

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 213**

51 Int. Cl.:

A61K 36/48 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2007 E 07862507 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2101799**

54 Título: **Uso de agentes anabólicos, de agentes anticatabólicos, de agentes antioxidantes y de analgésicos para la protección, el tratamiento y la reparación de tejidos conectivos en seres humanos y en animales**

30 Prioridad:

06.12.2006 US 634383

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

06.05.2015

73 Titular/es:

**NUTRAMAX LABORATORIES, INC. (100.0%)
2208 LAKESIDE BOULEVARD
EDGEWOOD, MD 21040, US**

72 Inventor/es:

**HENDERSON, TODD R. y
FRONDOZA, CARMELITA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 535 213 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 agentes anabólicos, de agentes anticatabólicos, de agentes antioxidantes y de analgésicos para la protección, el tratamiento y la reparación de tejidos conectivos en seres humanos y en animales

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación asociada con el daño en tejidos conectivos en seres humanos y en otros animales.

Antecedentes de la invención

10 Los tejidos de los mamíferos, incluyendo los de los seres humanos, están en un estado de flujo constante entre los procesos anabólicos que crean los tejidos y los procesos catabólicos que degradan los tejidos. El estado de salud existe cuando hay un equilibrio entre estos dos procesos, y las alteraciones en el equilibrio producen enfermedades. Esto es cierto para todos los tejidos del cuerpo. Los tejidos conectivos son de particular importancia por numerosas razones. En primer lugar, soportan las "células funcionales" del cuerpo, es decir, las células epiteliales, musculares y neuronales. En segundo lugar, juegan papeles críticos en la comunicación intercelular, que es esencial para la vida pluricelular.

15 Los procesos inflamatorios ocupan una posición clave en este equilibrio. Cuando se produce una lesión en los tejidos, la inflamación inicia los procesos bioquímicos que dan como resultado la reparación del tejido. Debido a que la inflamación da como resultado los síntomas de dolor, inflamación e hinchamiento de los tejidos implicados, a menudo es contemplada por los pacientes y los médicos como un estado anormal e indeseable, que debería ser tratado y aliviado lo más pronto y lo más completamente posible. Como resultado, las farmacias están llenas de "fármacos antiinflamatorios" (tales como corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tales como el ácido acetilsalicílico). En ciertas circunstancias, la inflamación puede ser de hecho destructiva; sin embargo, es importante recordar que la inflamación está estrechamente relacionada con la curación del tejido. De hecho, la inflamación no se clasifica fácilmente como estrictamente anabólica o catabólica — puede tener ambos efectos. Su fin en el cuerpo es eliminar, diluir o aislar el (los) agente(s) perjudicial(es). También pone en movimiento los procesos bioquímicos que reparan y reconstruyen el tejido dañado. Debido a que es esencial para la curación, y debido a que también provoca la destrucción del tejido, la inflamación y sus mediadores son factores importantes en el equilibrio anabólico y catabólico.

20 Una clase muy importante de mediadores inflamatorios es el grupo de los eicosanoides. Los eicosanoides son sintetizados en el cuerpo a partir de ácidos grasos esenciales ("FAs"). A través de una serie de reacciones bioquímicas, los ácidos grasos precursores son modificados para producir metabolitos intermedios, el ácido araquidónico ("AA"), un ácido graso omega-6; y el ácido eicosapentanoico ("EPA"), un ácido graso omega-3. Los eicosanoides producidos a partir del ácido araquidónico incluyen la serie 2 de las prostaglandinas y la serie 4 de los leucotrienos, que generalmente son proinflamatorios. Los eicosanoides derivados del EPA, tales como la serie 3 de las prostaglandinas, y los del ácido hidroxieicosapentanoico ("HEPE"), son menos inflamatorios que los obtenidos a partir del AA. Además, dichos eicosanoides pueden tener incluso efectos antiinflamatorios.

25 Como clase, los eicosanoides tienen una vida corta y son activos localmente. Son responsables de los eventos iniciales de la inflamación, incluyendo la vasodilatación, el aumento en la permeabilidad vascular y la quimiotaxia. Además, los eicosanoides contribuyen decisivamente en las etapas tempranas del proceso de curación. Por ejemplo, los eicosanoides desencadenan la liberación de citocinas tales como el TGF- β , que a su vez estimula la migración y la proliferación de células del tejido conectivo, y la deposición de matriz extracelular. Algunos eicosanoides constitutivos específicos también tienen efectos protectores en la mucosa gastrointestinal y en el riñón, debido a que mantienen la síntesis de glucosaminoglucanos y la perfusión normal de estos órganos.

30 Debido a procesos anabólicos tales como estos, y debido a la influencia de los agentes anticatabólicos y antioxidantes naturales del cuerpo, el resultado de la mayoría de los casos de inflamación es la resolución de la lesión y la curación de los tejidos dañados. Únicamente en situaciones patológicas es la propia inflamación la que acaba siendo parte de la enfermedad.

35 La investigación sobre el uso terapéutico de FAs precursores de eicosanoides (incluyendo los ácidos cis-linoleico y alfa-linolénico, los denominados ácidos grasos omega-3 y omega-6) se ha dirigido principalmente hacia su uso como inhibidores competitivos de la síntesis de eicosanoides, y por lo tanto, a sus efectos antiinflamatorios. Excepto en los casos de una deficiencia dietética grave o absoluta, se ha proporcionado poca atención a los beneficiosos efectos anabólicos que pueden tener los eicosanoides en los tejidos conectivos. Sin embargo, unas deficiencias "subclínicas" de eicosanoides naturales probablemente contribuirían significativamente a la enfermedad, y están subdiagnosticadas. Por ejemplo, la enzima delta-6-desaturasa es responsable de la etapa comprometida en la síntesis del AA. La actividad de esta enzima (la delta-6-desaturasa) disminuye con la edad. Es probable que esto muestre ser un factor significativo en el aumento de la incidencia de disfunciones del tejido conectivo en segmentos ancianos de la población, dado que una deficiencia en AA disminuiría los procesos anabólicos y permitiría un predominio de los eventos catabólicos.

Dada la importancia de la inflamación en la curación de los tejidos, y el papel protector que juegan algunos eicosanoides, no es sorprendente que los productos farmacéuticos que disminuyen la inflamación mediante el bloqueo de la producción de eicosanoides también tengan efectos negativos sobre la curación y los procesos anabólicos. Desde hace mucho se sabe que los fármacos corticosteroides, que son fuertemente antiinflamatorios, también retrasan la curación y disminuyen la producción de los componentes de la matriz extracelular. Esto es debido a que el cortisol y los compuestos relacionados estabilizan las membranas celulares, y por lo tanto inhiben la liberación de la fosfolipasa A2, el precursor del AA. Recientemente se ha dirigido la atención a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos ("AINEs"). Numerosos estudios han demostrado que los AINEs, como los corticosteroides, pueden disminuir la síntesis de los componentes de la matriz por parte de las células del tejido conectivo, debido a que inhiben la síntesis de endoperoxido de las prostaglandinas, y por lo tanto bloquean la ruta de la ciclooxigenasa.

Dado que el proceso inflamatorio es la condición imprescindible para la curación del tejido, y dado que los eicosanoides son los mediadores del proceso inflamatorio, el uso del AA (y de otros compuestos eicosanoides) es una nueva metodología para el tratamiento de tejidos dañados. Kirkpatrick y col. investigaron el uso de precursores de prostanoides en cartílago embrionario de pollo en cultivos de órganos, y no encontraron efectos significativos. [Kirkpatrick, C. J., "Effects of Prostanoid Precursors and Indomethacin on Chick Embryonic Cartilage Growth in Organ Culture," *Expl. Cell Biol.*, 51: 192 - 200 (1993)]. El modelo experimental de este trabajo puede haber contribuido a la ausencia de efectos significativos, ya que el cartílago de ave y el cartílago embrionario difieren significativamente del cartílago postnatal de mamífero. Por ejemplo, el cartílago embrionario de cualquier especie es hipermetabólico y anabólico para empezar, ya que está en un periodo de crecimiento exponencial. Kent y col. Examinaron los efectos del AA en cartílago de conejo y encontraron un efecto positivo, aunque una investigación previa y posterior no consiguió confirmarlo. [Kent, L. y col., "Differential Response of Articular Chondrocyte Populations to Thromboxane B2 and Analogs of Prostaglandin Cyclic Endoperoxidases," *Prostaglandins*. 19: 391 - 406 (1980)]. Kirkpatrick y Gardner averiguaron que el AA y diversos metabolitos del AA tenían unos efectos insignificantes o inhibidores sobre la biosíntesis. [Kirkpatrick C. J. y Gardner, D. L., "Influence of PGAI on Cartilage Growth," *Experientia*, 33 (4): 504 (1976)]. Sin embargo, Lippiello, y col. averiguaron que el AA y otros ácidos grasos omega-6 tenían unos efectos beneficiosos sobre el metabolismo de los condrocitos en cultivo. [Lippiello, L., Ward, M., "Modification of articular cartilage chondrocyte metabolism by in vitro enrichment with fatty acids (resumen)," *Trans. Orthop. Res. Soc.* 13: 162 (1988); Lippiello, L., "Prostaglandins and articular cartilage; does Prostaglandin perturbation perpetuate cartilage destruction?" *Semin Arthritis Rheum* 11: 87 (1981).] Estos resultados variables no son inesperados, dado que el equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos en el cuerpo es delicado, y se altera con facilidad. Phan y col., sugieren que los productos del AA a través de la ruta de la ciclooxigenasa son antifibrogénicos, mientras que los productos del AA a través de la ruta de la lipooxigenasa son profibrogénicos. Este fenómeno demuestra la complejidad de las interacciones de los eicosanoides.

Los eventos catabólicos están mediados normalmente en el cuerpo por enzimas que descomponen los constituyentes corporales. El catabolismo es esencial para la salud, y una deficiencia en las enzimas necesarias da como resultado una enfermedad, tales como las denominadas enfermedades de almacenamiento como la mucopolisacaridosis. Un catabolismo excesivo también puede dar como resultado la descomposición de los tejidos y dar lugar a una enfermedad, como en las enfermedades degenerativas como la artrosis o las enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple. Diversas sustancias anticatabólicas del cuerpo ayudan a contener y a equilibrar el catabolismo. Por ejemplo, el sulfato de condroitina contrarresta las metaloproteinasas que catabolizan el colágeno y los proteogucanos en la matriz del cartílago. De forma análoga, la anti-tripsina alfa-uno inhibe los efectos de la elastasa, que contribuye a la descomposición alveolar en el enfisema.

El daño oxidativo también tiene un impacto sobre el equilibrio entre anabolismo y catabolismo en el cuerpo. Este daño es el resultado de los efectos de los radicales libres, unas sustancias que tienen un electrón desapareado. Los radicales libres se forman constantemente en el cuerpo como resultado de reacciones normales tales como la producción de ATP. También se forman durante los procesos inflamatorios. Los radicales libres provocan daños celulares debido a que son muy reactivos químicamente. Dado que sólo tienen un electrón (un estado que la naturaleza detesta ya que produce un vacío), estas sustancias "roban" electrones de las moléculas de su vecindad. Las moléculas que forman las estructuras celulares, tales como la membrana celular o el ADN, se vuelven así deficientes en electrones. La deficiencia de electrones hace a su vez que la estructura celular sea inestable y aparezca una disfunción celular, incluyendo la elaboración de proteínas anormales, la ruptura de la célula y la muerte de la célula. El daño oxidativo está implicado en muchos eventos catabólicos del cuerpo, incluyendo el proceso de envejecimiento. Los antioxidantes, tales como la vitamina C, la vitamina E, la dismutasa de superóxido (SOD), el selenio y el glutatión son sustancias que capturan los radicales libres antes de que se produzca el daño oxidativo. En el sentido de que evitan el daño celular, los antioxidantes son un tipo específico de agentes anticatabólicos.

El cuerpo también contiene compuestos anabólicos que estimulan el crecimiento tisular. La glucosamina es un aminoazúcar formado de forma natural en el cuerpo a partir de la glucosa. Cuando se suministra de forma exógena, la glucosamina estimula la síntesis de las células del tejido conectivo, y aumenta por tanto la cantidad de matriz extracelular normal. La glucosamina también es el bloque de construcción de los glucosaminoglucanos en el cartílago y en otros tejidos conectivos. El suministro adicional de glucosamina proporciona por tanto al cuerpo un material de partida adicional para la síntesis de matriz en los tejidos conectivos. Otros ejemplos de compuestos

anabólicos en el cuerpo incluyen la somatotropina, que estimula la síntesis de proteínas, y las somatomedinas o factores de crecimiento insulinoideos, que estimulan la proliferación de los condrocitos y los fibroblastos y mejoran la síntesis de la matriz.

5 Las acciones y las interacciones de estos compuestos son complejas. Un compuesto dado puede tener efectos diferentes en diferentes tejidos. Por ejemplo, la somatotropina aumenta la síntesis proteica (el anabolismo), pero también acelera la descomposición grasa (el catabolismo). Los efectos de un compuesto o de una combinación de compuestos en particular dependerán de muchos factores, incluyendo la vía de administración, la dosis y la duración de la terapia.

10 Investigadores previos han investigado el uso de compuestos individuales por sus efectos anabólicos, antioxidantes o anticatabólicos. Se ha averiguado que la glucosamina en cultivo celular estimula las células del tejido conectivo para que produzcan los componentes de la matriz: el colágeno y los glucosaminoglucanos (GAGs). [Jiménez, S., "The Effects of Glucosamine sulfate on Chondrocyte Gene Expression," Euler Symposium, Madrid, octubre de 1996 Proceedings, páginas 8 - 10]. Se sabe que la S-adenosilmetionina participa en diversas reacciones sintéticas, incluyendo la sulfatación de los GAGs. [Champe, P. Biochemistry, 2.sup.nd edición, J. B. Lippincott Co, Philadelphia, 1994, páginas 248, 250, 265]. Se ha averiguado que el ácido araquidónico estimula la curación de la córnea. [Nakamura, M., "Arachidonic Acid Stimulates Corneal Epithelial Migration", J. Ocul. Pharmacol., Summer: 10 (2): 453 - 9 (1994)]. Por lo tanto, estos compuestos tienen efectos anabólicos.

20 El sulfato de condroitina ha mostrado que inhibe las enzimas degradativas, incluyendo las metaloproteinasas que destruyen la matriz del cartílago. [Bartolucci, C., "Chondroprotective action of chondroitin sulfate," Int. J. Tiss. Reac., XI - II (6): 311 - 317 (1991)]. Los estudios con sulfato de pentosano han demostrado que previene los daños mediados por el complemento en células miocárdicas de conejo. [Kilgore, K., "The Semisynthetic Polysaccharide Pentosan Polysulfate Prevents Complement-Mediated Myocardial Injury in the Rabbit Perfused Heart," J. Pharmacol. Exp. Ther., 285 (3): 987 - 94 (1998)]. La administración oral de colágeno de tipo II ha mostrado que disminuye la respuesta inmunitaria perjudicial que destruye el tejido articular en la artritis reumatoide. Los análogos de la tetraciclina son potentes inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz. [Ryan, M., "Potential of Tetracyclines to Modify Cartilage Breakdown in Osteoarthritis." Curr. Opin. Rheumatol., 8 (3): 238 - 47 (1996)]. La diacereína modifica el proceso inflamatorio mediante la inhibición de la actividad de la interleucina-1, y también a través de efectos directos sobre los linfocitos y los neutrófilos. [Beccerica, E., "Diacetilrheïn and rheïn: in vivo and in vitro effect on lymphocyte membrane fluidity," Pharmacol Res., 22 (3): 277 - 85 (1990); Mian, M., "Experimental Studies on Diacerhein: Effects on the Phagocytosis of Neutrophil Cells from Subcutaneous Carregeenan-Induced Exudate," Drugs Exp. Clin. Res., 13 (11): 695 - 8 (1987); Spencer, C., "Diacerein", Drugs, 53 (1): 98 - 106 (1997)]. Estos compuestos pueden clasificarse como agentes anticatabólicos.

35 La L-ergotioneína captura radicales hidroxilo y puede inhibir la formación de oxígeno singlete, [Han J S. "Effects of Various Chemical Compounds on Spontaneous and Hydrogen Peroxide Induced Reversion in Strain TA104 of Salmonella typhimurium," Mutant Res., 266 (2): 77 - 84 (1992)], mientras que la dismutasa de superóxido captura los radicales superóxido [Mathews C., Biochemistry 2.sup.nd ed., Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park Calif., 1996, página 551]. Estos compuestos pueden clasificarse como antioxidantes.

40 Aunque estos compuestos se han investigado individualmente, según nuestro conocimiento, nadie excepto los presentes inventores han examinado los efectos de ciertas combinaciones de cualquiera o de todos los agentes anabólicos, anticatabólicos y antioxidantes para mantener la salud y promover la curación. De acuerdo con la presente invención, pueden usarse combinaciones de estos agentes para maximizar los efectos anabólicos apropiados (la curación) y para disminuir los efectos catabólicos indeseables (la degradación) y el daño oxidativo, causando al mismo tiempo una reacción adversa mínima o inexistente. Por lo tanto, puede observarse que existe una necesidad de proporcionar composiciones que hagan uso de los efectos beneficiosos de las combinaciones de agentes anabólicos, de agentes anticatabólicos, de agentes antioxidantes y/o de analgésicos para el mantenimiento y la reparación de los tejidos conectivos en seres humanos y en animales.

Sumario de la invención

50 La presente invención proporciona nuevas composiciones y su uso para el tratamiento y/o la prevención de la inflamación asociada con el daño en los tejidos conectivos en seres humanos y en animales mediante el uso de dichas composiciones. Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar nuevas composiciones de cualquiera o de todos los agentes anabólicos, anticatabólicos, antioxidantes y/o analgésicos para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación asociada con el daño en los tejidos conectivos en seres humanos y en animales.

55 Es otro objeto de la presente invención proporcionar el uso de composiciones que contienen cualquiera de, o todos, los agentes anabólicos, anticatabólicos, antioxidantes y/o analgésicos para la preparación de un medicamento para el tratamiento y la reparación del tejido conectivo en seres humanos y en animales.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar composiciones que comprenden cualquiera de, o todos, los agentes anabólicos, anticatabólicos, antioxidantes y/o analgésicos elegidos de entre el grupo que consiste en aminoazúcar, S-adenosilmetionina (SAME), ácido araquidónico (AA), GAG, sulfato de pentosano, colágeno de tipo II,

tetraciclinas, diacarina, dismutasa de superóxido (SOD), L-ergotioneína, uno o más de insaponificables de aguacate / soja (ASUs) y analgésicos, tales como el paracetamol.

5 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar composiciones para el tratamiento y la prevención de la inflamación asociada con el daño en el tejido conectivo en seres humanos y en animales, que contienen uno o más de los elementos elegidos de entre el grupo que consiste en aminoazúcar, SAME, ácido araquidónico, GAG, sulfato de pentosano, colágeno de tipo II, tetraciclinas, diacarina, SOD, L-ergotioneína, uno o más ASUs y analgésicos, por ejemplo, el paracetamol.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar composiciones para modular la inflamación asociada con el daño en el tejido conectivo en seres humanos y en animales.

10 Estos y otros objetos de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones, a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 proporciona una descripción detallada de la ruta biosintética para la creación de GAGs tales como el sulfato de condroitina.

15 La FIG. 2 es la estructura molecular de la SAME y de su precursor de inmediato.

La FIG. 3 proporciona un diagrama simplificado de la función de la SOD.

La FIG. 4 proporciona algunos ejemplos de lípidos insaponificables.

La FIG. 5 es la estructura molecular del paracetamol.

20 La FIG. 6 muestra imágenes de la matriz extracelular (MEC) y de condrocitos sobre microportadores observadas en dos periodos de tiempo diferentes del Ejemplo 7.

La FIG. 7 es una imagen de los condrocitos teñidos para evidenciar el colágeno de tipo II según se observa en el Ejemplo 7.

La FIG. 8 muestra dos diagramas que ilustran la respuesta de la PGE-2 a la activación de la IL-1 β medida según el Ejemplo 7.

25 La FIG. 9 muestra un diagrama que ilustra la modulación de la respuesta de la PGE-2 a los insaponificables de aguacate / soja (ASUs), el sulfato de condroitina y la glucosamina de acuerdo con el Ejemplo 7.

La FIG. 10 muestra un diagrama que ilustra la expresión del TNF- α en células THP-1 de acuerdo con el Ejemplo 8.

La FIG. 11 es un diagrama que ilustra la IL-1 β de acuerdo con el Ejemplo 8.

30 La FIG. 12 es un diagrama que ilustra la expresión de la iNOS en células THP-1 medida según el Ejemplo 8.

La FIG. 13 es un diagrama que ilustra la expresión de la p38 en células THP-1 medida según el Ejemplo 8.

Las FIGS. 14A y 14B ilustran la inhibición de la COX-2 en condrocitos activados, medida según el Ejemplo 9.

La FIG. 15 es un diagrama que ilustra los niveles de PGE-2 secretada medidos según el Ejemplo 9.

35 La FIG. 16 es un diagrama que ilustra la expresión de la interleucina-8 (IL-8) en condrocitos humanos medida según el Ejemplo 11.

La FIG. 17 es un diagrama que ilustra la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) en condrocitos humanos medida según el Ejemplo 11.

Descripción detallada de la invención

40 Las composiciones de la presente invención, usadas para el tratamiento y/o la prevención de la inflamación asociada con el daño en el tejido conectivo, incluyen combinaciones de agentes anabólicos, anticatabólicos y/o antioxidantes. Los ingredientes de las formas de realización preferidas incluyen composiciones elegidas de entre el grupo que consiste en aminoazúcares, SAME, AA, GAGs, incluyendo pentosano, colágeno de tipo II, tetraciclinas, diacarina, SOD, L-ergotioneína, metilsulfanilmetano (MSM), y uno o más ASUs. Opcionalmente, las combinaciones de la presente invención también incluyen uno o más analgésicos, tales como el paracetamol.

45 La glucosamina -- un ejemplo de un aminoazúcar -- se forma de forma natural en el cuerpo a partir de la glucosa. Cuando se suministra de forma exógena, la glucosamina estimula la síntesis de las células del tejido conectivo,

5 aumentando la cantidad de matriz extracelular normal. La glucosamina también es el bloque de construcción de los glucosaminoglucanos ("GAGs") en el cartílago y otros tejidos conectivos, por lo que el suministro adicional de glucosamina proporciona al cuerpo un material de partida adicional para la síntesis de matriz en los tejidos conectivos. El componente de aminoazúcar de las composiciones de la presente invención puede comprender aminoazúcares naturales, sintéticos o semisintéticos, incluyendo sales de glucosamina que incluyen el clorhidrato de glucosamina y el sulfato de glucosamina, el fosfato de glucosamina y la N-acetilglucosamina, y sales y/o mezclas de los mismos. Además, el término aminoazúcar también se usa en este documento para englobar aminoazúcares que pueden haber sido modificados químicamente conservando todavía su función. Dichas modificaciones químicas incluyen esterificación, sulfatación, polisulfatación, acetilación y metilación. Además, se contempla que el término aminoazúcar pueda extenderse a cualquier composición en cuestión que sea insustancialmente diferente del aminoazúcar según se ha descrito anteriormente.

10 El componente de GAG de las composiciones de la presente invención puede comprender GAGs naturales, sintéticos o semisintéticos. Los compuestos similares a los GAG, o precursores de los GAG, incluyen la condroitina, el ácido hialurónico, el ácido glucurónico, el ácido idurónico, el sulfato de queratán, el sulfato de heparán, el sulfato de dermatin y fragmentos, sales y mezclas de los mismos. Además, el término GAG según se usa en este documento, engloba adicionalmente los GAGs que han sido alterados químicamente conservando todavía su función. Dichas modificaciones incluyen esterificación, sulfatación, polisulfatación y metilación. De hecho, los GAGs sulfatados son un componente preferido de las composiciones de la presente invención. Por lo tanto, los GAGs monosulfatados y polisulfatados (o supersulfatados) son los componentes de GAG preferidos de las composiciones de la presente invención. El término GAGs también pretende incluir una nomenclatura alternativa para el mismo grupo de compuestos descritos anteriormente -- por ejemplo, mucopolisacáridos, proteoglucanos y heparanoides. Además, el componente de GAG o de similar al GAG de las composiciones de la presente invención puede derivar de fuentes vegetales o animales, incluyendo de abedul, de formas de cartílago animal incluyendo cartílago de tiburón, de tráquea bovina, de septo de ballena y de hocico porcino, y de invertebrados tales como *Perna canaliculus* y el pepino de mar.

15 El sulfato de condroitina es un GAG preferido. El sulfato de condroitina es el glucosaminoglucano más abundante en el cartílago articular, y también está presente en muchos otros tejidos conectivos del cuerpo. Adicionalmente, el sulfato de condroitina inhibe competitivamente las enzimas degradativas que degradan los tejidos conectivos en los estados de inflamación anormal excesiva. El sulfato de condroitina es un polímero formado por unidades repetitivas de ácido glucurónico y galactosamina sulfatada. [Lester M. Morrison, M. D. y O. Arne Schjeide, Ph. D., *Coronary Heart Disease and the Mucopolysaccharides (Glycosaminoglycans)* 12 (1974); Philip C. Champe y Richard A. Harvey, *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, 148 - 50 (2.sup.nd ed. 1994)]. El experto en la materia comprende que el sulfato de condroitina debe tener al menos dos, y potencialmente muchas, de estas unidades repetitivas de ácido glucurónico y de galactosamina sulfatada.

20 La FIG. 1 proporciona una descripción detallada de la ruta biosintética para la creación de los GAGs, tales como el sulfato de condroitina. Además, la presente invención puede incluir fragmentos de GAGs, tales como fragmentos de sulfato de condroitina. El experto en la materia en el momento de la invención comprende que los "fragmentos de glucosaminoglucanos" son grupos de sacáridos que constituyen menos de dos unidades repetitivas del glucosaminoglucano. Por lo tanto, se entiende que los fragmentos de estas sustancias estarían formados por grupos de sacáridos que constituyen menos de dos de las unidades repetitivas del respectivo polímero.

25 Por ejemplo, el experto en la materia comprende que los fragmentos de sulfato de condroitina son moléculas formadas por los sacáridos que comprenden las unidades repetitivas de sulfato de condroitina, pero que están presentes en grupos de menos de las dos unidades repetitivas descritas anteriormente. Por lo tanto, una molécula formada por un ácido glucurónico y galactosamina sulfatada constituiría un fragmento de sulfato de condroitina. De hecho, existen ocho estructuras de disacáridos diferentes que pueden constituir fragmentos de sulfato de condroitina. [Timothy. E. Hardingham y Amanda J. Fosang, *Proteoglycans: Many Forms and Many Functions*, *FASEB J.*, 6: 861 - 862 (1992)].

30 En la presente invención pueden usarse otros glucosaminoglucanos naturales, por ejemplo, el ácido hialurónico. También pueden utilizarse fragmentos de los glucosaminoglucanos. Una persona experta en la materia entiende que los términos "fragmentos de condroitina," "fragmentos de sulfato de condroitina," "fragmentos de sales de condroitina", "fragmentos de glucosaminoglucano" y "fragmentos de sulfato de condroitina" y adicionales se entiende que significan grupos de sacáridos (o sales de los mismos) que constituyen menos de dos unidades repetitivas del glucosaminoglucano.

35 El experto esperaría que los fragmentos de sulfato de condroitina, por ejemplo, tuvieran la misma utilidad que el propio sulfato de condroitina. El sulfato de condroitina se descompone en unidades más pequeñas dentro del cuerpo, y estas son reformuladas en la producción de cartílago y de otro tejido conectivo. Por lo tanto, se entiende que el cuerpo utiliza los fragmentos de sulfato de condroitina de la misma forma que utiliza el propio sulfato de condroitina. Esto mismo es cierto con respecto a los "fragmentos de condroitina," a los "fragmentos de sales de condroitina" y a los "fragmentos de glucosaminoglucano". Cada uno de la condroitina, las sales de condroitina y otros glucosaminoglucanos, si se ingiere, es descompuesto por el cuerpo y reformulado en la producción de cartílago y de otro tejido conectivo. Por lo tanto, el cuerpo utiliza fragmentos de condroitina de la misma forma que

utiliza la propia condroitina, utiliza fragmentos de sales de condroitina de la misma forma que utiliza las sales de condroitina, y utiliza fragmentos de glucosaminoglucanos de la misma forma que utiliza los glucosaminoglucanos.

Además, se pretende que el término GAG pueda extenderse a cualquier composición en cuestión que sea insustancialmente diferente de los GAGs según se han descrito anteriormente. Un ejemplo de dicho compuesto similar a los GAG que está en el ámbito de la presente invención es el polisulfato de pentosano (PPS), así como las sales del mismo tales como los PPS derivados de calcio y los PPS derivados de sodio. Consecuentemente, un compuesto preferido de tipo GAG que puede usarse en las composiciones de la presente invención es el PPS.

El PPS es un xilano polisulfatado semisintético, que es una forma sulfatada de un compuesto extraído a partir de la hemicelulosa de abedul que consiste en unidades repetitivas de beta-D-xilano-piranosas unidas en (1 - 4). Más específicamente, el PPS se produce mediante la extracción de estos compuestos de hemicelulosa a través de una serie de reacciones químicas a partir de la madera, y añadiendo después numerosos grupos sulfato a las cadenas de polisacáridos purificados. Este proceso da como resultado cadenas de polisacáridos lineales de bajo peso molecular que portan numerosos grupos sulfato cargados negativamente. El PPS es un heparinoide semisintético que se considera una forma supersulfatada de un GAG.

Existen numerosas formas de PPS que muestran las actividades descritas anteriormente. El PPS de sodio y el PPS derivado de calcio (denominado CAPPs) pueden usarse, ambos, para llevar a cabo las funciones del PPS. Cada una de estas formas de PPS muestra una actividad similar a la de los GAG, y en lo sucesivo se denominarán compuestos similares a los GAG.

El mecanismo de acción del pentosano puede resumirse como sigue:

1. Actividades antiinflamatorias a través de la estabilización y la mejora de la microcirculación en los tejidos inflamados y a través de efectos anti-Complemento (disminuye la liberación de los mediadores humorales de la inflamación, denominados cascada del Complemento).
2. Inhibición de la quimiotaxia de los granulocitos, que son glóbulos blancos sanguíneos que contribuyen a la inflamación.
3. Efecto estimulante de la síntesis de proteoglucanos.
4. Efectos estimulantes de la síntesis de ácido hialurónico por parte de los fibroblastos sinoviales.
5. Potente inhibición de las enzimas catabólicas, incluyendo la elastasa de granulocitos humana (inhibición no competitiva), la hialuronidasa (inhibición competitiva), la condroitina-4-sulfatasa y la N-acetil-glucosaminidasa a unas concentraciones mucho menores que las de los AINEs.

En la presente invención pueden usarse otros glucosaminoglucanos o compuestos similares a los glucosaminoglucanos sintéticos o semisintéticos, tales como los glucosaminoglucanos polisulfatados.

La diacereína, un compuesto orgánico recientemente reconocido encontrado en plantas del género *Cassia*, tiene efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la interleucina-1B, consecuentemente se reduce la producción de colagenasa en el cartilago articular. También reduce la actividad fibrinolítica de los fibroblastos sinoviales. También inhibe la quimiotaxia de una forma dependiente de la dosis (atracción de los glóbulos blancos sanguíneos) y la producción del anión superóxido (esta es una de las "especies de oxígeno tóxicas" o "radicales libres"). Estos compuestos perjudiciales aparecen espontáneamente en el cuerpo, especialmente durante la inflamación destructiva. La diacereína tiene actividad analgésica y antipirética. Reduce la descomposición del condroitina-4-sulfato, dando como resultado un aumento en la proporción entre condroitina-4-sulfato y condroitina-6-sulfato. (Esta proporción está patológicamente disminuida en el cartilago en degeneración). Aumenta levemente la síntesis de prostaglandinas, lo que permite que tenga efectos protectores sobre la mucosa gástrica.

La S-adenosilmetionina (SAME) es un importante compuesto endógeno presente en todo el cuerpo, y que forma parte en un gran número de reacciones biológicas tales como las reacciones de transulfatación. En este papel es un reactivo importante en la síntesis de muchos componentes estructurales de los tejidos conectivos, incluyendo las proteínas y los proteoglucanos. Por lo tanto, la SAME tiene unos efectos anabólicos significativos que mejorarían las acciones de otros agentes anabólicos. La SAME también tiene efectos antiinflamatorios en virtud de su acción antioxidante.

La SAME es un compuesto sintetizado en el cuerpo a partir del trifosfato de adenosina ("ATP") y de la metionina (FIG. 2). Está presente en muchos tejidos, incluyendo el sistema nervioso central. La función principal de la SAME en el SNC es donar grupos metilo en las reacciones de síntesis de diversos compuestos cruciales, incluyendo neurotransmisores y fosfolípidos. Por ejemplo, la SAME facilita la conversión de fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina, que forma parte de la capa lipídica interna de la membrana plasmática. Al hacerlo, la SAME aumenta la fluidez de la membrana y mejora la eficacia de la unión receptor / ligando. [Champe y Harvey, *Biochemistry*, 1994; Stramentinoli, G., "Pharmacologic Aspects of S-Adenosylmetionine", *American J. Med.*, 83 (5A): 35 (1987); Baldessarini, F., "Neuropharmacology of S-Adenosyl Metionine," *American J. Med.*, 83 (5A): 95 (1987); Carney, M.,

"Neuropharmacology of S-Adenosyl Metionine," Clin. Neuropharmacol., 2 (3): 235 (1986); Janicak, P., "S-Adenosylmetionine in Depression," Alabama J. Med. Sci. 25 (3): 306 (1988)]. Estas funciones también pueden atribuirse a otros donantes de metilo, tales como la betaina (trimetilglicina), el 5-metiltetrahidrofolato, el ácido fólico y la dimetilglicina. [Champe y Harvey, Biochemistry, 1994].

5 La dismutasa de superóxido es una enzima presente de forma natural en los tejidos de animales y de plantas, que recientemente ha sido investigada como agente en la gestión de la inflamación. Actúa interceptando radicales de oxígeno tóxicos en el espacio intracelular durante los procesos inflamatorios destructivos. No inhibe la biosíntesis de prostaglandinas, pero detiene la sobreproducción de prostaglandinas resultante de la inflamación destructiva. Algunos de sus efectos incluyen la inhibición de la formación de edema y la inhibición de los signos agudos de la inflamación y los cambios particulares secundarios (rigidez y calcificación) en la artritis inducida por coadyuvantes. Sin efectos analgésicos, no contribuye al uso excesivo de las articulaciones afectadas, que finalmente daría lugar a un mayor daño del cartílago articular, como pueden hacer los AINEs. Además no tiene efectos adversos sobre los sistemas cardiovascular, nervioso central ni endocrino. La FIG. 3 proporciona un diagrama simplificado de la función de la SOD.

15 La L-ergotioneína es un antioxidante intracelular presente de forma natural en plantas y en animales, pero que no es sintetizado en el cuerpo humano: procede únicamente de fuentes de la dieta. Las propiedades antioxidantes de la L-ergotioneína parecen estar relacionadas con su capacidad de capturar especies de oxígeno reactivas (radicales libres), de quelatar diversos cationes metálicos, de activar enzimas antioxidantes tales como la peroxidasa de glutatión (SeGPx) y la dismutasa de superóxido de manganeso (Mn SOD), y de inhibir las enzimas generadoras de superóxido tales como la reductasa de NADPH-Citocromo C, y de afectar a la oxidación de diversas hemoproteínas tales como la hemoglobina y la mioglobina. Debido a que todos los tejidos del cuerpo dependen de estas dos moléculas portadoras de oxígeno, esta característica es extremadamente beneficiosa. [Brummel, M. C., "In Search of a Physiological Function for L-ergotioneína," Med. Hypotheses, 18 (4): 351 - 70 (diciembre de 1985); Brummel, M. C., "In Search of a Physiological Function for L-ergothioneine,--II," Med. Hypotheses, 30 (1): 39 - 48 (septiembre de 1989); Han, J. S., "Effects of Various Chemical Compounds on Spontaneous and Hydrogen Peroxide-Induced Reversion in Strain TA104 of Salmonella typhimurium," Mutat. Res., 266 (2): 77 - 84 (abril de 1992); Arduini, A., "Possible Mechanism of Inhibition of Nitrite-Induced Oxidation of Oxyhemoglobin by Ergotioneine and Uric Acid," Arch. Biochem. Biophys., 294 (2): 398 - 402 (mayo de 1992)].

30 El colágeno de tipo II también tiene efectos beneficiosos que ayudan a mantener el equilibrio normal entre anabolismo y catabolismo. Específicamente, las enfermedades del tejido conectivo pueden ser el resultado de procesos autoinmunes, en los que el sistema inmunitario ataca y cataboliza los propios tejidos conectivos del individuo como si fueran un "invasor extraño". La administración oral de colágeno de tipo II puede desensibilizar el sistema inmunitario, previniendo un ataque posterior y normalizando las respuestas inmunitarias en estos individuos. Esto disminuye los procesos catabólicos en los tejidos y maximiza el anabolismo. La ingestión de colágeno de tipo II presenta esta molécula a las células inmunitarias de los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT, a.k.a., placas de Peyer). Las interacciones entre la molécula de colágeno y las células específicas de los GALT activan las células inmunitarias móviles denominadas linfocitos T supresores. Estas células moderan a su vez la reacción inmunitaria destructiva frente al propio colágeno de tipo II del individuo (en los tejidos conectivos).

40 Los compuestos de la familia de las tetraciclinas incluyen la tetraciclina, la doxiciclina, análogos de la tetraciclina y compuestos "similares a las tetraciclinas", y se han usado terapéuticamente por sus efectos antimicrobianos. La investigación actual se centra en los compuestos "similares a las tetraciclinas" que poseen unos efectos antimicrobianos insignificantes pero con efectos anti-catabólicos. Específicamente, los compuestos "similares a las tetraciclinas" son compuestos policíclicos que inhiben las metaloproteinasas tisulares que degradan los componentes de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno y los proteoglucanos teniendo todavía unos efectos antimicrobianos insustanciales. Esta función de estos compuestos, así como de otros compuestos de la familia de las tetraciclinas, puede estar relacionada con la capacidad de estos compuestos de quelatar iones de calcio y de cinc. Por ejemplo, se ha demostrado que la doxiciclina inhibe la actividad de la colagenasa en el cartílago articular.

50 También se han estudiado ciertos extractos lipídicos, denominados no saponificables, de aguacate (género Persea, especialmente P. americana) y de la soja (Glycine max) por sus efectos beneficiosos en los tejidos conectivos. Estos compuestos no saponificables son aquella parte de los lípidos vegetales que no experimentan una saponificación, es decir, no reaccionan con álcalis para formar un jabón. Existen muchos de dichos compuestos, y cualquier extracto de aguacate en particular puede contener cualquier cantidad. Algunos ejemplos incluyen vitaminas liposolubles (A, D, E y K), esteroides tales como fitoestrógenos, esteroides (bioflavonoides) y aceites esenciales volátiles (terpenos tales como mentol, canfor, licopeno, ácido giberélico, limoneno, cinamaldehído, carotenoides y ubiquinona, también conocida como coenzima Q.) [Mathews, C. K. & van Holde, K. E. Biochemistry, 2.sup.nd ed., The Benjamin/Cummings Pub. Co., Inc., 1996, pág. 691.]

60 Los insaponificables de aguacate / soja (ASU) se han usado en Europa con el nombre comercial Piascledine y se han usado para el tratamiento de la artrosis y de otras formas de artritis [Thiers, M. H., "Unsaponifiable constituents of avocado and soya oils. The treatment of certain forms of arthralgia," J. Med. Lyon 53 (222): 195 - 8 (febrero de 1972) (artículo en francés)], así como en afecciones inflamatorias de los tejidos blandos [Trevoux, R., "Unsaponifiable fractions of the avocado and soybean in gynecology," J. Bynecol. Obstet. Biol. Reprod. 6 (1): 99 -

105 (de enero de 1977) (artículo en francés); Lamaud, M. E., y col., "Biochemical modifications of connective tissue induced by the non-saponifiables of avocado and soybean oils administered percutaneously in the 'hairless' rat," *Pathol. Biol.* 26 (5): 269 - 74 (mayo - junio de 1978) (artículo en francés)]. El mecanismo de acción de este compuesto es estimular la expresión por parte de los condrocitos del TGF (el factor de crecimiento transformante) beta 1, del TGF beta 2 y del inhibidor del activador del plasminógeno 1 ("PAI-1"). Al aumentar el PAI-1, los ASU bloquean la cascada que da lugar a la activación de la metaloproteasa [Boumediene K., y col., "Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta 1 and beta 2 in cultured articular chondrocytes," *Arthritis Rheum.* 42 (1): 148 - 56 (enero de 1999)]. Las mezclas de ASU también reducen la producción espontánea de estromelisin, de la IL-6, de la interleucina-8 (IL-8) y de la prostaglandina E2 por parte de los condrocitos. Adicionalmente, los ASUs disminuyen los efectos de la IL-1, y reducen así la producción de colagenasa por parte de los condrocitos y de los sinoviocitos. [Henrotin, Y. E., y col., "Effects of three avocado / soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin E2 production by human articular chondrocytes," *Clin. Rheumatol.* 17 (1): 31 - 9 (1998).]

Los TGF beta 1 y 2 son miembros de una familia de polipeptidocitocinas homólogas. Estas hormonas de acción local pueden tener efectos paracrinos o autocrinos y son elaboradas por diversos tipos celulares, incluyendo los linfocitos, las células endoteliales y los macrófagos. El TGF beta tiene unos efectos diversos sobre diferentes tejidos; generalmente inhibe el metabolismo de las células epiteliales. Sin embargo, en los tejidos conectivos, se ha demostrado que es un mitógeno indirecto de los fibroblastos y de otras células de origen mesenquimático. También puede estimular la producción celular de fibronectina y de colágeno, y disminuir la actividad de proteasa, dando como resultado un aumento neto en la producción de matriz. [Cotran, R. F., Kumar, V. y Robbins, S. L., Eds., *Pathologic Basis of Disease*, 5.ª ed., Saunders, 1994, páginas 40 - 42.]

Las estromelisin son un subtipo de proteínasas que actúan sobre una variedad de componentes de la matriz extracelular, incluyendo los proteoglucanos, la laminina, la fibronectina y el colágeno. Las estromelisin son producidas por los fibroblastos, los sinoviocitos y los macrófagos, entre otros tipos celulares, bajo la influencia de citocinas tales como la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral alfa. Las interleucinas y las prostaglandinas son algunos de los muchos mediadores de la inflamación. Las reducciones en los niveles de todos estos compuestos dan como resultado una disminución del dolor y del hinchamiento, que son característicos de la inflamación.

Las vitaminas liposolubles presentes en las mezclas de ASUs son necesarias para el crecimiento, y aumentan los efectos anabólicos del TGF-beta. Debido a que estimulan el TGF beta y también disminuyen las enzimas degradativas, como se ha explicado anteriormente, puede decirse que las mezclas de ASU tienen efectos tanto anabólicos como anticatabólicos. Aunque algunos de los efectos de los ASUs se superponen con los efectos de otros compuestos de la presente invención, los ASUs aportan propiedades únicas al grupo de compuestos y proporcionan unos efectos muy beneficiosos cuando se usan junto con esos otros compuestos. Por ejemplo, aunque tanto la glucosamina como los ASUs estimulan los procesos anabólicos en las células del tejido conectivo, estos compuestos tienen diferentes mecanismos celulares de acción. La glucosamina actúa en parte a través de la cinasa de proteínas C, mientras que el efecto de los ASUs, como se ha establecido anteriormente, es a través del factor de crecimiento transformante. De forma análoga, la condroitina y los ASUs tienen efectos inhibidores de la IL-1. Sin embargo, los ASUs inhiben la cascada de la plasmina, mientras que la condroitina disminuye la activación de la cascada del complemento. La artrosis es una enfermedad compleja que implica la interacción de muchas citocinas a nivel celular. Debido a que los diferentes compuestos de la presente invención actúan sobre diferentes citocinas, tendrán efectos sinérgicos cuando se usen en las combinaciones apropiadas.

En ensayos con enmascaramiento doble controlados por placebo, los ASUs han demostrado ser eficaces en la reducción de los síntomas de la artrosis [Maheu, E., y col., "Symptomatic efficacy of avocado / soybean unsaponifiables in the treatment of osteoarthritis," *Arthritis Rheum.* 41 (1): 81 - 91 (enero de 1998); Blotman, F., y col., "Efficacy and safety of avocado / soybean unsaponifiables in the treatment of symptomatic osteoarthritis," *Rev. Rheum. Engl. Ed.* 64 (12): 825 - 34 (diciembre de 1997)]. En estos estudios, los efectos secundarios de los grupos tratados eran similares a los observados en los grupos con placebo, lo que indica que los ASUs son sustancias seguras y bien toleradas. Los ASUs según se usan en la presente invención pueden incluir cualquiera o todos los lípidos insaponificables y/o combinaciones de los mismos.

Algunos ejemplos de componentes de los ASUs incluyen limoneno, beta caroteno, filoquinona y ácido giberélico. Como se ha explicado anteriormente, los ASUs pueden incluir cualquiera de diversas clases de compuestos, incluyendo vitaminas liposolubles, esteroides, esteroides y aceites esenciales volátiles, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, los insaponificables de aguacate / soja (ASU) pueden incluir uno o más fitosteroides, tales como campesterol, estigmasterol, dihidrobrasisterol y Beta-sitosterol.

La invención incluye, además, composiciones que contienen un extracto de aguacate / soja o mezclas o combinaciones de dichos extractos (más de un ASU).

Varias formulaciones de la presente invención pueden incluir uno o más insaponificables de aguacate / soja en diversas formas o cantidades. Por ejemplo, en algunas formas de realización, pueden incluirse en una composición uno o más insaponificables de aguacate / soja, de forma que estén estandarizados aproximadamente a un 30 % de esteroles. En algunas formas de realización, los insaponificables de aguacate / soja pueden incluirse en una

composición en una proporción de aproximadamente 2-1 entre los insaponificables de soja y los insaponificables de aguacate. En algunas formas de realización, uno o más insaponificables de aguacate / soja puede ser sólidos a la temperatura ambiente y líquidos a la temperatura corporal humana. En algunas formas de realización, uno o más insaponificables de aguacate / soja pueden estar combinados con uno o más excipientes o portadores para crear un polvo.

Los compuestos de la presente invención tienen diversas ventajas sobre las terapias existentes para los trastornos del tejido conectivo, tales como unos perfiles de seguridad excelentes. Esto está relacionado en parte con el hecho de que estos compuestos aparecen normalmente en el cuerpo y están presentes en diversos alimentos. Otra característica compartida por los compuestos es la tendencia a un inicio de acción lento. Algunos medicamentos, tales como los AINEs, tienden a causar cambios súbitos en los síntomas de la enfermedad. Los compuestos endógenos de la presente invención trabajan más lentamente, normalizando las estructuras y las funciones del cuerpo. Aunque esta acción es beneficiosa, significa que los síntomas normalmente no serán aliviados de forma inmediata. Por esta razón se incluye un analgésico como componente opcional en las composiciones de la presente invención. El analgésico debe ser elegido de entre el grupo de compuestos analgésicos que han demostrado tener unos efectos secundarios mínimos a las dosis terapéuticas, y que también tengan un efecto negativo mínimo sobre la síntesis de tejido conectivo, como los fármacos corticosteroides y muchos AINEs han demostrado tener. El analgésico que puede incluirse en la composición de la presente invención es por tanto un analgésico no esteroideo que no tiene efectos antiinflamatorios. En otras palabras, el analgésico es un fármaco no esteroideo que no es un AINE. Algunos ejemplos de los analgésicos de la presente invención incluyen paracetamol y tramadol. Excepto como se analiza a continuación, el analgésico preferido de la presente invención es el paracetamol.

El paracetamol es un analgésico derivado de la anilina y un compuesto antipirético que trabaja de forma central a través de la inhibición reversible de la enzima ciclooxigenasa en el sistema nervioso central. El paracetamol también bloquea la generación de impulsos de dolor periférico en las terminaciones nerviosas de todo el cuerpo. Se ha usado ampliamente para el alivio sintomático del dolor. El alivio del dolor es beneficioso por más de una razón humana obvia. Dado que también son importantes las conexiones entre los centros emocionales del dolor y el sistema inmunitario, el alivio del dolor, y la resultante elevación del estado de ánimo, tiene efectos beneficiosos sobre la inflamación y los otros muchos procesos que están modulados por el sistema inmunitario. Aunque bloquea la actividad de la ciclooxigenasa, el paracetamol tiene muy poca actividad antiinflamatoria. Por lo tanto, el paracetamol no inhibe el anabolismo del tejido conectivo, como hacen los AINEs y los corticosteroides, y como tiene unos efectos secundarios mínimos a las dosis terapéuticas, es un analgésico ideal en la presente invención. Otra ventaja de incluir un analgésico seguro en la presente invención es que aumentará la probabilidad de que el paciente siga el tratamiento, es decir, los pacientes continuarán tomando las preparaciones el tiempo suficiente para que se produzcan los efectos modificadores de la enfermedad. Los estudios con agentes condroprotectores aislados tienen a menudo un elevado índice de abandono en las primeras semanas de la terapia debido a la percepción del paciente de que el agente no funciona. Con la adición de un analgésico, los pacientes serán más proclives a continuar la terapia.

Los gatos son sensibles al paracetamol debido a que no lo metabolizan de una forma eficaz (se produce una baja conjugación hepática con el ácido glucurónico y el subsiguiente agotamiento del glutatión) [Goodman, A. y Goodman, L., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed., MacMillan Publishing Co., 1985, págs. 692 - 95; Ahrens, F., *Pharmacology*, Williams & Wilkins, 1996, páginas 174 - 75]. Consecuentemente, no se recomienda el uso del paracetamol en gatos.

El metilsulfonilmetano (MSM, o dimetilsulfona) es un compuesto orgánico azufrado perteneciente a una clase de compuestos químicos conocidos como sulfonas. Se produce de forma natural en algunas plantas primitivas y está presente en pequeñas cantidades en muchas comidas y bebidas. Los investigadores han sugerido que el MSM tiene efectos antiinflamatorios.

La presente invención comprende nuevas combinaciones de agentes anabólicos, de agentes anticatabólicos y de agentes antioxidantes que maximizan los efectos anabolizantes beneficiosos (la curación) y minimizan cualquier potencial efecto negativo. Al hacerlo, la presente invención proporciona nuevas combinaciones de estos agentes y de agentes antioxidantes, para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación asociada con el daño en los tejidos conectivos en seres humanos y en animales.

Estos compuestos tienen diversos efectos beneficiosos en los tejidos conectivos animales y humanos, y debido a que funcionan a través de diversos mecanismos, trabajan bien conjuntamente. Aunque cada compuesto tiene varias funciones, pueden agruparse a grandes rasgos como: (1) agentes anabólicos, incluyendo la glucosamina, la SAME, el AA y los ASUs, que promueven los procesos de crecimiento en el cuerpo; (2) agentes anticatabólicos, tales como el sulfato de condroitina, el sulfato de pentosano, el colágeno de tipo II, las tetraciclinas, la diacarina y los ASUs, que inhiben los procesos destructivos o catabólicos; y (3) antioxidantes, tales como la SOD y la L-ergotioneína, que previenen el daño tisular capturando especies de oxígeno tóxicas (radicales libres). Naturalmente, algunos compuestos, tales como los ASUs, podrían ubicarse en más de un grupo en virtud de sus funciones solapadas. La presente invención establece que las combinaciones de estos compuestos podrían funcionar bien. Además, opcionalmente podría añadirse un analgésico a cualquiera de los compuestos individuales mencionados anteriormente, o a una combinación de los mismos, para proporcionar un alivio del dolor. El paracetamol es el

analgésico de elección debido a que no tiene unos potentes efectos antiinflamatorios y por lo tanto no interfiere en la curación del tejido conectivo. También tiene unos efectos secundarios mínimos a las dosis terapéuticas, al contrario que los AINEs que pueden provocar úlceras gastrointestinales o una mala perfusión renal incluso a las dosis terapéuticas. Por lo tanto, la presente invención consiste en varias combinaciones de dos o más de los siguientes agentes: AA, glucosamina, sulfato de condroitina, pentosano, diacerina, S-adenosilmetionina, dismutasa de superóxido, L-ergotioneína, colágeno de tipo II, compuestos similares a las tetraciclinas, uno o más ASUs y opcionalmente, uno o más analgésicos, por ejemplo, paracetamol. Algunos ejemplos incluyen combinaciones tales como: dos agentes anabólicos (por ejemplo, AA y glucosamina); un agente anabólico y un agente anticatabólico (por ejemplo, AA y pentosano); un anticatabólico y un antioxidante (por ejemplo, tetraciclina y dismutasa de superóxido); o combinaciones de más de dos agentes (por ejemplo, glucosamina, SAME y AA) o SAME, ASUs, paracetamol y diacerina. Algunos ejemplos de compuestos específicos que pueden estar presentes en los extractos de ASU incluyen limoneno, beta caroteno, ubiquinona y fosfato de undecaprenol.

La siguiente tabla muestra las posibles combinaciones de pares de los compuestos analizados anteriormente. La letra "X" marca las nuevas combinaciones de compuestos que forman las nuevas composiciones de la presente invención. La invención también incluye combinaciones de tres o más agentes de los siguientes compuestos en las combinaciones mostradas en la tabla:

- Glucosamina
- Condroitina
- SAMe
- Pentosano
- Dismutasa de superóxido (SOD)
- L-ergotioneína
- Colágeno de tipo II
- Diacerina
- Ácido araquidónico
- Compuestos similares a las tetraciclinas
- Uno o más insaponificables de aguacate / soja.
- Analgésicos, por ejemplo, paracetamol
- Metilsulfanilmetano (MSM)

Como se ha explicado anteriormente, algunos ejemplos de combinaciones deseadas están marcados con una X. Por ejemplo, la primera X de la primera fila significa una combinación de glucosamina y L-ergotioneína o de glucosamina y diacerina. Las composiciones de la presente invención comprenden adicionalmente cualquier agregación o adición de las combinaciones marcadas con una X en cualquier fila o columna dada. Por ejemplo, las composiciones divulgadas en la primera fila incluyen combinaciones de glucosamina más L-ergotioneína más diacerina, o de glucosamina más diacerina más compuestos similares a las tetraciclinas, o de glucosamina más L-ergotioneína más diacerina más AA más compuestos similares a las tetraciclinas, y así sucesivamente. Algunos ejemplos de las composiciones divulgadas en la columna designada como "colágeno de tipo II" incluyen combinaciones de colágeno de tipo II más SAME más pentosano, o colágeno de tipo II más SAME más pentosano más dismutasa de superóxido más L-ergotioneína, y así sucesivamente. Algunos ejemplos de las composiciones divulgadas en la columna designada como "ASU" incluirían combinaciones de uno o más ASUs más glucosamina, o uno o más ASUs más SAME más pentosano, o uno o más ASUs más colágeno de tipo II más SAME más pentosano más dismutasa de superóxido más L-ergotioneína, y así sucesivamente. De forma análoga, la tabla muestra que puede combinarse un analgésico, por ejemplo, el paracetamol, con cualquier otro compuesto indicado en la tabla tanto individualmente como en cualquier combinación.

	Dismutasa de superóxido (SOD)	L-Ergotioneína	Colágeno de tipo II	Disceria	Ácido araquidónico	Compuestos similares a las tetraciclinas	ASU	Analgésico, por ejemplo, paracetamol
Glucosamina		X		X	X	X	X	X
Condroitina		X		X	X	X	X	X
SAMe	X	X	X	X	X	X	X	X
Pentosano	X	X	X	X	X	X	X	X
Dismutasa de superóxido (SOD)		X	X	X	X	X	X	X
L-ergotioneína			X	X	X	X	X	X
Colágeno de tipo II				X	X	X	X	X
Disceria					X	X	X	X
Ácido araquidónico						X	X	X
Compuestos similares a las tetraciclinas							X	X
ASU								X

Se han investigado algunas combinaciones de los agentes anteriores y se ha documentado una nueva respuesta con varias combinaciones. Se estudiaron los efectos de ciertas combinaciones de sulfato de condroitina, glucosamina, SAME, ácido araquidónico, colágeno, pentosano y dismutasa de superóxido en cultivos de células de cartílago bovino adulto en diferentes experimentos (véase el ejemplo 2). Ciertas combinaciones tenían un efecto
 5 inhibidor (hipometabólico) en este estudio en particular. Las dos nuevas interacciones estimuladoras e inhibitoras podían ser beneficiosas en varios estados patológicos. Por ejemplo, un estado hipermetabólico es parte de la patogenia de algunas enfermedades. En dichas enfermedades, sería beneficiosa para el individuo una respuesta
 10 inhibitora (hipometabólica). Se están planificando estudios futuros para investigar los efectos de un intervalo de concentraciones de los agentes estudiados en varios modelos experimentales. Nótese que tanto los aumentos como
 15 las disminuciones en la actividad biosintética son nuevas interacciones y podrían ser beneficiosas para los organismos en unas circunstancias seleccionadas. Por ejemplo, muchos investigadores creen actualmente que la artrosis tiene un componente hipermetabólico, especialmente en las etapas tempranas de la patogenia. Los investigadores están divididos entre si el tratamiento debería centrarse en agentes que estimulen la producción de matriz de cartílago o en agentes que sean inhibidores y que por lo tanto hagan que el entorno del cartílago sea más hipometabólico, lo que a su vez podría tener un efecto estabilizador sobre el tejido del cartílago.

Las composiciones de la presente invención puede ser administradas por cualquier vía, incluyendo intramuscular, intravenosa, oral, subcutánea, rectal, tópica, transcutánea, intranasal e intraarticular, sublingual, intraperitoneal.

También puede usarse cualquier sal de cualquiera de los presentes compuestos para ayudar en la absorción, por ejemplo, glucosamina HCl, sulfato de glucosamina, fosfato de glucosamina, sulfato sódico de condroitina, sulfato
 20 cálcico de condroitina, sulfato potásico de condroitina, etc. Además, las composiciones de la presente invención pueden ser administradas en todas las formas de dosificación habituales, incluyendo formas de liberación prolongada, píldoras, comprimidos (tales como comprimidos masticables), cápsulas (tales como cápsulas de gelatina dura, cápsulas rellenas de líquido, cápsulas de softgel, etc.), cremas, pastas, polvos (tales como
 25 cucharadas de polvo), líquidos, aerosoles, formas de liberación prolongada, inyectables, etc. Las composiciones de la presente invención también pueden administrarse en formas de dosificación tales como sobrecillos y golosinas.

Los intervalos de dosificación de las composiciones de la presente invención variarán dependiendo de las necesidades del ser humano o del animal al que se administran las composiciones. La frecuencia de dosificación también puede variar dependiendo de las necesidades del ser humano o del animal al que se administran las composiciones.

Por ejemplo, puede administrarse una combinación de ASU, sulfato de condroitina (CS) y glucosamina (Gluc) a un
 30 animal tal como un perro o un caballo. La composición puede ser administrada al animal diariamente (o cada dos días) a una dosis específica (o a una dosis variable) durante un periodo inicial, tal como de 2 - 4 semanas o de 4 - 6 semanas. Los regímenes de dosificación individuales pueden variar dependiendo del sujeto objetivo. El régimen de dosificación durante el periodo inicial puede diseñarse de tal forma que los componentes activos alcancen un estado
 35 estacionario en los líquidos corporales que bañan el tejido inflamado del animal. Por ejemplo, durante el periodo inicial pueden administrarse las dosis diarias de la composición en forma pulverulenta a caballos en las siguientes cantidades: en caballos con un peso menor de 272,16 kilogramos puede administrarse una cucharada, en caballos entre 272,16 y 544,31 kilogramos pueden administrarse dos cucharadas, y en caballos con más de 544,31 kilogramos pueden administrarse 3 cucharadas. Puede pasar parte o todo el periodo inicial antes de que se observe una respuesta a la composición en el animal. Por esta razón, algunas formulaciones pueden considerarse como de una acción relativamente lenta. Algunos sujetos pueden responder antes durante el periodo de administración inicial. Una vez que se ha observado respuesta clínica, puede reducirse la cantidad y la frecuencia de las dosis hasta un nivel que pretende mantener el bienestar del sujeto. Por ejemplo, una administración a largo plazo para caballos puede ser de 1/2 cucharada, de 1 cucharada y de 1 - 2 cucharadas diarias para caballos que pesen hasta 272,16
 40 kilogramos, 272,16 - 544,31 kilogramos, y más de 544,31 kilogramos, respectivamente. Antes y durante un ejercicio extenuante o de un episodio que pueda afectar a la inflamación del tejido conectivo del animal, puede aumentarse la dosis en cantidad y/o en frecuencia, por ejemplo, hasta el nivel de administración inicial, para un apoyo adicional. También, si el nivel de bienestar del animal parece disminuir, puede aumentarse la dosis y la frecuencia, por ejemplo, hasta los niveles de administración iniciales, durante un periodo adicional, tal como de 2 - 4 semanas, antes de reducir de nuevo el nivel y la frecuencia. Una vez que se ha observado una mejora coherente a un nivel de dosis en particular, la administración puede reducirse adicionalmente en frecuencia y/o en cantidad, por ejemplo, hasta la mitad de la dosis y la mitad de la frecuencia. La dosis y la frecuencia en un sujeto pueden aumentarse en cualquier momento según sea necesario, por ejemplo, durante los fines de semana o en otros momentos en los que el sujeto sea más activo, con objeto de proporcionar un apoyo adicional a los tejidos conectivos cuando sea necesario.

La combinación de ASU, CS y Glu también puede usarse para los tratamientos a largo plazo en sujetos normales para ayudar a prevenir y/o para modular un episodio inflamatorio.

Los intervalos de dosificación de los diversos componentes de las composiciones actualmente reivindicadas son como sigue:

ES 2 535 213 T3

Compuesto	Dosis diaria
Glucosamina	Intervalo de dosificación total: entre 25 mg y 15 g O: 3 - 125 mg/kg para animales pequeños o grandes o seres humanos Animal pequeño: 25 mg - 3 g; o 3 - 125 mg/kg Ser humano: 100 mg - 4 g; o 3 - 125 mg/kg Animal grande: 300 mg - 15 g; o 3 - 125 mg/kg
Sulfato de condroitina	Intervalo de dosificación total: entre 15 mg - 12 g O: 1 - 75 mg/kg para animales pequeños o grandes o seres humanos Animal pequeño: 15 mg - 2 g; o 1 - 75 mg/kg Ser humano: 75 mg - 4 g; o 1 - 75 mg/kg Animal grande: 300 mg - 12 g; o 1 - 75 mg/kg
SAmE	Intervalo de dosificación total: entre 10 mg - 8 g Animal pequeño: 10 mg - 1 g Ser humano: 75 mg - 3 g Animal grande: 400 mg - 8 g
Pentosano	Intervalo de dosificación total: entre 3 mg y 3 g Animal pequeño: 3 mg - 1 g Ser humano: 50 mg - 2 g Animal grande: 100 mg - 3 g
Dismutasa de superóxido	Intervalo de dosificación total: entre 3 mg y 6 g (cada mg contiene > 3000 Unidades de McCord - Fridovich) Animal pequeño: 3 mg - 2 g Ser humano: 5 mg - 3 g Animal grande: 50 mg - 6 g
L-Ergotioneína	Intervalo de dosificación total: entre 50 mg y 25 g Animal pequeño: 50 mg - 10 g Ser humano: 50 mg - 15 g Animal grande: 100 mg - 25 g
Colágeno de tipo II	Intervalo de dosificación total: entre 0,1 mg y 10 g Animal pequeño: 0,1 mg - 10 g Ser humano: 0,1 mg - 7,5 g Animal grande: 1,0 mg - 10 g

(continuación)

Compuesto	Dosis diaria
Diacerina	Intervalo de dosificación total: entre 5 mg y 5 g Animal pequeño: 5 mg - 1 g Ser humano: 20 mg - 3 g Animal grande: 50 mg - 5 g
Ácido araquidónico	Intervalo de dosificación total: entre 10 mg y 12 g Animal pequeño: 10 mg - 3 g Ser humano: 10 mg - 5 g Animal grande: 50 mg - 12 g
Tetraciclinas	Intervalo de dosificación total: entre 1,0 mg y 2 g Animal pequeño: 1,0 mg - 1 g Ser humano: 2 mg - 1,5 g Animal grande: 50 mg - 2 g
Insaponificables de aguacate / soja	Intervalo de dosificación total: entre 5 mg y 5 gramos O: 0,5 - 25 mg/kg para animales pequeños o grandes o seres humanos Animal pequeño: 5 mg y 1000 mg; 0,5 - 25 mg/kg Ser humano: 25 mg y 1500 mg; o 0,5 - 25 mg/kg Animal grande: 100 mg y 5 gramos; o 0,5 - 25 mg/kg
Analgésico, por ejemplo, paracetamol	Intervalo de dosificación total: entre 4 mg y 10 gramos Animal pequeño: (excluyendo gatos): 4 mg y 1000 mg Ser humano: 100 mg y 4 gramos Animal grande: 100 mg y 10 gramos

5 Las dosis están diseñadas para cubrir el espectro de pesos corporales desde los animales pequeños hasta los animales grandes, estando los seres humanos en el punto medio. Pueden administrarse unas dosis iguales o similares a animales pequeños, a animales grandes y a seres humanos de forma periódica, por ejemplo, diariamente o cada dos días.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención. En particular, se usaron los intervalos de concentración fisiológicos determinados a través de los mejores datos disponibles para los inventores.

Ejemplo 1

10 En nuestras investigaciones preliminares se indujo una inestabilidad quirúrgica en la articulación de la babilla de conejos blancos de Nueva Zelanda mediante una modificación de la técnica de Hulth. Después de la operación los animales hicieron ejercicio diario durante 1 hora. Se evaluaron las fórmulas dietéticas experimentales para comprobar su efecto estabilizante del cartílago. Se investigó el alimento para conejo habitual (Teklad) (control); un
15 alimento habitual que también contiene un 2 % de aceite fúngico que contiene un 40 % en peso de AA (Arasco); y una dieta habitual que también contiene ácido araquidónico y glucosamina / condroitina. A las 16 semanas se extirparon los cóndilos femorales mediales de todos los conejos y se evaluó cuantitativamente la degeneración del cartílago con un sistema de clasificación histológica-histoquímica-1 de Mankin modificado con portaobjetos teñidos con safranina-O. Los cartílagos de todas las articulaciones con inestabilidad quirúrgica mostraron diversos grados de lesiones degenerativas macroscópicas. Nuestros resultados preliminares indicaban que la adición de ácido
20 araquidónico a glucosamina / sulfato de condroitina tiene el potencial de producir una nueva interacción en el cartílago. Esta nueva interacción tiene el potencial de tener un efecto modulador del cartílago.

Ejemplo 2

ES 2 535 213 T3

Procedimiento:

5 Se reseccionó cartilago articular de articulaciones humanas o animales de forma aséptica y se colocó en una placa de Petri grande en una pequeña cantidad de DMEM / F-12 o de F-12. El tejido se cortó en cubos con un tamaño de 1 - 2 mm y se transfirió a un matraz de cultivo pequeño que contenía 20 ml de DMEM o de F-12 + 400 u/ml de colagenasa. El matraz se puso en el agitador y se incubó durante una noche.

10 El digerido celular se aspiró repetidamente para aumentar la liberación de las células. A continuación el digerido celular se colocó en un tubo de centrifuga estéril de 50 ml y se centrifugó en la Beckman a 1000 RPM durante 10 minutos. El medio se desechó con una pipeta y se añadió medio DMEM / F-12 reciente que contenía un 1 % de FCS. Dependiendo del tamaño del sedimento se añadieron aproximadamente 2040 ml de medio. Se determinaron los recuentos celulares con un hemocitómetro y el digerido se completó hasta una concentración de 100.000 células / 0,2 ml.

Síntesis de los GAG:

15 Para llevar a cabo la síntesis de los GAG, se alicuotaron 0,2 ml en cada pocillo de una placa de 96 pocillos mediante el uso de una pipeta de canal 8 y las células se dejaron adherir durante 24 horas. Se eliminó el medio y se añadieron 0,3 ml de medio reciente con un 1 % de FCS durante 2 - 3 días. El día del experimento se eliminó el medio y se añadieron soluciones experimentales que contenían el isótopo 35-sulfato. La incubación se continuó durante 4 horas. Terminación: al final del periodo de incubación se eliminó el medio de marcaje, se aclaró la capa de células repetidamente con 0,3 ml de DMEM frío o con F-12 (aproximadamente 5 veces), y la capa de células se congeló para su recuento.

20 Recuento de las placas de 96 pocillos:

Se calentaron las capas de células de ambos experimentos sintéticos a 50 grados después de añadir 100 µl de NaOH 1 N durante un periodo de 2 horas. Se añadieron 200 ul de líquido de centelleo y las placas se colocaron en el contador. Los datos se expresaron como CPM / 100.000 células.

Agente de evaluación	Agentes individuales: CPM / 100.000 células	Suma (CPM)	Agentes combinados (CPM)	Diferencia (CPM)
CHSO4-L	64			
AA	70	134	18	-116
ChSO4-H	50			
AA	70	120	81	-39
Glu-H	117			
AA	70	187	16	-177
1 % de Sam	123			
10Paleos	86	209	62	-147
1 % de Sam	123			
1Paleos	74	197	80	-117
3 % de Sam	42			
1Paleos	74	116	100	-16
3 % de Sam	42			
10Paleos	86	128	83	-45
3 % de Sam	42			
Colágeno	118	160	90	-70
3 % de Sam	42			
AA	70	112	104	-8
AA	70			

(continuación)

Agente de evaluación	Agentes individuales: CPM / 100.000 células	Suma (CPM)	Agentes combinados (CPM)	Diferencia (CPM)
10Pentos	76	146	106	-40
Colágeno	70			
10Paleos	86	156	82	-74
Colágeno	118			
10Pentos	76	194	65	-129
Colágeno	118			
10 Paleos	86	204	77	-127

ChSO₄ = Condroitina
AA = Ácido araquidónico
SAMe = S-adenosilmetionina
Paleos = SOD
Colágeno = Colágeno
Pentos = Pentosano
H = concentración alta
L = concentración baja

5 En este modelo, a las concentraciones estudiadas, las combinaciones representativas tienen un efecto inhibitor (hipometabólico) en este estudio en particular. Este efecto hipometabólico podría ser beneficioso en diversos estados patológicos, de hecho ambas nuevas interacciones estimuladoras e inhibitoras podrían ser beneficiosas en diversos estados patológicos. Por ejemplo, un estado hipermetabólico es parte de la patogenia de algunas enfermedades. En dichas enfermedades, una respuesta inhibitora (hipometabólica) sería beneficiosa para el individuo. Se están planificando estudios futuros para investigar los efectos de un intervalo de concentraciones de 10 los agentes estudiados en nuevos modelos experimentales. Nótese que tanto los aumentos como las disminuciones en la actividad biosintética son nuevas interacciones y podrían ser beneficiosas para los organismos en unas circunstancias seleccionadas. Por ejemplo, muchos investigadores creen actualmente que la artrosis tiene un componente hipermetabólico, especialmente en las etapas tempranas de la patogenia. Los investigadores están divididos entre si el tratamiento debería centrarse en agentes que estimulen la producción de matriz de cartílago o 15 en agentes que sean inhibidores y que por lo tanto hagan que el entorno del cartílago sea más hipometabólico, lo que a su vez podría tener un efecto estabilizador sobre el tejido del cartílago.

Ejemplo 3

20 Un niño de 4 años tiene artritis reumatoide juvenil en la que el sistema inmunitario ataca inapropiadamente a los tejidos conectivos endógenos con anticuerpos contra el propio el colágeno de tipo II. La inflamación y la degradación del cartílago resultantes provocan dolor y disfunción en las articulaciones sinoviales. Los actuales tratamientos incluyen corticosteroides, que no suprimen selectivamente el sistema inmunitario, dejando así el cuerpo vulnerable ante una enfermedad infecciosa, o metotrexato, que inhiben la síntesis del ADN y la reparación y la replicación celulares, afectando así no sólo al sistema inmunitario sino también a la mucosa intestinal y a la médula ósea. A este 25 niño se le administran diariamente 2 mg de colágeno de tipo II y 10 mg diarios de SOD. El colágeno disminuye el ataque inmunitario inapropiado, y la SOD inactiva los destructivos radicales libres que dañan las células. Al prevenir el daño celular, la SOD ayuda a maximizar la función normal de las células del tejido articular. Esta combinación no tiene efectos secundarios perjudiciales a las dosis terapéuticas y es un añadido beneficioso para las terapias existentes para la artritis reumatoide.

Ejemplo 4

30 Un caballo de carreras pura sangre de 6 años de edad tiene una inflamación neutrófila del carpo. En esta afección el traumatismo de los tejidos de la articulación lesiona las células, y por lo tanto da como resultado la liberación de citocinas que atraen a un gran número de neutrófilos al espacio sinovial. Esta respuesta es beneficiosa en los casos

de septicemia, pero en situaciones no sépticas los neutrófilos no proporcionan ningún servicio útil al animal. De hecho, debido a que los neutrófilos producen diversos compuestos degradativos, incluyendo moléculas de superóxido, su presencia en la articulación contribuye a un ciclo vicioso de inflamación, daño tisular y aumento en la inflamación. Actualmente esta afección se trata con fármacos antiinflamatorios no esteroideos, que suprimen la síntesis de prostaglandinas y por lo tanto tienen muchos efectos secundarios. A este caballo se le administra una mezcla de diacarina 100 mg, pentosano 200 mg y SAME, 1000 mg. Tanto la diacarina como el pentosano inhiben la quimiotaxia (la atracción de los glóbulos blancos sanguíneos hacia el área afectada) y por lo tanto reducen las cifras de neutrófilos en la articulación. Adicionalmente, el pentosano estimula la síntesis de líquido sinovial, y por lo tanto ayuda a la función normal de la articulación. La diacarina inhibe la producción de superóxido; dado que la producción de superóxido es uno de los mecanismos a través de los cuales los neutrófilos tienen sus efectos perjudiciales, esta acción de la diacarina es obviamente beneficiosa. La SAME ayuda en la estructura y la función de las membranas celulares, y por lo tanto ayuda a reparar las células del tejido articular lesionado, bloqueando así los acontecimientos que inician la perjudicial inflamación. Esta combinación no tiene efectos secundarios perjudiciales a las dosis terapéuticas y es una gran mejora sobre las terapias existentes.

15 Ejemplo 5

Una mujer de 47 años de edad tiene artrosis grave en las rodillas. Actualmente requiere grandes dosis de AINEs para controlar sus síntomas. Aunque su cirujano ortopédico le ha recomendado tomar glucosamina / sulfato de condroitina, ha sido reticente a hacerlo debido a que estos compuestos se extraen de tejidos animales y la paciente es vegetariana estricta. En su lugar toma 25 mg de diacarina y 250 mg de ASU, y 500 mg de paracetamol diariamente. La diacarina inhibe la quimiotaxia y por lo tanto reduce la inflamación en la articulación de la rodilla. El ASU aumenta los TGF beta 1 y 2, estimulando la reparación de los tejidos articulares dañados. El paracetamol provoca una analgesia rápida, reduciendo los síntomas de la paciente sin afectar negativamente al metabolismo del cartílago y sin el riesgo de úlceras gastrointestinales. Como resultado de la reducción del dolor, la paciente decide añadir un paseo de 15 minutos a su rutina diaria. El ejercicio controlado mejora adicionalmente su estado físico y mental.

Ejemplo 6

A una vaca lechera de Jersey de 5 años de edad se le diagnostica una artrosis grave después de un episodio de fiebre y una sinovitis atribuida a la enfermedad de Lyme. Este animal es la fuente del suministro de leche de la familia del propietario, y el propietario desea tratar la cojera con compuestos que sean "naturales", es decir, con compuestos que se producen de forma natural en las plantas y en los cuerpos animales, en lugar de buscar unas soluciones más tradicionales tales como 1) eliminar al animal 2) mediante el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, o 3) mediante el uso de esteroides. El animal se trata diariamente con ASU 900 mg, SAME 600 mg y glucosamina 500 mg. Esta metodología es una mejora sobre las opciones existentes por diversas razones. Debido a que los compuestos son componentes naturales de las plantas y los cuerpos de animales, con unos amplios márgenes de seguridad documentados, existe menos preocupación con respecto a los metabolitos secretados en la leche. Debido a que los compuestos son disponibles por vía oral, y son activos en pequeñas cantidades, son fáciles de administrar con la comida del animal. El efecto combinado de los tres compuestos es reducir la inflamación y el dolor, ayudar en la función normal y estimular la curación de los tejidos conectivos.

Varios ejemplos adicionales ilustran el efecto de varias composiciones en la inhibición o en cualquier otra modulación de los marcadores de la inflamación y el dolor, tales como la COX-2. En muchos de estos ejemplos se diseñaron varias formulaciones para reducir los marcadores de inflamación y dolor, pero no para eliminar aquellos marcadores debidos completamente a la posibilidad de efectos secundarios adversos. Por lo tanto, un objetivo conseguido por algunas de las formas de realización descritas en los siguientes ejemplos era la reducción de los marcadores de la inflamación y el dolor hasta unos niveles aproximadamente de control, o ligeramente por encima o por debajo de los niveles de control.

En muchos de los siguientes ejemplos los ASU que se usaron (es decir, ASU-NMX 1000™, Nutramax Laboratories Inc., Edgewood, MD EE.UU.) se disolvieron y se diluyeron en etanol al 100 % (Sigma-Aldrich) para conseguir las concentraciones deseadas para su uso en el experimento en particular. Las concentraciones usadas en los estudios se basaban en el contenido mínimo en fitosterol de la composición de ASU. En primer lugar, se determinó la concentración deseada de ASU para su uso en un experimento específico mediante la incubación de condrocitos bovinos (5×10^5 células / pocillo) durante 72 h con: (i) medio de control solo, o con (ii) ASU a unas concentraciones de 25, de 8,3, de 2,7, de 0,9, y de 0,3 µg/ml. Las células fueron activadas con lipopolisacárido (LPS, 20 ng/ml; Sigma-Aldrich) durante 24 h, y los sobrenadantes celulares se analizaron para comprobar las concentraciones de PGE-2 y de nitrito secretadas. No hubo ningún efecto significativo sobre los niveles de PGE-2 ni de nitrito a 0,3 ni a 0,9 µg/ml. A 2,7 µg/ml, se produjo una ligera supresión de los niveles de la PGE-2 y de nitrito. Los mayores niveles de supresión se encontraron a entre 8,3 y 25 µg/ml. Las concentraciones de ASU usadas en estos Ejemplos se seleccionaron basándose en los datos anteriores y en las dosis químicas notificadas y los datos in vitro publicados previamente para los ASU.

En los Ejemplos 7 - 11 se usaron los siguientes términos y definiciones:

la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una proteína que funciona como una enzima y regula específicamente la producción de ciertos mensajeros químicos denominados prostaglandinas (PGE-2). Esta molécula de PGE-2 provoca el dolor y el hinchamiento de la inflamación observados en los estados artríticos. Cuando se bloquea la actividad de la COX-2 se reduce la inflamación. La COX-2 sólo es activa en el lugar de la inflamación.

- 5 La prostaglandina E2 (PGE-2) es un mensajero químico que pertenece a un grupo de sustancias similares a las hormonas que participan en una amplia variedad de funciones corporales que incluyen la inflamación. La PGE-2 provoca dolor e hinchamiento durante la inflamación.

p38: la cinasa MAP (MAPK) también se conoce como la cinasa de proteínas activada por mitógeno 14. La cinasa MAP p38 está implicada en un sistema de señalización que controla las respuestas celulares a las citocinas, el estrés y los productos bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS).

10 Cinasas de proteínas activadas por mitógeno (MAPK): la MAPK de serina / treonina es una cinasa de proteínas específica que responde a estímulos extracelulares y regula diversas actividades celulares que incluyen la expresión génica, la proliferación, la diferenciación y la función. Está implicada en la señalización y la comunicación celulares tales como las rutas de señalización sensibles a estímulos ejemplificados por el estrés físico y las citocinas.

- 15 Las citocinas son diversas proteínas implicadas en la señalización y la comunicación celular, como las hormonas y los neurotransmisores. Son críticas para el funcionamiento tanto de la respuesta inmunitaria innata como de la adaptativa, y juegan un importante papel en diversas enfermedades inmunológicas, inflamatorias e infecciosas.

20 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) pertenece a una superfamilia de proteínas denominadas citocinas que inducen la muerte (necrosis) de las células tumorales y posee una amplia variedad de actividades proinflamatorias. El TNF- α es multifuncional, y la inhibición de su actividad es beneficiosa para reducir la inflamación en enfermedades inflamatorias que incluyen la artritis.

25 La interleucina-1 beta (IL-1 β) es una proteína perteneciente a la familia de las citocinas producida por diversas células, incluyendo los condrocitos, los macrófagos y los fibroblastos. Es un importante regulador de la inflamación. La IL-1 β eleva la temperatura corporal y la producción de otros mediadores químicos implicados en la inflamación y en la inmunidad innata.

La sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) es una enzima soluble que controla la producción de óxido nítrico (NO) después de la exposición a citocinas y a otros estimulantes. La iNOS es importante en la inflamación y en la defensa frente a una infección.

30 Las quimiocinas son unas proteínas que son producidas por diversas células que tienen la capacidad de atraer diferentes células al lugar de la inflamación y o de la lesión, y ayudan a localizar estas células *in situ*. Dos ejemplos de quimiocinas son la interleucina-8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP).

Ejemplo 7: regulación de la producción de prostaglandina E-2 en condrocitos activados por la IL-1 β propagados en un cultivo en rotación sobre un microportador.

35 El estudio del Ejemplo 7 fue diseñado para evaluar si los condrocitos propagados en un cultivo en rotación sobre un microportador podían ser activados por la interleucina-1 β (IL-1 β) para producir prostaglandina E-2 (PGE-2); y si esta activación podía ser bloqueada por productos naturales conocidos individualmente por su actividad antiinflamatoria: insaponificables de aguacate soja (ASU), glucosamina (Glu) y sulfato de condroitina (CS).

40 Método: se propagaron condrocitos caninos ($4 \times 10^3/\text{cm}^2$) sembrados en microesferas microportadoras de colágeno, en un cultivo en rotación durante 14 días. A continuación se incubaron con: medio solo o la combinación de ASU (NMX-1000™, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CS (TRH122®, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y Glu (FCHG49®, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24 h. La combinación de ASU, Glu y CS fue suministrada por Nutramax Laboratories, Inc. Después los cultivos se incubaron con medio solo o se activaron con IL-1 β (10 ng/ml) a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 24 h. El sobrenadante se ensayó para comprobar el contenido en PGE-2. Los condrocitos se analizaron mediante microscopía e inmunofluorescencia para comprobar el colágeno de tipo II. Los datos se analizaron mediante un ANOVA con la prueba de Tukey post-hoc. Unos valores de p < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

45 Resultados: siguiendo este método se averiguó que los condrocitos se adhirieron, se multiplicaron sobre los microportadores y produjeron material de matriz extracelular, según se ilustra en las dos imágenes de la FIG. 6. Estas figuras muestran una microfotografía de contraste de fases de los condrocitos en crecimiento sobre microportadores, lo que indica que las células proliferan y producen matriz extracelular.

50 Según se ilustra en la FIG. 7 ("Imagen del microscopio óptico de condrocitos inmunoteñidos que confirma su producción continua de colágeno de tipo II, lo que es característico de su fenotipo de cartilago articular"), los cultivos formaron agregados y se inmunotñieron para el colágeno de tipo II, lo que indica una producción continua de la proteína.

Según se ilustra en la FIG. 8 ("Producción de PGE-2 por parte de los pobrecitos después de la IL-1 β , lo que indica

que los condrocitos continúan respondiendo incluso en un pase posterior"), la activación de los microportadores sembrados con condrocitos en los pases 3 y 4 mostraron una sensibilidad similar a la citocina, con unos niveles de IL-1 β y de PGE-2 del 179 % y del 165 % de los controles no activados, respectivamente.

5 El tratamiento previo de los microportadores sembrados con condrocitos con la combinación de ASU, Glu y CS redujo significativamente los niveles de PGE-2 hasta aproximadamente un 60 % por debajo de los controles no activados ($p < 0,05$).

10 Según se ilustra en la FIG. 9 ("La producción de PGE-2 por parte de los condrocitos es inhibida por la combinación de ASU-CS y Glu, lo que indica que la combinación disminuye la producción de este marcador proinflamatorio"), los condrocitos aumentaron los niveles de PGE-2 (19152 ± 2721 pg/ml) cuando fueron activados con la IL-1 β . La combinación de ASU, CS y Glu inhibió la producción de PGE-2 (4020 ± 468 pg/ml) en un 79 % cuando se comparaba con el control activado por la IL-1 β ($p < 0,05$).

15 Conclusión: esta prueba demuestra que el sistema de cultivo en rotación sobre un microportador puede usarse para evaluar las respuestas de los condrocitos frente a estímulos proinflamatorios y para identificar agentes que pueden modificar estas respuestas. La condición dinámica en el biorreactor en rotación sobre un microportador parece recapitular el entorno biomecánico en el que se encuentran los condrocitos en la articulación. Por lo tanto, el sistema de cultivo en rotación sobre un microportador puede representar una herramienta útil para la evaluación de las potenciales propiedades antiinflamatorias de productos naturales. Mediante el uso de este sistema de cultivo hemos observado que la combinación de ASU, Glu y CS bloquea eficazmente la activación de la ruta inflamatoria.

20 **Ejemplo 8:** supresión de la expresión del TNF- α , de la IL-1 β , de la iNOS y de la p38 por parte de la combinación de insaponificables de aguacate soja, glucosamina y sulfato de condroitina en células THP-1 similares a los macrófagos humanos.

25 La artrosis (OA) es una enfermedad articular degenerativa caracterizada por la erosión del cartílago articular y una inflamación secundaria de la membrana sinovial. La membrana sinovial contiene monocitos / células similares a los macrófagos que producen mediadores críticos en la patogenia de la OA. Dichos mediadores proinflamatorios incluyen quimiocinas, citocinas, prostaglandinas y óxido nítrico. Recientes estudios clínicos e *in vitro* han indicado que ciertos productos naturales, tales como los insaponificables de aguacate soja (ASU), la glucosamina (Glu) y el sulfato de condroitina (CS), tienen cada uno propiedades inflamatorias. Se ha informado de que los ASU reducen el dolor y la incapacidad funcional en pacientes con OA. De forma análoga, la combinación de Glu y CS también demostró aliviar el dolor y mejorar la movilidad articular en el subgrupo de pacientes que padece una OA entre moderada y grave. En el estudio del Ejemplo 8, hemos evaluado si la combinación de ASU, Glu y CS podría tener un efecto más profundo en la supresión de la expresión génica proinflamatoria que los ASU solos, o que la combinación de Glu y CS. Estos tratamientos fueron ensayados en la bien documentada línea celular THP-1 de monocitos / macrófagos.

35 El estudio del Ejemplo 8 pretende determinar si la combinación de insaponificables de aguacate soja (ASU), la glucosamina (Glu) y el sulfato de condroitina (CS) era más eficaz en la supresión génica proinflamatoria que los ASU solos, o que la combinación de Glu y CS.

40 Métodos: se incubaron células THP-1 sustitutas de monocitos / macrófagos humanos (5×10^5 células) durante 24 h a 37 °C y un 5 % de CO₂ con: (i) medio de control solo, (ii) ASU (8,3 μ g/ml; NMX1000TM-ASU), (iii) Glu (15 mM; FCHG49®) y CS (20 μ g/ml; TRH122®), o con (iv) una combinación de ASU (8,3 μ g/m), Glu (15 mM), y CS (20 μ g/ml). Todos los materiales del ensayo fueron suministrados por Nutramax Laboratories, Inc., Edgewood, MD. Después las células se activaron con 20 ng/ml de LPS durante 1 hora. Se extrajo el ARN total y se sometió a un análisis mediante una TA-PCR mediante el uso de cebadores específicos para el TNF- α , la IL-1 β , la iNOS, la p38 y la S14 como gen constitutivo.

45 Resultados: el tratamiento previo con la combinación de ASU, Glu y CS suprimió profundamente la expresión del TNF- α , de la IL-1 β y de la iNOS en un 50 - 80 % en las células THP-1 activadas. El tratamiento de combinación redujo la expresión del TNF- α y de la IL-1 β hasta unos niveles similares a la situación inicial de los controles no activados y redujo la expresión de la iNOS hasta unos niveles inferiores a la situación inicial de los niveles no activados. El efecto inhibitorio de la preparación combinada de TNF- α , IL-1 β e iNOS sobre la expresión es más profundo que el de los ASU solos, o que de los Glu y CS juntos. La inhibición de la expresión de citocinas y de la iNOS está asociada con una profunda supresión de la expresión de la p38.

50 Según se ilustra en la FIG. 10 ("Inhibición de la expresión del TNF- α en monocitos / células THP-1 similares a los macrófagos por parte de la combinación de ASU-CS-Glu, que indica que la combinación parece ser mejor que los componentes individuales"), la incubación previa con la combinación de ASU, Glu y CS suprimió la expresión del TNF- α en un > 75 % en las células activadas con LPS. El tratamiento de combinación reguló por disminución la expresión del TNF- α hasta unos niveles similares a los niveles de control no activados (C). El efecto inhibitorio de la combinación era más profundo que el de los agentes individuales solos.

Según se ilustra en la FIG. 11 ("Inhibición de la expresión de la IL-1 β en monocitos / células THP-1 similares a los macrófagos por parte de la combinación de ASU-CS-Glu, que indica que la combinación parece ser mejor que los

componentes individuales"), la incubación previa con la combinación de ASU, Glu y CS suprimió la expresión de la IL-1 β en un 50 % en las células activadas con LPS. El tratamiento de combinación era más eficaz en la supresión de la expresión de la IL-1 β que los agentes individuales solos.

5 Según se ilustra en la FIG. 12 ("Inhibición de la expresión de la iNOS en monocitos / células THP-1 similares a los macrófagos por parte de la combinación de ASU-CS-Glu, que indica que la combinación parece ser mejor que los componentes individuales"), la incubación previa con la combinación de ASU, Glu y CS suprimió la expresión de la iNOS en un 80 % en las células activadas con LPS. La combinación suprimió la expresión de la iNOS hasta unos niveles menores a los niveles de control no activados (C). La combinación era más eficaz en la supresión de la expresión de la iNOS que los agentes individuales solos.

10 Según se ilustra en la FIG. 13 ("Inhibición de la expresión de la p38 en monocitos / células THP-1 similares a los macrófagos por parte de la combinación de ASU-CS-Glu, que indica que la combinación parece ser mejor que los componentes individuales"), la incubación previa con la combinación de ASU, Glu y CS suprimió la expresión de la p38 en un 75 % en las células activadas con LPS. El tratamiento de combinación reguló por disminución la expresión de la p38 hasta unos niveles menores a los niveles de control no activados (C). La combinación era más eficaz en la supresión de la expresión de la p38 que los agentes individuales solos.

15 ANÁLISIS / CONCLUSIÓN: este ejemplo demuestra que la combinación de ASU, Glu y CS era más eficaz en la supresión de la expresión génica proinflamatoria que los ASU solos, o que los Glu y CS conjuntamente. La supresión del TNF- α , de la IL-1 β y de la iNOS estaba asociada con una regulación por disminución de la p38, un mediador de la transcripción de señales clave implicado en la inflamación articular. Estos hallazgos sugieren la potencial utilidad clínica del tratamiento de combinación para aliviar el dolor y la inflamación en pacientes con OA, particularmente en aquellos que no responden a los tratamientos individuales solos.

20 **Ejemplo 9:** inhibición de la expresión génica de la ciclooxigenasa-2 y de la producción de la prostaglandina E2 por parte de insaponificables de aguacate soja (ASU) en condrocitos.

25 Introducción: la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es la enzima crítica implicada en la inflamación y juega un papel clave en la producción del mediador proinflamatorio prostaglandina (PGE-2). También conocida como sintasa de prostaglandina G/H, la COX-2 cataliza la conversión por etapas del ácido araquidónico en dos intermedios de vida corta, la prostaglandina G (PGG) y la prostaglandina H (PGH). La PGG isomeriza en diferentes formas, incluyendo la PGE-2. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se usan ampliamente para suprimir la inflamación y aliviar el dolor en la artrosis (OA) mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Más recientemente se ha documentado que las Medicinas Complementarias y Alternativas (CAM), tales como los productos derivados de plantas, ejercen una potente actividad antiinflamatoria. Véase, por ejemplo, Soeken KL. y col. Clin J. Pain. 20 (1): 13 - 8, 2004. Entre estos están los extractos de insaponificables de aguacate soja (ASU). La actividad antiinflamatoria de los ASU se ha ensayado en prototipos de células tisulares derivadas principalmente del sistema inmunoinflamatorio. Se sabe poco sobre el efecto de los ASU sobre las células de cartílago. Como componente celular único del cartílago, los condrocitos sintetizan mediadores proinflamatorios tales como la PGE-2. El estudio del Ejemplo 9 ensayó la hipótesis de que los ASU inhiben eficazmente la expresión génica de la COX-2, suprimiendo así la síntesis de la PGE-2.

35 Materiales y Métodos: se aislaron condrocitos articulares de las articulaciones metacarpianas de Holsteins maduras mediante una digestión con colagenasa. Los condrocitos se colocaron en placas (5 x 10⁵ / pocillo) y se mantuvieron durante 5 - 7 días antes de su uso. Los condrocitos se incubaron previamente con: (i) ASU (25 μ g/ml) durante 72 h, o (ii) medio de control solo durante 72 h. Los condrocitos se volvieron a incubar a continuación con medio de control solo o activado con 20 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) a 37 °C, 5 % de CO₂, durante: (a) 1 hora para determinar la expresión de la COX-2 mediante un análisis por RT-PCR, y (b) 24 horas para medir los niveles de PGE-2 secretada mediante un inmunoensayo. Las células se lisaron y se extrajo el ARN total con TRIzol® (Life Technologies™). Se sometieron cantidades iguales (1 μ g) del ARN total a una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Se usaron cebadores bovinos específicos para la COX-2, y GAPDH como el gen constitutivo. Los geles que contenían bromuro de etidio se electroforetizaron para visualizar las bandas bajo luz UV. Se realizaron entre tres y cinco análisis por separado. Se realizaron comparaciones múltiples mediante un ANOVA monofactorial (análisis de Tukey post-hoc) mediante el uso del programa estadístico SigmaStat, en el que un p < 0,05 se consideraba estadísticamente significativo.

40 Resultados: la incubación previa de los condrocitos con insaponificables de aguacate soja redujo la expresión de la situación inicial de la COX-2 en condrocitos bovinos no activados. Según se muestra en las FIGS. 14A y 14B ("Inhibición de la expresión de la COX-2 en condrocitos activados por ASU"), la incubación previa de los condrocitos con ASU durante 72 h, seguida de una activación con LPS durante 1 hora, bloqueó profundamente la activación de los transcritos de la COX-2 por debajo de los niveles de la situación inicial.

55 Además, según se muestra en la FIG. 15 ("Inhibición de la producción de PGE-2 en condrocitos activados con ASU"), la incubación previa de los condrocitos con ASU durante 72 horas, seguido de una activación con LPS durante 24 horas, redujo significativamente la concentración de PGE-2 secretada (P < 0,01), según se muestra en la FIG. 15. Se realizaron comparaciones múltiples mediante un ANOVA monofactorial (análisis de Tukey post-hoc)

mediante el uso del programa estadístico SigmaStat, en el que un $p < 0,05$ se consideraba estadísticamente significativo.

5 Análisis / Conclusión: el estudio del ejemplo 9 demuestra que los ASU inhiben la activación de la expresión de la COX-2 en los condrocitos. Esta inhibición da como resultado una disminución en la producción del mediador proinflamatorio PGE-2. Se ha documentado que el bloqueo de la producción de PGE-2 alivia el dolor asociado con la inflamación. Nuestros hallazgos apoyan la utilidad propuesta de los ASU en la gestión de estados dolorosos, ejemplificados por la artrosis.

Ejemplo 10: inhibición de las citocinas proinflamatorias y de la expresión de la COX-2 en condrocitos y en monocitos por parte de los insaponificables de aguacate soja (ASU).

10 Se sabe que las citocinas TNF- α e IL-1 β , y la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), son los principales mediadores en los trastornos inflamatorios crónicos. La COX-2 es la enzima crítica implicada en la inflamación mediante la regulación de la producción de la prostaglandina PGE-2. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se usan ampliamente para suprimir la inflamación y aliviar el dolor, particularmente en la artrosis, mediante la inhibición de la síntesis de citocinas y de PG. Más recientemente, unas metodologías alternativas para la gestión del dolor y la inflamación han proporcionado unos resultados prometedores. Entre estas están los extractos de insaponificables de aguacate soja (ASU). Algunos estudios clínicos con seres humanos sugieren que los ASU reducen el dolor asociado a la inflamación, y reducen la magnitud del estrechamiento del espacio articular. Se sabe poco sobre el efecto de los ASU sobre objetivos celulares. El estudio del Ejemplo 10 ensayó la hipótesis de que los ASU inhiben la expresión génica de la COX-2, del TNF- α y de la IL-1 β en condrocitos y en monocitos. Se usaron células THP-1 sustitutas de monocitos similares a los macrófagos.

25 Se usaron condrocitos articulares (5×10^5 / pocillo) de las articulaciones metacarpianas de Holsteins maduras y las células THP-1 similares a los monocitos humanos (5×10^5 / pocillo) se incubaron previamente con: (i) ASU (25 $\mu\text{g/ml}$) o (ii) medio de control solo durante 72 y 24 h respectivamente. Las células se incubaron de nuevo con medio de control solo o con 20 ng/ml de lipopolisacáridos (LPS) durante: (a) 1 h para determinar la expresión génica mediante un análisis con una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y (b) 24 h para medir los niveles de PGE-2 secretada mediante un inmunoensayo. Se usaron cebadores bovinos específicos para la COX-2, el TNF- α , la IL-1 β bovinos y humanos, y GAPDH como el gen constitutivo. Los geles que contenían bromuro de etidio se electroforetizaron para visualizar las bandas de ADN bandas bajo luz UV. Se realizaron entre tres y cinco análisis por separado. Se realizaron comparaciones múltiples mediante un ANOVA monofactorial (análisis de Tukey post-hoc) mediante el uso del programa estadístico SigmaStat, en el que un $p < 0,05$ se consideraba estadísticamente significativo. Los ASU redujeron la expresión de la situación inicial de la COX-2, del TNF- α y de la IL-1 β en los condrocitos bovinos no activados.

35 Además, los ASU bloqueaban en las células la activación de estos mediadores inducida por el LPS. El bloqueo de la expresión de la COX-2 dio lugar a una reducción significativa en la PGE-2 secretada en un $93 \pm 1\%$ ($P < 0,01$). De forma análoga, una incubación previa de las células THP-1 con ASU durante 24 h, seguida de una activación con LPS durante 1 h, bloqueó profundamente la expresión de los transcritos del TNF- α y de la IL-1 β en comparación con las células de control activadas sólo con LPS.

40 El estudio del Ejemplo 10 demuestra por primera vez que los ASU suprimen drásticamente la expresión del TNF- α y de la IL-1 β en condrocitos y en monocitos, confirmando también la reducción de los transcritos de la COX-2 en los condrocitos. Esta observación apoya los hallazgos clínicos positivos de que los ASU mejoran el dolor y la inflamación. Nuestro estudio apoya la utilidad propuesta de los ASU en la gestión de estados dolorosos, ejemplificados por la artrosis.

Ejemplo 11: la expresión génica proinflamatoria en los condrocitos es inhibida por la combinación de insaponificables de aguacate soja, glucosamina y sulfato de condroitina.

45 Introducción: la artrosis (OA) es una enfermedad articular degenerativa caracterizada por la erosión del cartílago articular y una inflamación secundaria de la membrana sinovial. La erosión del cartílago es inducida por mediadores proinflamatorios producidos por los condrocitos en el cartílago y por los monocitos / macrófagos localizados en la membrana sinovial. Algunos estudios clínicos han documentado el beneficio del uso de insaponificables de aguacate soja (ASU), glucosamina (Glu) y sulfato de condroitina (CS) en la gestión de la OA. Se ha demostrado que los ASU reducen el dolor y minimizan el deterioro funcional en pacientes con OA. Véase, por ejemplo, Ernst E. Clin Rheum. 2003; 22 (4 - 5): 285 - 8. De forma análoga, la combinación de Glu y CS reduce significativamente la cojera y mejora la movilidad particular en animales que padecen OA. Véase, por ejemplo, Hanson RR y col. Equine Practice. 1997; 19 (9): 16 - 22; y Canapp SO y col. Amer. J Vet. Res. 1999; 60 (12): 1552 - 7. Véase también, por ejemplo, Henrotin YE y col. Clin Rheum. 1998; 17 (1): 31 - 9; y Chan PS y col. Osteoarthritis Cart. 2005; 13 (5): 387 - 94. La expresión de los mediadores proinflamatorios está regulada a través de la ruta de señalización de la p38 MAPK. Nuestro estudio evaluaba si la combinación de ASU, Glu y CS regulaba profundamente por disminución la expresión génica proinflamatoria a través de la ruta de señalización de la p38. Hemos evaluado el efecto de estos compuestos en condrocitos humanos y equinos.

5 Materiales y Métodos: se aislaron condrocitos equinos del cartílago articular mediante una digestión con colagenasa. Los condrocitos equinos y los condrocitos articulares humanos (ATCC) se colocaron en placas a una densidad de 5×10^5 células / pocillo. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 24 h con medio de control solo o con concentraciones fisiológicas de: (i) ASU (8,3 µg/ml; NMX1000™-ASU), (ii) Glu (11 µg/ml; FCHG49®) y CS (20 µg/ml; TRH122®), o (iii) una combinación de ASU (8,3 µg/ml), Glu (11 µg/ml) y CS (20 µg/ml). Para inducir la inflamación las células se activaron durante 1 h con lipopolisacárido (20 ng/ml, LPS) o con interleucina-1-beta (10 ng/ml, IL-1β). El ARN total se aisló mediante el uso de TRIzol® (Life Technologies™) y la expresión génica fue analizada mediante el uso de una RT-PCR.

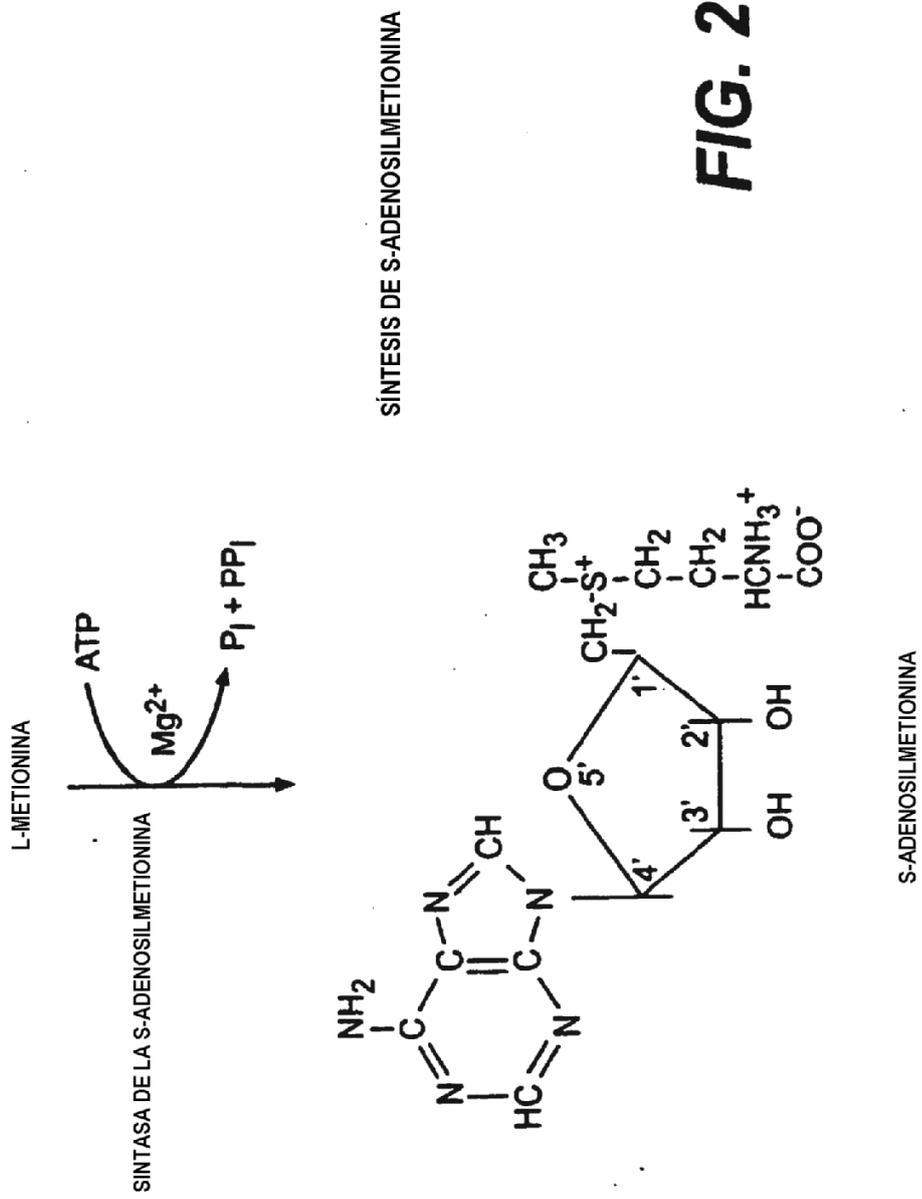
10 Resultados: en los condrocitos equinos activados, el tratamiento de combinación suprimió la expresión de la COX-2 hasta unos niveles similares a los niveles de control no activados. Además, la combinación de ASU, Glu y CS suprimió la expresión de quimiocinas en los condrocitos humanos activados. Véase la FIG. 16 ("Inhibición de la expresión de la quimiocina IL-8 en condrocitos activados por la combinación de ASU-CS-Glu, lo que indica que la combinación parece ser mejor que los componentes individuales") y la FIG. 17 ("Inhibición de la expresión de la quimiocina MCP en condrocitos activados por la combinación de ASU-CS-Glu, lo que indica que la combinación parece ser mejor que los componentes individuales"). La expresión de la interleucina-8 (IL-8) y de la MCP fue regulada por disminución hasta unos niveles similares a los niveles del control no activado.

15 Análisis / Conclusión: el estudio del Ejemplo 11 demostraba que la combinación de ASU, Glu y CS suprimía profundamente la expresión génica proinflamatoria en los condrocitos. El tratamiento de combinación era eficaz para reducir la expresión de las quimiocinas. La supresión de los mediadores proinflamatorios, tales como las quimiocinas, es crítica en la modulación de la respuesta proinflamatoria en la articulación artrósica. Nuestros resultados refuerzan la potencial utilidad clínica de la combinación de ASU, Glu y CS en la gestión de la OA, proporcionando una opción alternativa a los pacientes que no responden a los agentes individuales solos.

20 Basándonos en las enseñanzas de la presente invención, el experto en la materia comprenderá que las combinaciones de los compuestos enseñadas por la presente invención actuarían sinérgicamente. Por ejemplo, se entiende que la glucosamina tiene efectos estimulantes sobre el metabolismo de los condrocitos, lo que a su vez ayuda a mejorar las enfermedades degradativas del cartílago. Sin embargo, un aumento en el metabolismo celular también puede producir un aumento en la producción de radicales, como subproducto natural de la fosforilación oxidativa. El aumento en la producción de radicales libres diluiría los efectos beneficiosos de la administración de glucosamina. Mediante la combinación de L-ergotioneína con glucosamina, se esperaría un aumento en el metabolismo y una reducción en los daños por los radicales libres, proporcionando un mayor beneficio que si se administraran los compuestos que dan lugar a estos efectos. Por lo tanto, el experto en la materia, basándose en las enseñanzas de la presente invención, comprendería que la combinación de glucosamina con L-ergotioneína sería más beneficiosa que proporcionar cualquiera de ellos solo. La sinergia que existe entre ciertos compuestos de la presente invención también permite el uso de unas dosis menores de cada compuesto. Aunque estos compuestos son bastante seguros, puede haber potenciales efectos secundarios. Por ejemplo, unas grandes dosis de sulfato de glucosamina o de sulfato de condroitina pueden provocar trastornos gastrointestinales en algunos individuos. Además, estos compuestos son caros; por estas razones es deseable la capacidad de minimizar la dosis y seguir consiguiendo unos efectos beneficiosos.

REIVINDICACIONES

1. El uso de una combinación que comprende uno o más insaponificables de aguacate / soja, un aminoazúcar y un componente de glucosaminoglucano para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una inflamación asociada con daño en el tejido conectivo en seres humanos y en animales.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1 en el que el medicamento es para administrar diariamente hasta alcanzar una concentración de estado estacionario en un líquido corporal del ser humano o del animal que baña un tipo celular objetivo que afecta al menos a uno de la COX-2, el TNF- α , la IL-1 β , la iNOS, la p38 y las quimiocinas, y en el que la dosis se reduce posteriormente en al menos uno de la frecuencia y la cantidad para mantener una respuesta deseada en el ser humano o en el animal.
- 10 3. El uso de la reivindicación 1, en el que el aminoazúcar es la glucosamina y el componente de glucosaminoglucano es el sulfato de condroitina, y en el que dicho medicamento es para administrar al ser humano o animal objetivo para prevenir y/o tratar la inflamación en una cantidad eficaz para moderar la expresión génica de al menos uno de la COX-2, el TNF- α , la IL-1 β , la iNOS, la p38 y las quimiocinas hasta unos valores aproximadamente normales.
- 15 4. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho medicamento reduce los niveles de la PGE-2, o inhibe o regula por disminución la expresión génica de la COX-2, del TNF- α , de la IL-1 β , de la iNOS, de la p38 o de las quimiocinas en una célula tisular.
5. El uso de la reivindicación 4, en el que la célula tisular es seleccionada de entre el grupo que consiste en: condrocitos, monocitos macrófagos y fibroblastos.
6. El uso de la reivindicación 4, en el que el medicamento comprende adicionalmente metilsulfonilmetano.
- 20 7. El uso de la reivindicación 4, en el que el uno o más insaponificables de aguacate / soja comprende uno o más fitosteroles.
8. El uso de la reivindicación 7, en el que los fitosteroles son seleccionados de entre el grupo que consiste en campesterol, estigmasterol, dihidrobrasisterol y Beta-sitosterol.
9. El uso de la reivindicación 4, en el que el aminoazúcar es natural, sintético o semisintético.
- 25 10. El uso de la reivindicación 4, en el que el uno o más insaponificables de aguacate / soja es natural, sintético o semisintético.
11. El uso de la reivindicación 4, en el que el aminoazúcar ha sido modificado químicamente mediante una o más de esterificación, sulfatación, polisulfatación, acetilación y metilación.
- 30 12. El uso de la reivindicación 4, en el que el aminoazúcar es seleccionado de entre el grupo que consiste en glucosamina, sales de glucosamina, y mezclas de las mismas.
13. El uso de la reivindicación 4, en el que el aminoazúcar es seleccionado de entre el grupo que consiste en clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, fosfato de glucosamina, manosamina y sales de N-acetilglucosamina.
- 35 14. El uso de la reivindicación 4, en el que el componente de glucosaminoglucano es un glucosaminoglucano natural, sintético o semisintético, un compuesto similar a un glucosaminoglucano, un precursor de un glucosaminoglucano o fragmentos de un glucosaminoglucano.
15. El uso de la reivindicación 4, en el que el componente de glucosaminoglucano ha sido modificado químicamente mediante una o más de esterificación, sulfatación, polisulfatación, acetilación y metilación.
- 40 16. El uso de la reivindicación 4, en el que el componente de glucosaminoglucano es seleccionado de entre el grupo que consiste en condroitina, sales de condroitina, ácido hialurónico, polisulfato de pentosano y mezclas de los mismos.
17. El uso de la reivindicación 4, en el que el componente de glucosaminoglucano es sulfato de condroitina.



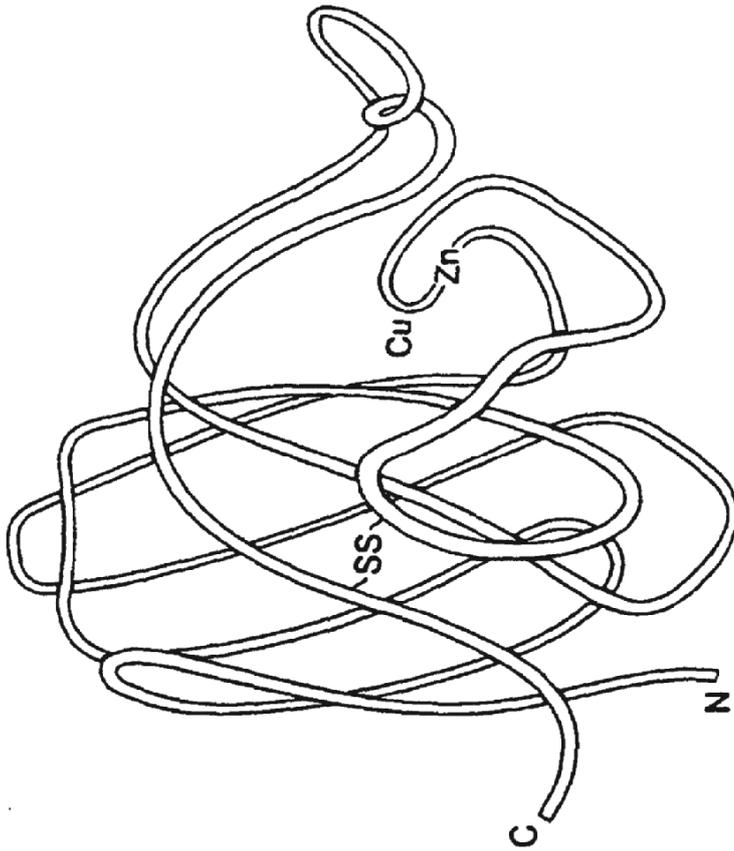
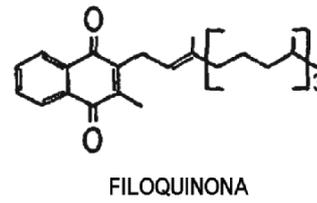
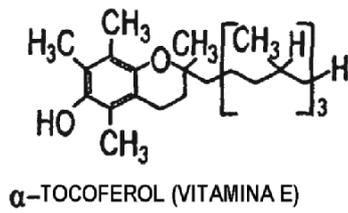
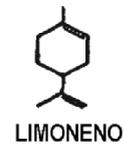
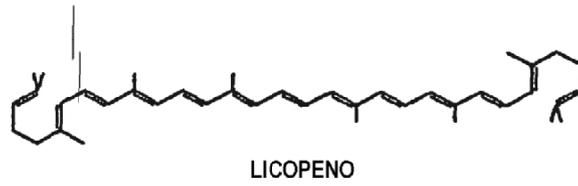


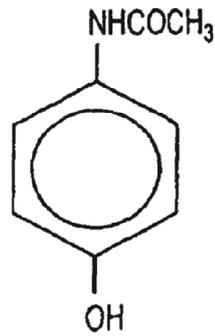
DIAGRAMA SIMPLIFICADO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE UNA SUBUNIDAD DE LA DISMUTASA DE SUPERÓXIDO BOVINA

FIG. 3

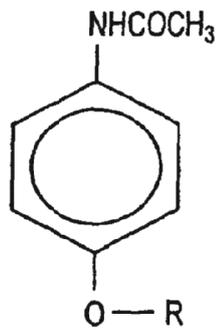


EJEMPLOS DE LÍPIDOS INSAPONIFICABLES

FIG. 4



PARACETAMOL



PARACETAMOL CONJUGADO
R = GLUCURONATO (PRINCIPAL),
SULFATO (SECUNDARIO)

PARACETAMOL Y SU CONJUGADO

FIG. 5

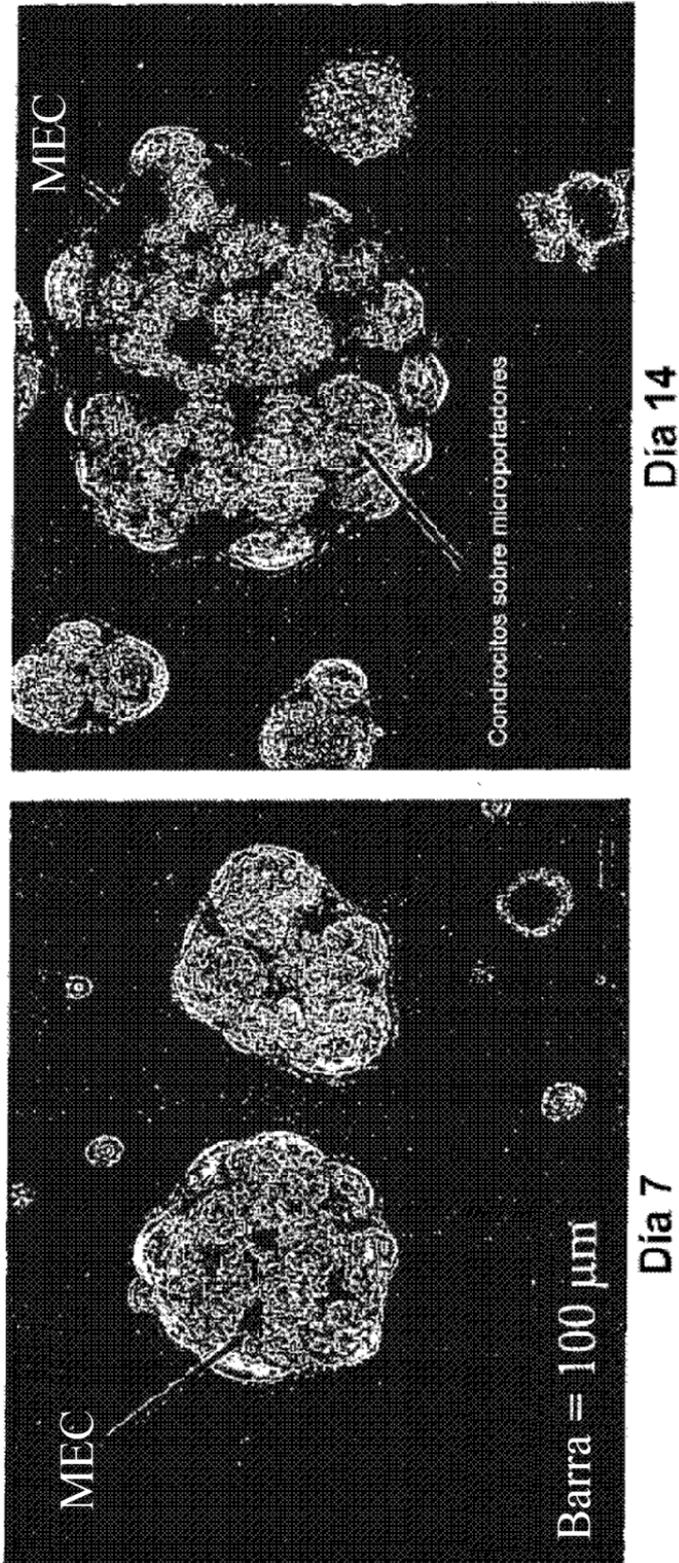


FIG. 6

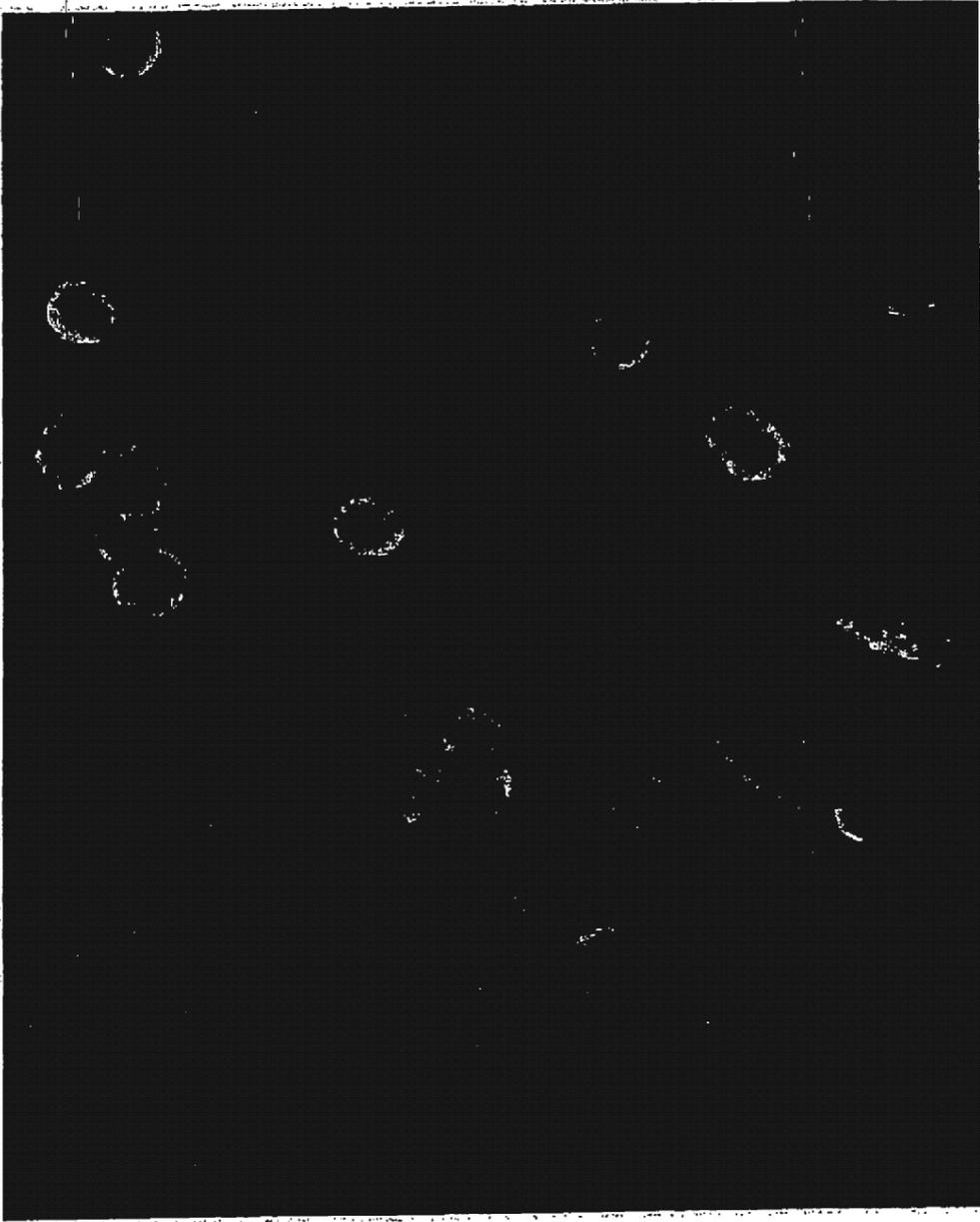


FIG. 7

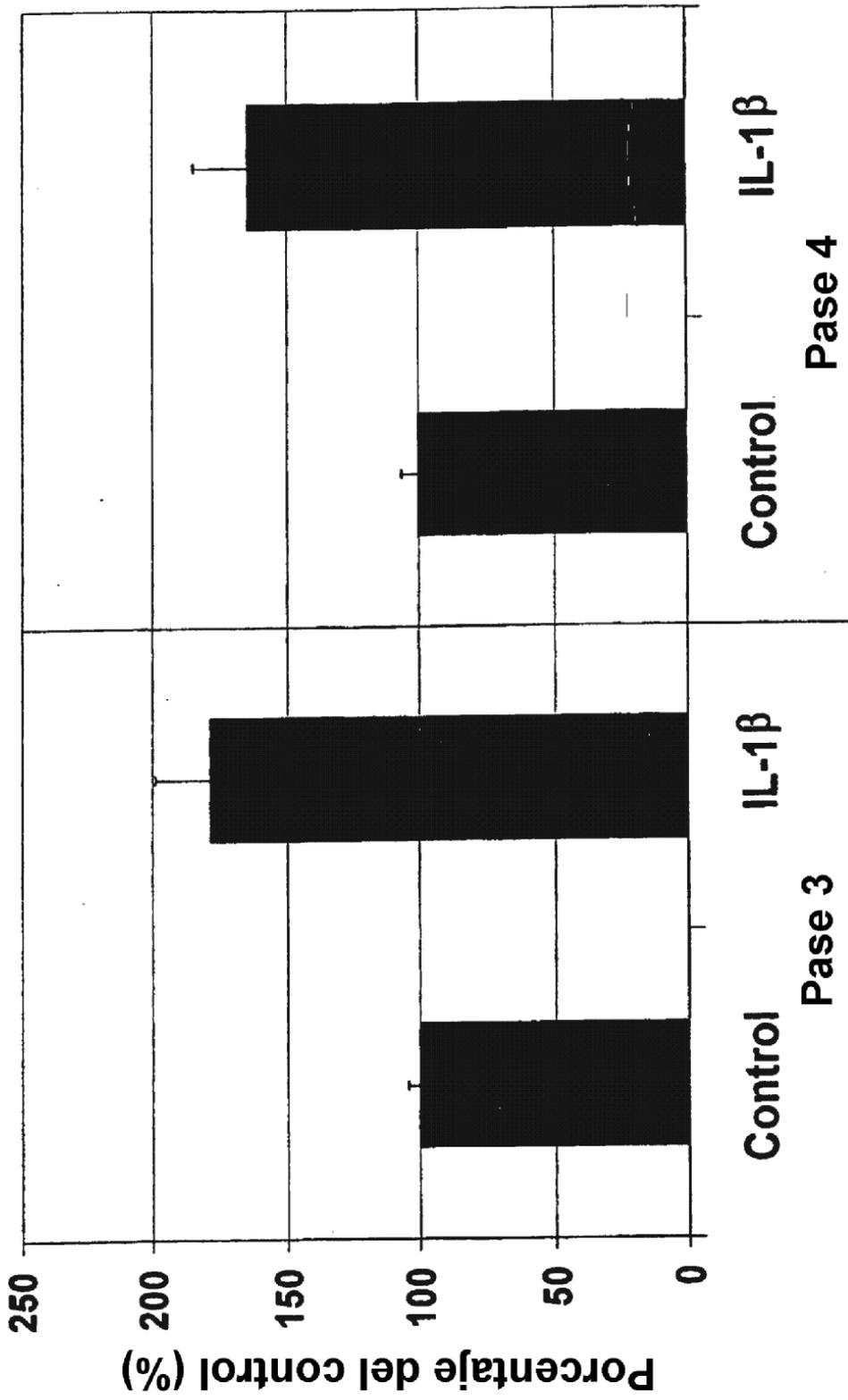


FIG. 8

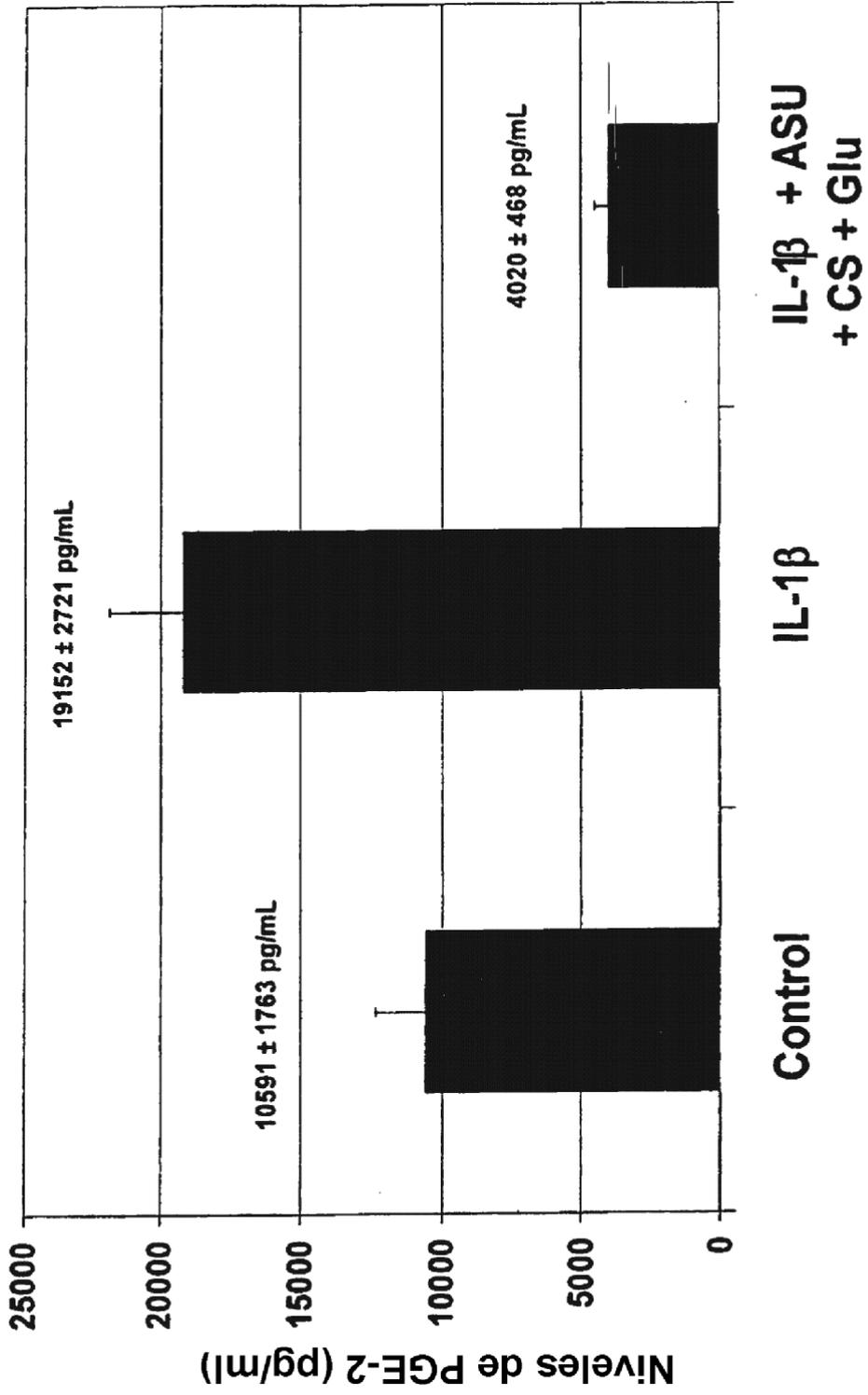


FIG. 9

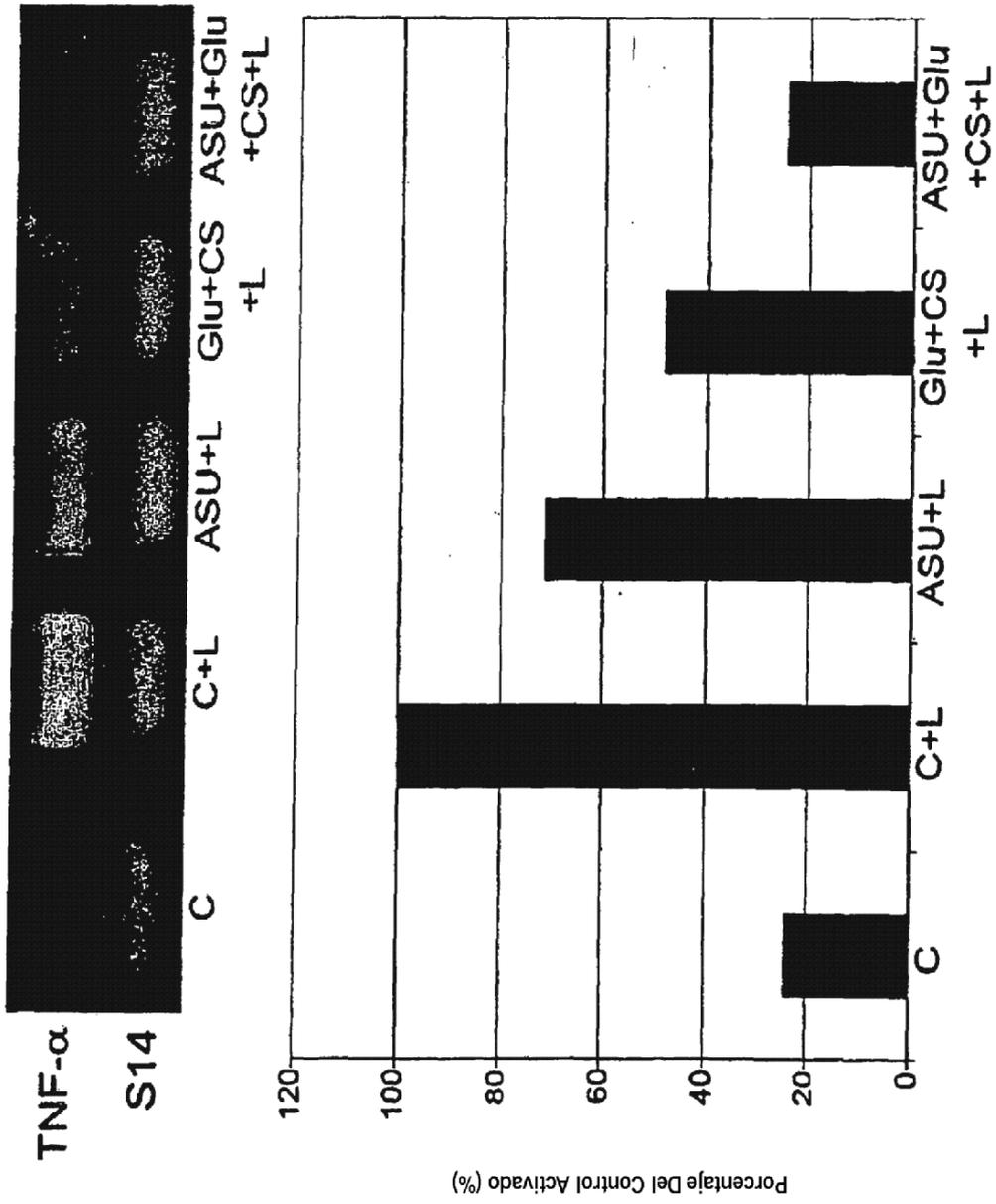


FIG. 10

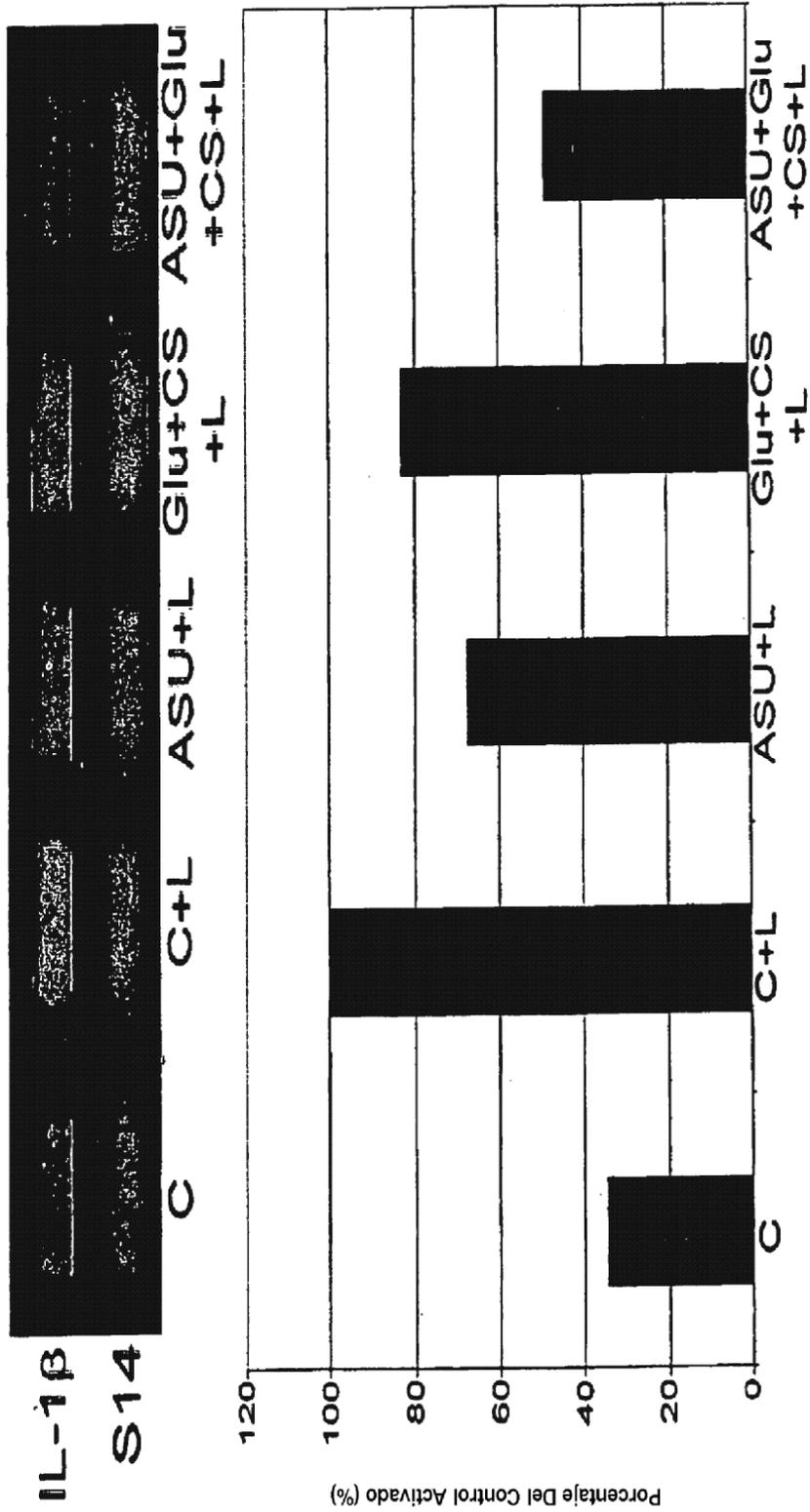


FIG. 11

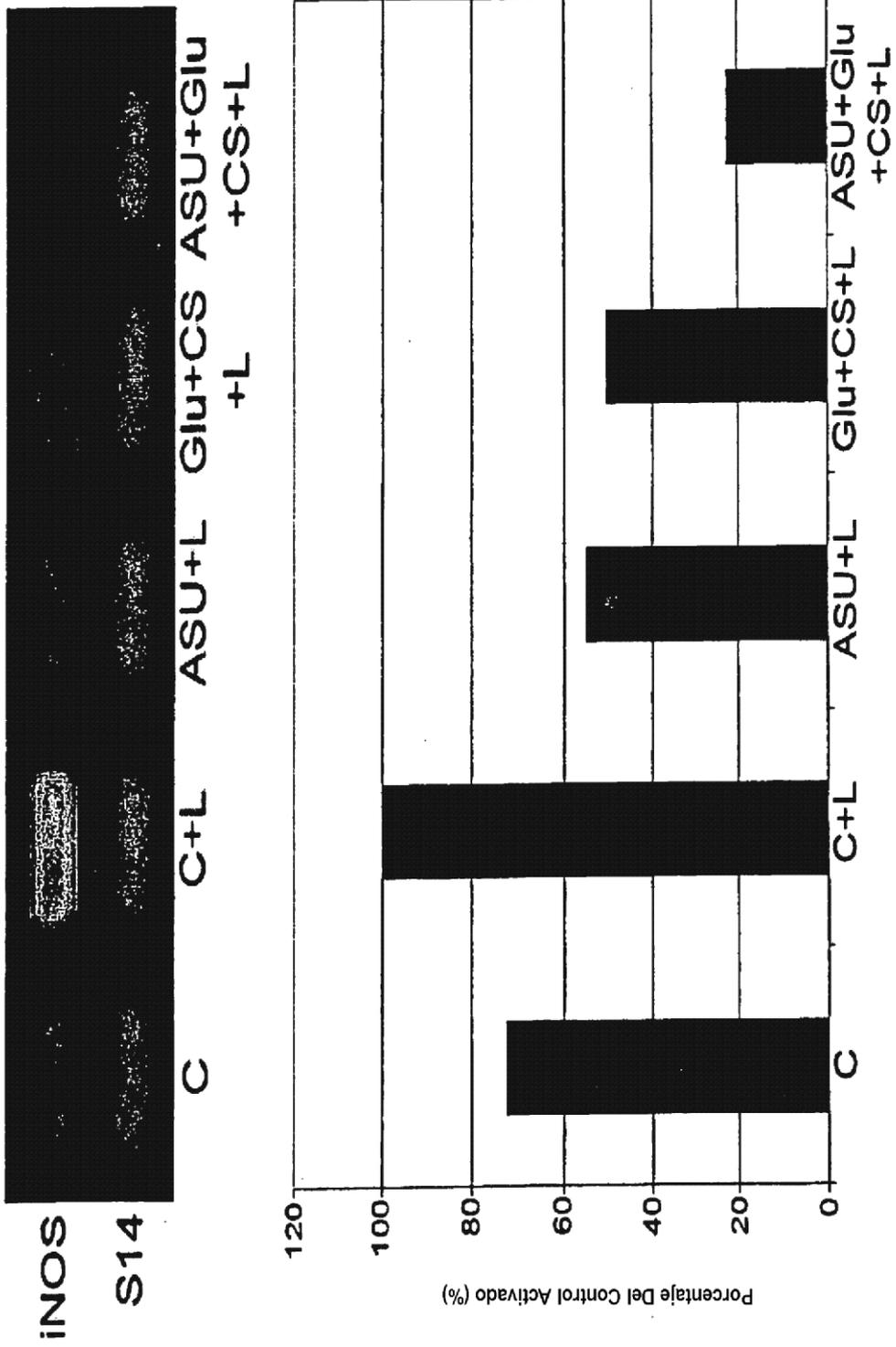


FIG. 12

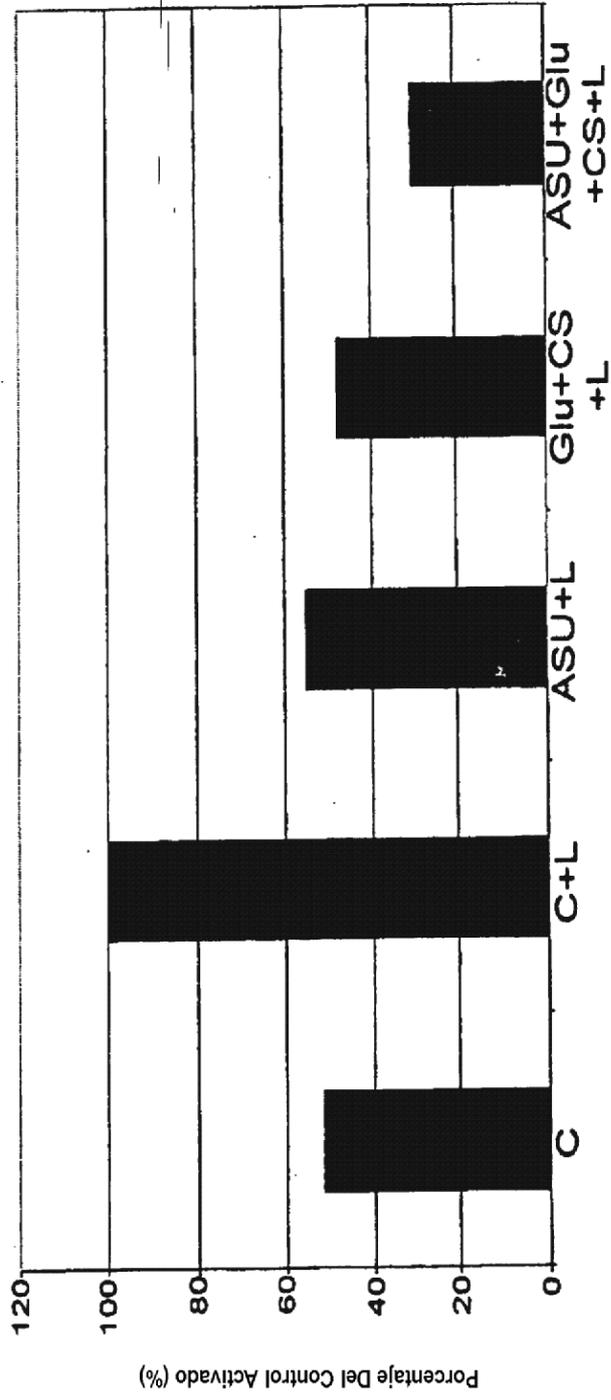
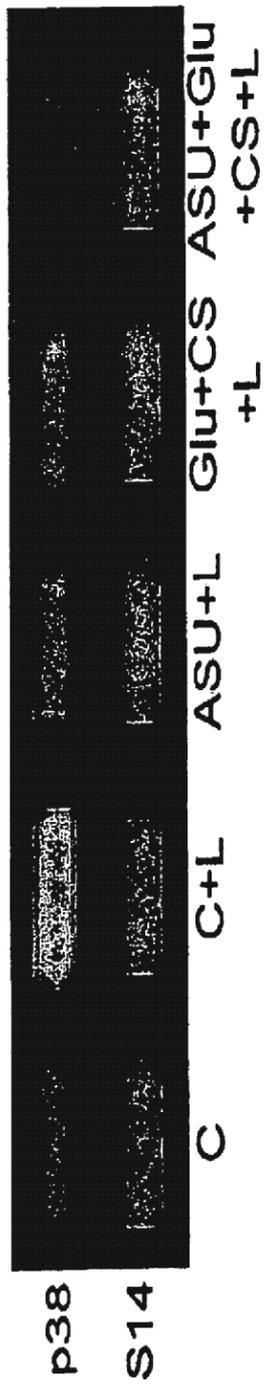
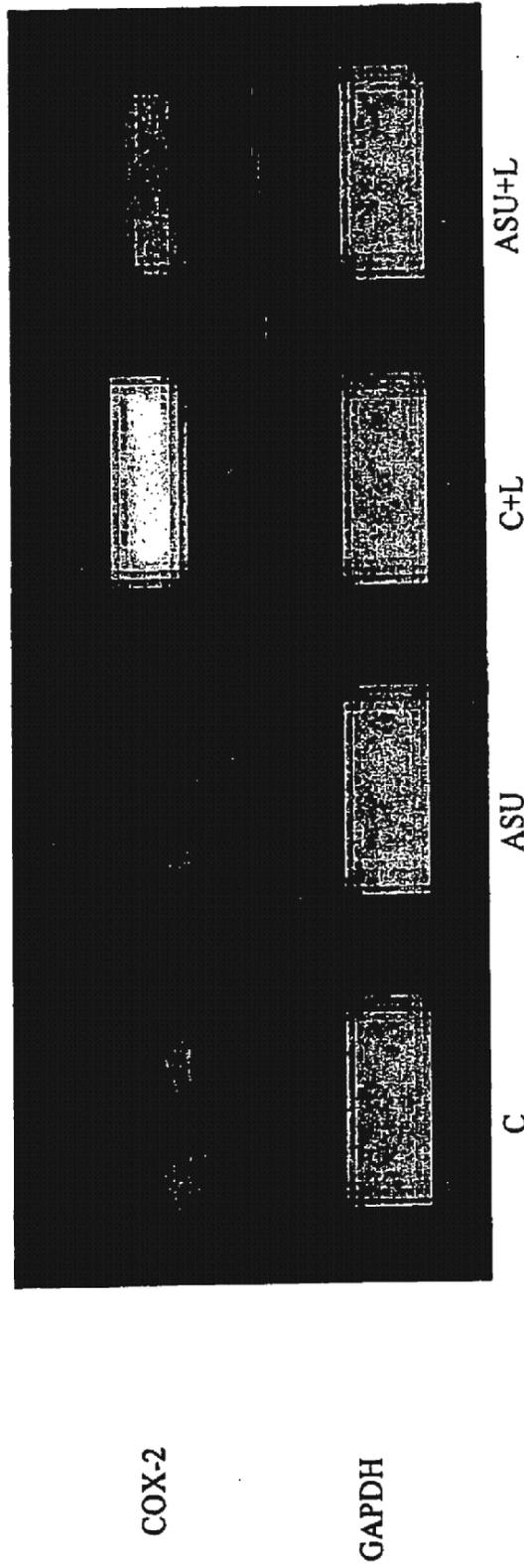


FIG. 13



C-Control; L-LPS

FIG. 14A

Efecto de los ASU sobre la Expresión Génica de la COX-2 de Condrocitos Bovinos

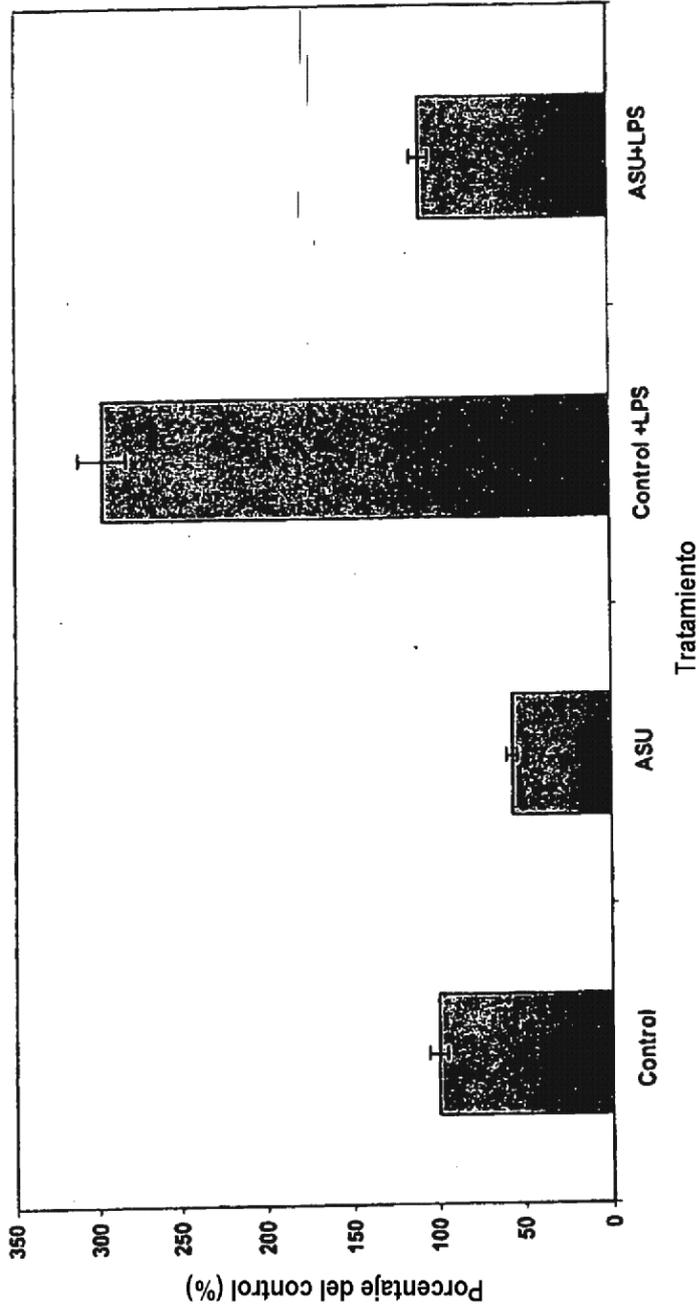


FIG. 14B

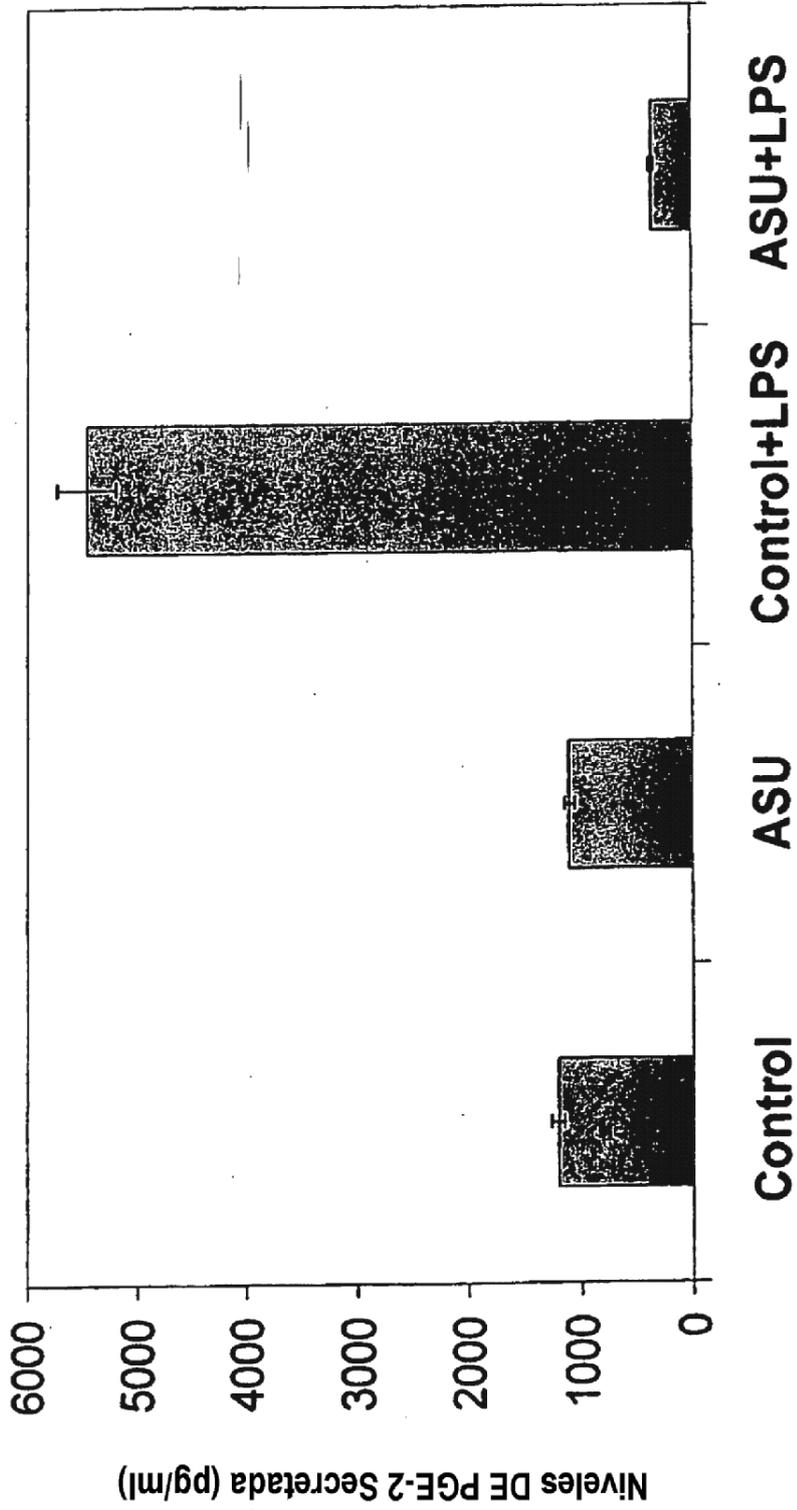


FIG. 15

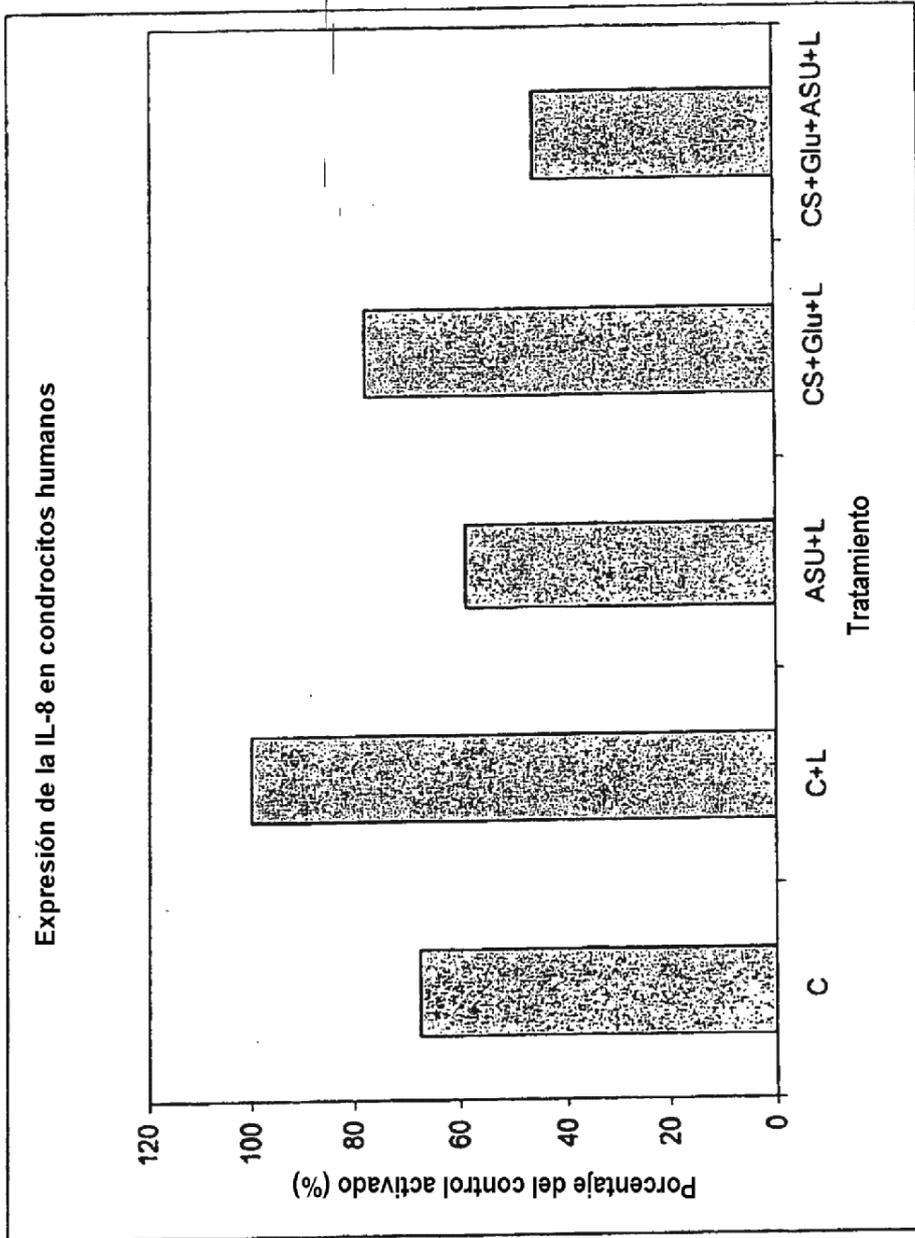


FIG. 16

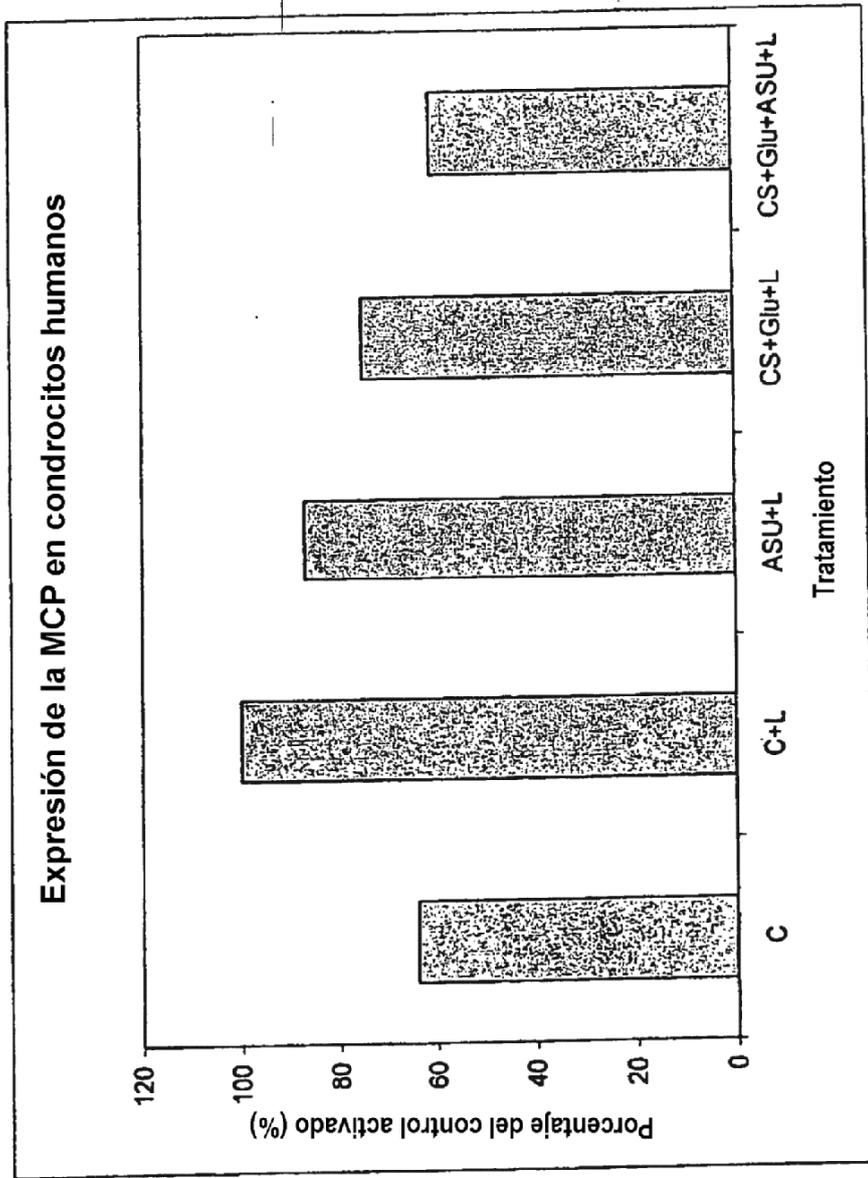


FIG. 17