

- 25 La ingeniería de tejidos se puede usar para reparar tejido dañado (por ejemplo, piel en cicatrización o cartílago en artrosis) por medio de trasplante o tratamiento de reemplazo celular autólogo. Los agonistas de FFC se pueden usar para estimular la formación de matriz de colágeno en la célula o el cultivo de tejido para la producción de piel, tendón, cartílago, hueso o vasos sanguíneos trasplantables a partir de células o tejido del paciente o a partir de varios tipos de células madre.
- Los agonistas de FFC se pueden usar para producir estructuras de matriz de colágeno artificial bien formadas para su uso en la curación de, por ejemplo, heridas por quemadura y cartílago en artrosis. Después del implante, estas estructuras se poblarían por células reclutadas del tejido circundante del paciente.
- 30 Los agonistas de FFC también son útiles en la producción de matrices de fibrillas de colágeno bien organizadas para implantes de córnea.

Trastornos fibróticos

- 35 Las cicatrices son una respuesta natural del cuerpo a un traumatismo y lesión. En afecciones fibróticas, la respuesta a la cicatrización normal continúa fuera de control, con una producción y depósito excesivo de colágeno. Esto da lugar a una pérdida de la función cuando el tejido normal se sustituye con tejido cicatrizado. La fibrosis puede afectar prácticamente a todos los sistemas de órganos en el cuerpo.
- Existen muchas causas diferentes de fibrosis, por ejemplo, traumatismo, cirugía, infección, contaminantes y toxinas ambientales (incluyendo alcohol). Algunos ejemplos de afecciones fibróticas son la formación de tejido cicatrizado después de ataque al corazón, fibrosis renal como una complicación de diabetes, fibrosis pulmonar y formación de tejido cicatrizado quirúrgico entre órganos internos.
- 40 La fibrosis aguda es una respuesta a varias formas de traumatismo, tales como lesión, infecciones, cirugía, quemaduras, daño por radiación y tratamientos quimioterápicos. Muchas afecciones crónicas, por ejemplo, diabetes, infección vírica e hipertensión, inducen una fibrosis progresiva provocando una pérdida continua de la función del tejido. El hígado, el riñón y el pulmón se ven comúnmente afectados. Las enfermedades fibróticas sistémicas incluyen nefropatía diabética, escleroderma, fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis reactiva después de infarto de miocardio.
- 45

Ejemplos

Ensayo de fibrillogénesis in vitro.

5 Se adquirió colágeno de tipo I bovino extraído con pepsina de Vitrogen. El colágeno II se extrajo con pepsina a partir de cartílago traqueal bovino, como se describe previamente (Vogel, K. G., Paulsson, M., y Heinegård, D. (1984) *Biochem. J.* **223**, 587-597). El ensayo de fibrillogénesis se ha descrito previamente (Hedbom, E. y Heinegård, D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6898-6905).

10 En resumen, se llevó a pH neutro una solución de monómeros de colágeno (330 nM) por adición de un volumen apropiado de NaOH 0,012 M, y se tamponó por HEPES 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7,4. Se añadió un fragmento de perlecano a concentraciones equimolares con las de colágeno o a un décimo de la concentración molar de colágeno. Se mezcló enérgica y brevemente la muestra, y se transfirió a una cubeta. Se incubó la muestra a 37 °C (colágeno de tipo I) o a 35 °C (colágeno de tipo II) en cubetas con camisa de agua en el espectrofotómetro, y se monitorizó la absorbancia debida a la dispersión de luz a 400 nm (colágeno de tipo I) o 313 nm (colágeno de tipo II) durante una duración de 5 - 18 h. El incremento en absorbancia/turbidez depende del incremento en la formación de fibras.

15 Fibrillogénesis de SC-E

Se realizó la fibrillogénesis como se describe anteriormente. Se adquirió SC-E de calamar de Calbiochem. 0,13 µg/ml correspondientes a la concentración molar de cadenas de GAG en experimentos previos usando variantes de perlecano de dominio I recombinante con HS/CS (PG IB) (33 nM).

20 Los resultados del experimento de fibrillogénesis se muestran en la figura 2. Como se puede observar a partir de esta figura, el SC-E pero ninguna de las otras variantes de sulfato de condroitina sometidas a prueba (SC-D y SC-6) da un resultado positivo sobre la formación de fibrillas de colágeno (FFC).

25 **Figura 2. Formación de fibrillas de colágeno acelerada con SC-E.** Se sometieron a prueba diferentes tipos de cadenas purificadas de SC para determinar su efecto en el ensayo de fibrillogénesis de colágeno (panel A). El SC-E altamente sulfatado tuvo efectos drásticos sobre la formación de fibrillas pero ni SC-6 ni SC-D tuvieron ningún efecto. El efecto estimulador de SC-E fue dependiente de la dosis, alcanzando la saturación a la concentración de 30 µg/ml (panel B).

Modelo in vivo

Ejemplo de modelo in vivo para el estudio de cicatrización.

30 Se usaron grupos de 5 ratones macho ICR de peso 22±2 g. Bajo anestesia con hexobarbital (90 mg/kg, i.p.), se afeita la región de la espalda y los hombros de cada animal. Se usa un punzón afilado (ID 12 mm) para retirar la piel incluyendo el panículo carnoso y tejidos adheridos. Se cuantifica el área de herida, trazada sobre láminas de plástico transparente los días 3, 5, 7, 9 y 11, por el uso de un analizador de imagen (Life Science Resources VISTA, versión 3.0). Se aplica por vía tópica el compuesto de prueba y/o vehículo (20 µl, carboximetilcelulosa al 0,5 % en PBS pH 7,4) de inmediato después de la lesión y una vez al día después de esto durante un total de 10 días consecutivos. Se determina el tiempo de cierre medio de la herida (TC₅₀) y se aplica una prueba *t* de Student de datos no pareados para la comparación entre el grupo tratado y el vehículo a cada punto temporal de medida. Las diferencias se consideran significación estadística a $P < 0,05$. (Montesinos, M.C., Gadangi, P., Longaker, M., Sung, J., Levine, J., Nilsen, D., Reibman, J., Li, M., Jiang, C.K., Hirschorn, R., Recht, P.A., Ostad, E., Levin, R.I. y Crostein, B.N. Wound healing is accelerated by agonists of Adenosine A₂ (Gα_s-linked) receptors. *J. Exp. Med.* 18S6: 1615-1620, 1997.)

40

Formulación

Ejemplo de una preparación que comprende una cápsula

	Por cápsula
Ingrediente activo, como sal	5 mg
Lactosa	250 mg
Almidón	120 mg
Estearato de magnesio	5 mg

ES 2 409 343 T3

Total hasta	385 mg
-------------	--------

En caso de necesitar mayores cantidades de ingrediente activo, se puede reducir la cantidad de lactosa.

Ejemplo de una formulación de comprimido adecuada.

	Por comprimido
Ingrediente activo, como sal	5 mg
Almidón de patata	90 mg
Sílice coloidal	10 mg
Talco	20 mg
Estearato de magnesio	2 mg
Solución acuosa de gelatina al 5 %	25 mg

Total hasta	385 mg
-------------	--------

- 5 Se puede preparar una solución para administración parenteral por inyección en solución acuosa de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable soluble en agua de la sustancia activa preferentemente de un concentración de un 0,1 % a aproximadamente un 10 % en peso.

Estas soluciones también pueden contener agentes estabilizantes, agentes tamponantes y/o agentes gelificantes tales como pero sin limitación, hialuronano, PEG, HPMC, EHEC, para obtener una liberación o y/o eliminación controlada.

Ejemplo de una formulación tópica

- 10 Se puede preparar un gel para su administración tópica con una sustancia activa en una concentración de un 0,1 % a un 10 % en peso, que contiene opcionalmente agentes estabilizantes, agentes tamponadores y/o agentes gelificantes adicionales tales como pero sin limitación, hialuronano, PEG, HMPC, EHEC para obtener una liberación y/o eliminación controlada.

15

REIVINDICACIONES

1. Sulfato de condroitina E (SC-E) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con la formación de fibrillas de colágeno, en el que la enfermedad o afección relacionada con la formación de fibrillas de colágeno es cicatrización, artritis reumatoide (AR), formación esquelética reconstructiva, reparación esquelética, facilitar la curación después de tratamiento quirúrgico o trasplante, estimular la reparación en ligamentos o tendones dañados, facilitar la reparación ósea después de fracturas graves, o heridas (úlceras).
5
2. Sulfato de condroitina E (SC-E) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la cicatrización es la cura de una herida crónica, una herida abierta aguda o una herida interna tal como una úlcera péptica.
10
3. Uso de sulfato de condroitina E (SC-E) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con la formación de fibrillas de colágeno, en el que la enfermedad o afección relacionada con la formación de fibrillas de colágeno es cicatrización, artritis reumatoide (AR), formación esquelética reconstructiva, reparación esquelética, facilitar la curación después de tratamiento quirúrgico o trasplante, estimular la reparación en ligamentos o tendones dañados, facilitar la reparación ósea después de fracturas graves, o heridas (úlceras).
15
4. Uso como se reivindica en la reivindicación 3, en el que la cicatrización es la cura de una herida crónica, una herida abierta aguda o una herida interna tal como una úlcera péptica.
20

Figura 1.

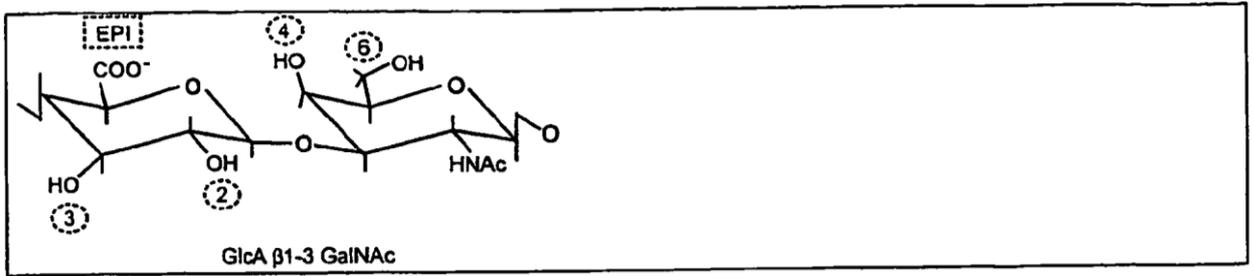


Figura 2. Formación de fibrillas de colágeno acelerada con SC-E

