

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 559**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 31/726** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)  
**A61P 17/06** (2006.01)  
**A61P 21/00** (2006.01)  
**A61Q 19/08** (2006.01)  
**A61K 8/65** (2006.01)  
**A23L 29/281** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2012 PCT/EP2012/056893**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12143324**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2012 E 12715380 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2699249**

54 Título: **Producto de cartílago**

30 Prioridad:

**21.09.2011 ES 201131526**  
**19.04.2011 ES 201130631**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2017**

73 Titular/es:

**BIOIBERICA, S.A. (100.0%)**  
**7 Pl. Francesc Macia**  
**08029 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**ESCAICH FERRER, JOSEP;**  
**DALMAU CASTAÑARES, PERE;**  
**TORRENT GIBERT, ANA MARIA;**  
**RUHI ROURA, RAMON y**  
**ALAEZ Verson, CARLOS RAUL**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 604 559 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

Producto de cartílago

5 **Sector técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un producto de cartílago. De igual modo, la presente invención se refiere al producto de cartílago obtenible a través de dicho procedimiento, así como a los usos del mismo.

10

**Antecedentes de la invención**

Las metaloproteasas de matriz (las MMP) y sus reguladores endógenos, los inhibidores tisulares de las MMP (los TIMP), son responsables del remodelado fisiológico de la matriz extracelular en los tejidos conectivos sanos. En condiciones fisiológicas normales están reguladas de forma precisa, pero cuando se desregulan se convierten en una causa de muchas enfermedades tales como las úlceras crónicas, la artrosis, la artritis reumatoide, la psoriasis, etc. (A. L. Clutterbuck *et al.*, *Curr. Drug Targets* 10(2), 1245-1254 (2009); I. Flisiak *et al.*, *Przegl Lek.* 62(2), 119-122 (2005); H. Nagase *et al.*, *Cardiovascular Research* 69, 562-573 (2006); X. Liu *et al.*, *Muscle Nerve* 41(2), 174-178 (2010)).

20

A la vista de lo anterior, los inhibidores de las MMP son un tratamiento potencial para la cicatrización de heridas, el envejecimiento de la piel, la psoriasis, la osteoporosis, la artrosis, la inflamación sinovial, una enfermedad periodontal y una afección muscular.

25

El proceso de cicatrización es un proceso complejo y dinámico que involucra la participación coordinada de distintos tipos celulares. Durante la primera fase de la cicatrización, denominada fase inflamatoria, las plaquetas, los neutrófilos, los granulocitos y los macrófagos, por medio de la liberación de factores de crecimiento, tienen una función central en la transición entre la inflamación y la reparación. Los factores de crecimiento liberados por los monocitos y los macrófagos son necesarios para la iniciación y propagación del nuevo tejido que recubrirá las heridas (A.J. Singer *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 341, 738-746 (1999)). Durante esta fase, el tejido degenerado es eliminado, lo cual constituye un pre-requisito para una cicatrización óptima. La segunda fase de la cicatrización de las heridas, denominada la fase regenerativa, se caracteriza por la proliferación celular y la síntesis de matriz extracelular. En este estado del proceso de cicatrización, se forma un tejido altamente vascularizado y varios tipos celulares, incluyendo macrófagos, fibroblastos, angioblastos y miofibroblastos se desplazan al lugar de la lesión. Los macrófagos proporcionan una fuente continua de factores de crecimiento, los fibroblastos proliferan y sintetizan una nueva matriz extracelular, lo cual conduce a la rápida formación del tejido de granulación, las células endoteliales generan un proceso de angiogénesis o de formación de nuevos vasos, que es estimulada por factores de crecimiento (VEGF y FGF) liberados por los macrófagos, pero también por los fibroblastos. Además de los factores angiogénicos, es también necesaria la presencia de una matriz extracelular adecuada formada por fibronectina, y la presencia de receptores endoteliales que reconozcan esta matriz extracelular. Durante la última fase del proceso, denominada fase reparativa, los fenómenos celulares principales son la producción de nuevo tejido conectivo formado por los fibroblastos principalmente y la proliferación y migración de los queratinocitos que conduce a la reepitelización de la herida.

30

35

40

45

Tan pronto como los fibroblastos sintetizan las fibras de colágeno de la nueva matriz extracelular, su actividad mitótica se reduce, al igual que la densidad celular y la vascularización del tejido. Tanto la deposición de colágeno como la orientación de los fibroblastos, está determinada por la fibronectina, la cual constituye la más importante proteína de la matriz extracelular en esta fase del proceso (D. Greiling *et al.*, *J. Cell. Sci.* 110, 861-870 (1997)). La reepitelización fisiológica es iniciada por varios estímulos: factores de crecimiento; la ausencia de células vecinas en los márgenes de la herida, lo que dispara tanto la proliferación como la migración de las células epidérmicas; la pérdida de contacto de las células epidérmicas con la membrana basal, y el establecimiento de nuevas interacciones entre las células con los componentes de la matriz dérmica; la producción y liberación de colagenasa o MMP1 por las células epidérmicas y la activación de plasmina por el plasminógeno, el cual a su vez activa la colagenasa (Fini *et al.*, *Am. J. Pathol.* 149, 1287-1302 (1996)).

50

55

Hay dos tipos de envejecimiento de la piel, el envejecimiento intrínseco o cronológico y el envejecimiento extrínseco, ligado mayoritariamente a las exposiciones solares (L. Rittié *et al.*, *Ageing Res. Rev.* 1, 705-720 (2002)).

60

El envejecimiento intrínseco, también conocido como el proceso natural de envejecimiento, es un proceso continuo que suele empezar a partir de los 25 años.

Al proceso cronológico, se añade, para las mujeres, un envejecimiento debido a la disminución de la producción de estrógenos en la menopausia.

65

La firmeza, elasticidad e hidratación de la piel son consecuencias fundamentalmente de la matriz extracelular de la dermis que es secretada por los elementos celulares de la misma, los fibroblastos, y que consiste principalmente en

5 colágeno de tipo I y III mayoritariamente, responsables de su firmeza y estructuración, la elastina, la cual confiere las propiedades elásticas de la misma, y el ácido hialurónico, principal glicosaminoglicano necesario para el mantenimiento de los niveles de hidratación. La densidad de la piel es consecuencia tanto de los elementos extracelulares como de los celulares. A mayor densidad de la piel, mayor número de células y mayor cantidad de elementos de la matriz extracelular (G. Jenkins, *Mech. of Ageing Dev.* 123, 801-810 (2002)).

10 Una composición cosmética anti-envejecimiento o anti-edad de la piel es aquella que por una parte es vigorizante, reestructurante e hidratante, y por la otra reduce los efectos que la edad provoca en la piel, modificando su aspecto tanto en la textura como en la rugosidad.

15 Una importante acción anti-envejecimiento se consigue cuando las células de la piel responden a la composición cosmética prolongando su ciclo vital, retrasando la manifestación de los síntomas de vejez celular, como son la limitación del crecimiento, la producción de proteínas extracelulares, el aumento de tamaño o la queratinización.

Otra propiedad crucial de un producto anti-envejecimiento es que sea capaz de disminuir los signos de la edad cuando ya están presentes en la piel.

20 La psoriasis es una enfermedad que afecta a la piel. Presenta un gran polimorfismo clínico (MA Johnson *et al*, *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, Jan 27 (2012)). Clínicamente la lesión cutánea se manifiesta en forma de placa eritematosa de bordes netos, cubierta por escamas gruesas, blanquecinas, de aspecto céreo, que se distribuyen preferentemente por zonas de extensión. Se caracteriza por una proliferación de los queratinocitos epidérmicos y un fallo de la maduración de éstas células en la formación de la queratina normal. La evolución de la enfermedad es impredecible y se ha demostrado que afecta intensamente a la calidad de vida del paciente (MM Heller *et al*, *Dermatol. Clin.* 30 (2), 281-291 (2012)).

25 La psoriasis es una enfermedad crónica que no tiene un tratamiento definitivo. El tratamiento médico actual depende del tipo de lesión, localización y edad del paciente (IA Al-Hogail, *Curr Vasc Pharmacol* 8 (3), 432-436 (2010)).

30 La artrosis (osteoartritis), es una enfermedad degenerativa articular que afecta a la mayoría de las personas a partir de los 65 años de edad, y que se caracteriza por una paulatina degradación del tejido cartilaginoso, unida a la presencia de inflamación y dolor. La inflamación sinovial normalmente se presenta más tarde, cuando la enfermedad está en estado avanzado, y generalmente, sólo es un componente secundario en la patología artrósica.

35 La artrosis se puede definir como la degeneración del cartílago hialino articular. Secundario a este efecto se produce la afectación de la membrana sinovial y el hueso subcondral (hueso en contacto con el cartílago), así como la formación de hueso nuevo en los márgenes de las superficies de la articulación.

40 El cartílago permite que los huesos se muevan deslizándose unos sobre otros. También absorbe la tensión que produce el movimiento físico. En la artrosis, la superficie del cartílago se rompe y desgasta causando que los huesos se muevan unos contra otros, produciendo fricción, dolor, hinchazón y pérdida de movimiento en la articulación. Con el paso del tiempo la articulación puede deformarse.

45 En condiciones normales, la renovación del cartílago es un proceso muy lento que consiste en una constante síntesis (anabolismo) y degradación (catabolismo) de los componentes de la matriz extracelular. El condrocito es la célula responsable de este metabolismo, proceso que debe estar perfectamente coordinado.

Aunque se desconoce todavía la etiología de la artrosis, actualmente se acepta como cierto que las primeras alteraciones se producen a nivel de condrocito, alteraciones que posteriormente darán origen a la aparición de una articulación artrósica.

50 Se han descrito una serie de factores de riesgo para la aparición de la enfermedad, entre estos se encuentran: el envejecimiento, la herencia, la obesidad, los trastornos por sobrecarga, la disminución de las hormonas sexuales, los sobreesfuerzos físicos en deportistas, las lesiones o traumatismos, la actividad laboral y la baja densidad mineral ósea.

55 La artrosis es una enfermedad que no tiene un tratamiento definitivo. Existe una gran necesidad de desarrollo de agentes modificadores de la enfermedad para mejorar la calidad de vida de los afectados, así como reducir los gastos sanitarios que comporta (N. Schmitz *et al.*, *Curr. Drug Targets* 11 (5), 521-527 (2010)).

60 La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una masa ósea baja y un deterioro estructural del tejido óseo, lo cual conlleva a un aumento en la fragilidad del hueso y a un mayor riesgo de fracturas y microfracturas. Las más comunes se localizan en la cadera, columna vertebral y muñeca. Es una enfermedad que a menudo se desarrolla de manera asintomática, por lo que no se detecta hasta que se produce una fractura.

Los huesos realizan un recambio metabólico constantemente mediante una combinación de formación ósea por osteoblastos y de resorción ósea por osteoclastos. La alteración del metabolismo óseo puede estar caracterizada por un desequilibrio entre la formación y la resorción ósea. A partir de los 40 años comienza un proceso de pérdida

de masa ósea, en ambos sexos, que se acentúa en las mujeres menopáusicas. Con la disminución de los niveles de estrógenos la resorción ósea aumenta y produce un efecto negativo en la densidad ósea.

5 Las fracturas de cadera son un resultado serio de la osteoporosis. Estas fracturas causan un dolor crónico considerable, discapacidad y pérdida de independencia, lo cual supone un elevado coste para los servicios sanitarios.

10 Por otro lado, la osteopenia se caracteriza por una disminución de la densidad mineral ósea, que puede ser una condición precursora de la osteoporosis. Sin embargo, no cualquier persona diagnosticada con osteopenia desarrollará osteoporosis. Para diagnosticar la osteopenia y la osteoporosis se llevan a cabo medidas de la densidad mineral ósea (BMD, siglas en inglés).

15 El cartílago es un tipo de tejido conectivo flexible que reviste las articulaciones y da estructura a la nariz, los oídos, la laringe, la tráquea y otras partes del cuerpo. Es un tejido que no posee vasos sanguíneos, nervios, ni vasos linfáticos. Los peces cartilaginosos, también llamados elasmobranchios, tales como los tiburones y las rayas, tienen un esqueleto de cartílago.

20 Se han descrito tres tipos de tejido cartilaginoso, el cartílago hialino, el fibroso y el elástico. El cartílago hialino es el más importante del cuerpo, encontrándose en la nariz, la laringe, la tráquea, los bronquios, los arcos costales y los extremos articulares de los huesos.

25 El cartílago está constituido por 70%-80% de agua. Las principales sustancias que forman adicionalmente el cartílago son: los condrocitos, el colágeno, los proteoglicanos y el ácido hialurónico. Los proteoglicanos contienen, mayoritariamente, sulfato de condroitina y sulfato de queratano (D.W. Fawcett, 1995, Tratado de Histología, Ed. Interamericana McGraw-Hill, 12ª Edición, Madrid; D.W. Fawcett, 1986, Textbook of Histology, Ed. Chapman and Hall, 12<sup>th</sup> Edition, New York, London; T. Aigner *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1569-1593 (2003)).

30 El colágeno es una proteína estructural compleja. Existen varios tipos de colágeno. En el cartílago, el colágeno más abundante es el de tipo II. Todos los colágenos están formados por tres cadenas polipeptídicas, las cuales se enrollan y se fijan mediante enlaces transversales para formar una triple hélice.

35 Los glicosaminoglicanos (GAG) son biomoléculas poliméricas de elevado peso molecular que consisten en una estructura dimérica repetida. Se encuentran fundamentalmente en los organismos vivos, donde desarrollan diferentes funciones fisiológicas. El glicosaminoglicano mayoritario en el cartílago es el sulfato de condroitina que tiene una estructura polimérica caracterizada por un disacárido que se repite, constituido por *N*-acetil-D-galactosamina y ácido D-glucurónico. La mayoría de los residuos de *N*-acetil-D-galactosamina están sulfatados. El sulfato de condroitina es un componente fundamental de los proteoglicanos del cartílago.

40 Otro glicosaminoglicano que se encuentra en el cartílago es el ácido hialurónico. Es un glicosaminoglicano no sulfatado, con una estructura polimérica caracterizada por un disacárido que se repite, constituido por los monosacáridos *N*-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico.

45 Los factores de crecimiento son sustancias, la mayoría de naturaleza proteica, que desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. Son capaces de estimular el crecimiento y diferenciación celular, regulando de esta manera una gran variedad de procesos celulares. En el cuerpo humano desempeñan su función a muy baja concentración, del orden de los picogramos.

50 Se ha descrito la utilización de preparaciones de colágeno para la liberación controlada de sustancias activas en una herida (US 6,761,908).

55 EP 154447 describe una composición para la curación de heridas que consiste en una suspensión acuosa de colágeno y un glicosaminoglicano. Mientras que las composiciones colágeno-heparina y colágeno-alginato presentan buena actividad, el inventor resalta que las preparaciones colágeno-sulfato de condroitina y colágeno-hialuronato son menos útiles en el tratamiento de heridas.

En la bibliografía encontramos descritos algunos procedimientos de obtención de preparados de cartílago, pero que difieren del procedimiento empleado en la presente invención y, por lo tanto, dan lugar a productos de cartílago también diferentes:

60 En US 5,503,990 se describe un procedimiento para preparar un cartílago de tráquea bovina finamente dividido, con un tamaño uniforme. En este procedimiento se utiliza el tratamiento enzimático para eliminar la proteína no deseada. El cartílago que se obtiene es poco soluble en agua.

65 En US 3,400,199 se describe un procedimiento de preparación de un polvo de cartílago para tratar heridas, con un tamaño de partícula inferior a 40 micras y con un tamaño medio de partícula comprendido entre 5 y 10 micras. En

este procedimiento se utiliza un tratamiento enzimático con ácido-pepsina durante sólo seis horas, con el objetivo de eliminar el tejido adherido al cartílago. El polvo de cartílago que se obtiene es poco soluble en agua.

A la vista de lo anterior, es de gran interés encontrar un procedimiento de preparación de un nuevo producto de cartílago que contenga factores de crecimiento de origen natural, a concentraciones que no superen las fisiológicas, que sea soluble en agua y que pueda ser útil en el tratamiento o prevención de heridas, de las señales de envejecimiento de la piel, de la psoriasis, de la artrosis, de la periodontitis, de la atrofia muscular o de la osteoporosis.

### **Explicación de la invención**

Los presentes inventores han encontrado que, sorprendentemente, el procedimiento de la presente invención permite obtener un producto de cartílago que contiene factores de crecimiento de origen natural, a concentraciones que no superan las fisiológicas, que es soluble en agua, que está libre de solventes orgánicos, que no contiene sodio inorgánico añadido y que contiene una elevada cantidad de hidrolizado de proteína con un grado de hidrólisis comprendido entre 0,5% y 3,0% y de sulfato de condroitina.

Además, el producto de cartílago presenta un importante efecto inductor de la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos, un efecto inductor de la migración de fibroblastos dérmicos humanos, un efecto inductor de la producción de ácido hialurónico en fibroblastos dérmicos humanos, lo cual se traduce en una acción hidratante, un efecto inductor de la elasticidad de la piel, un efecto inhibidor de la actividad metaloproteasa y un efecto inhibidor de la atrofia muscular. Además, el producto de cartílago no presenta toxicidad celular, es estable, mejora la calidad de cicatrización de heridas, es eficaz en el tratamiento de la psoriasis, inhibiendo los niveles de IL-17, reduce la degradación del cartílago, incrementa el volumen de hueso, incrementa el número trabecular e incrementa la densidad de la superficie ósea. Por ello, el producto de cartílago de la presente invención puede ser utilizado en el tratamiento de heridas y/o úlceras y/o quemaduras, para tratar, retardar o prevenir las señales de envejecimiento de la piel y en el tratamiento o prevención de la psoriasis, de la artrosis o de la osteoporosis.

Así pues, la presente invención describe un procedimiento para preparar un producto de cartílago que comprende las siguientes etapas:

- a) picar el cartílago;
- b) mezclar el cartílago picado y agua;
- c) calentar la mezcla de la etapa b) a una temperatura entre 45 °C y 55 °C;
- d) añadir una solución acuosa de  $H_3PO_4$  para ajustar el pH de la mezcla de la etapa c) a un valor comprendido entre 3,0 y 3,5;
- e) tratar la mezcla ácida de la etapa d) con una cantidad de pepsina en peso respecto al peso del cartílago de la etapa a) comprendida entre 0,6% y 1,0 %, durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 30 horas, de modo que se obtiene una solución;
- f) neutralizar la solución de la etapa e) con  $Ca(OH)_2$ , y
- g) filtrar la solución de la etapa f) que contiene sales insolubles, de modo que se obtiene una solución acuosa del producto de cartílago, en el que el producto de cartílago comprende un hidrolizado de proteína con un grado de hidrólisis comprendido entre 0,5% y 3,0%, al menos un glicosaminoglicano y al menos un factor de crecimiento.

Preferentemente, el grado de hidrólisis es 1,7%.

En una realización preferida, el procedimiento comprende una etapa adicional después de la etapa g), en la cual se obtiene un producto de cartílago sólido a partir de la solución acuosa de la etapa g). Preferentemente, el producto de cartílago sólido se obtiene por atomización.

En otra realización igualmente preferida, en la etapa e) la cantidad de pepsina en peso respecto al peso del cartílago de la etapa a) está comprendida entre 0,7% y 0,8%, en la etapa e) el periodo de tiempo está comprendido entre 20 y 28 horas y en la etapa c) la temperatura es 50 °C. Más preferentemente, en la etapa e) la cantidad de pepsina en peso respecto al peso del cartílago de la etapa a) es 0,75% y el tiempo es 24 horas.

En otra realización igualmente preferida, la etapa f) de neutralización se lleva a cabo después de (i) calentar la solución de la etapa e) durante una hora a una temperatura comprendida entre 75 °C y 90 °C, como por ejemplo de 80 °C; (ii) filtrar, y (iii) decolorar.

La decoloración se puede llevar a cabo con carbón activo, a una temperatura de, por ejemplo, 50 °C, y durante un tiempo de, por ejemplo, 30 minutos.

En otra realización igualmente preferida, el procedimiento comprende una etapa adicional antes de la etapa a), en la cual el cartílago se somete a una limpieza mecánica para eliminar grasa y tejidos no cartilagosos.

En otra realización igualmente preferida, en la etapa e) la pepsina se agrega de modo fraccionado, con ajustes del pH. Por ejemplo, la cantidad total de pepsina se puede dividir en dos o tres fracciones, y el pH se puede comprobar y, si es necesario, ajustar cada hora o cada 30 minutos.

5 Preferentemente, la pepsina tiene una actividad 1:3000 FCC, siendo FCC la abreviatura de "Food Chemical Codex". Por ejemplo, se puede emplear la pepsina de Biocatalysts, 1:3000 MDP.

En otra realización igualmente preferida, el producto de cartílago además comprende al menos una proteína de la familia de las serpinas.

10 En la presente invención, el término "picar el cartílago" se refiere a reducir el tamaño de las piezas de cartílago hasta, por ejemplo, un tamaño comprendido entre 2 mm y 30 mm.

15 Preferentemente, el cartílago es cartílago de tráquea de mamífero, de esternón de ave o de pez elasmobranquio. La tráquea de mamífero se selecciona entre tráquea porcina, bovina o de camello. El pez elasmobranquio se selecciona entre el tiburón y la raya. Más preferentemente, el cartílago es cartílago de tráquea porcina.

La presente invención también se refiere a un producto de cartílago obtenible por el procedimiento definido anteriormente.

20 Preferentemente, el glicosaminoglicano se selecciona de entre el grupo que consiste en sulfato de condroitina, ácido hialurónico, sulfato de queratano y mezclas de los mismos, y el factor de crecimiento se selecciona de entre el grupo que consiste en TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 y mezclas de los mismos.

25 El sulfato de condroitina tiene una estructura polimérica caracterizada por un disacárido que se repite, constituido por *N*-acetil-D-galactosamina y ácido D-glucurónico. El sulfato de condroitina que procede del tejido cartilaginoso se encuentra principalmente en dos formas isoméricas, que difieren en la posición del grupo sulfato presente en el residuo de *N*-acetilgalactosamina, el 4-sulfato de condroitina (sulfato de condroitina A) y el 6-sulfato de condroitina (sulfato de condroitina C).

30 El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfatado, de peso molecular comprendido entre 100.000 daltons y 3.000.000 daltons. Su estructura polimérica se caracteriza por un disacárido que se repite, constituido por *N*-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico.

35 El sulfato de queratano que procede del tejido cartilaginoso tiene una estructura polimérica caracterizada por un disacárido repetitivo, constituido por D-galactosa y *N*-acetil-D-glucosamina. Los grupos sulfato están incorporados principalmente en las posiciones C6 de los residuos de *N*-acetil-D-glucosamina y/o en las posiciones C6 de los residuos de D-galactosa.

40 Los factores de crecimiento están presentes en el producto de cartílago de la presente invención a muy baja concentración, del orden de picogramos por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro.

Así pues, el procedimiento de la presente invención permite obtener un producto de cartílago con una concentración de factores de crecimiento no superior a la fisiológica.

45 Para la determinación de los factores de crecimiento del producto de cartílago de la presente invención, se pueden utilizar kits de ELISA (R&D Systems), siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante.

En una realización preferida, el producto de cartílago comprende:

- 50
- a) entre 67% y 87% en peso de hidrolizado de proteína con un grado de hidrólisis comprendido entre 0,5% y 3,0%, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;
  - b) entre 15% y 25% en peso de sulfato de condroitina, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;
  - c) entre 0,1% y 1,0% en peso de ácido hialurónico, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;
  - 55 d) entre 20 pg y 200 pg de TGF- $\beta$ 1 por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro, y
  - e) entre 20 pg y 200 pg de TGF- $\beta$ 3 por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro.

Por ejemplo, el producto de cartílago comprende:

- 60
- a) 77% en peso de hidrolizado de proteína con un grado de hidrólisis del 1,7%, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;
  - b) 19,7% en peso de sulfato de condroitina, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;
  - c) 0,3% en peso de ácido hialurónico, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;
  - d) 53,0 pg de TGF- $\beta$ 1 por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro, y
  - 65 e) 31,3 pg de TGF- $\beta$ 3 por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro.

El hidrolizado de proteína está constituido mayoritariamente por hidrolizado de colágeno con un grado de hidrólisis inferior al 3,0%.

5 En otra realización igualmente preferida, el producto de cartílago comprende entre 45% y 65% en peso de hidrolizado de colágeno con un grado de hidrólisis inferior al 3,0%, respecto al peso del producto de cartílago anhidro. Por ejemplo, el producto de cartílago comprende 54,9% en peso de hidrolizado de colágeno con un grado de hidrólisis inferior al 3,0%, respecto al peso del producto de cartílago anhidro. Preferentemente, el colágeno hidrolizado presenta un grado de hidrólisis de, por ejemplo, 0,1%, 0,2%, 1,0% ó 2,0%. Más preferentemente de 0,1%. También preferentemente, el hidrolizado de colágeno es hidrolizado de colágeno tipo II.

10 En otra realización igualmente preferida, el producto de cartílago presenta los siguientes parámetros analíticos:

Grado de hidrólisis de la proteína: comprendido entre 0,5% y 3,0%;  
 Grado de hidrólisis del hidrolizado de colágeno: menos del 3%;  
 15 Hidrolizado de proteína: entre el 67% y el 87% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Hidrolizado de colágeno: entre el 45% y 65% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Sulfato de condroitina: entre el 15% y el 25% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Ácido hialurónico: entre 0,1 y 1,0% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Factor de crecimiento TGF-β1: entre 20 pg y 200 pg por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro;  
 20 Factor de crecimiento TGF-β3: entre 20 pg y 200 pg por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro.

En otra realización igualmente preferida, el producto de cartílago presenta los siguientes parámetros analíticos:

25 Grado de hidrólisis de la proteína: 1,7%;  
 Grado de hidrólisis del hidrolizado de colágeno: 0,1%;  
 Hidrolizado de proteína: 77% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Hidrolizado de colágeno: 54,9% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Aminoácidos totales: 70,7% en peso, respecto al peso del producto de cartílago;  
 Aminoácidos libres: 1,2% en peso, respecto al peso del producto de cartílago;  
 30 Sulfato de condroitina: 19,7% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Acido hialurónico: 0,3% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Factor de crecimiento TGF-β1: 53,0 pg por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro;  
 Factor de crecimiento TGF-β3: 31,3 pg por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro;  
 Calcio: 0,4% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 35 Fosfatos: 0,3% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro.

La presente invención también se refiere a un producto de cartílago caracterizado por los siguientes parámetros analíticos:

40 Grado de hidrólisis de la proteína: comprendido entre 0,5% y 3,0%;  
 Grado de hidrólisis del hidrolizado de colágeno: inferior al 3%;  
 Hidrolizado de proteína: entre 67% y 87% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Hidrolizado de colágeno: entre 45% y 65% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Sulfato de condroitina: entre 15% y 25% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 45 Acido hialurónico: entre 0,1% y 1,0% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Factor de crecimiento TGF-β1: entre 20 pg y 200 pg por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro;  
 Factor de crecimiento TGF-β3: entre 20 pg y 200 pg por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro.

50 La presente invención también se refiere a un complemento alimenticio que comprende el producto de cartílago definido anteriormente, y al menos un excipiente nutricional. Igualmente, la presente invención se refiere a un alimento funcional que comprende el producto de cartílago definido anteriormente, y al menos un excipiente nutricional.

55 La presente invención también se refiere a una composición cosmética que comprende el producto de cartílago, definido anteriormente, y al menos un excipiente cosméticamente aceptable.

Igualmente, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el producto de cartílago, definido anteriormente, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 En otra realización preferida, el complemento alimenticio, el alimento funcional o la composición farmacéutica comprende además una sal de calcio, y, opcionalmente, una vitamina D y/o una vitamina K.

La sal de calcio puede ser carbonato de calcio, fosfato de calcio, lactato de calcio, glicerofosfato de calcio, lactogluconato de calcio o hidroxapatita. Preferentemente es hidroxapatita.

65 La vitamina D más preferida es vitamina D3.

La vitamina K puede ser vitamina K1 ó vitamina K2. Preferentemente es vitamina K2.

En otra realización preferida, el complemento alimenticio, el alimento funcional o la composición farmacéutica comprende además una sal de magnesio.

5

La presente invención también se refiere a un producto de cartílago, definido anteriormente, para su uso como medicamento.

10

Igualmente, la presente invención también se refiere a un producto de cartílago, definido anteriormente, para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad mediado por una metaloproteasa, en el que el trastorno o enfermedad se selecciona de una herida, de una úlcera, de una quemadura, de la psoriasis, de la artrosis, de la sinovitis, de la osteoporosis, de la osteopenia, de una fractura ósea, de una enfermedad o lesión de un tendón, de una enfermedad o lesión de un ligamento, de una enfermedad periodontal, de las señales de envejecimiento de la piel o de una afección muscular.

15

Igualmente, la presente invención también se refiere a un producto de cartílago, definido anteriormente, para su uso en el tratamiento o prevención de una herida, de una úlcera, de una quemadura, de la psoriasis, de la artrosis, de la sinovitis, de la osteoporosis, de la osteopenia, de una fractura ósea, de una enfermedad o lesión de un tendón, de una enfermedad o lesión de un ligamento, de una enfermedad periodontal, de las señales de envejecimiento de la piel, de una afección muscular o los efectos dañinos de la exposición a la radiación ultravioleta.

20

Preferentemente, la enfermedad periodontal es periodontitis.

25

Preferentemente, la afección muscular se selecciona de entre el grupo que consiste en agujetas, desgarró muscular, desgaste muscular, debilidad muscular, sarcopenia, atrofia muscular y fatiga muscular, más preferentemente atrofia muscular.

30

Igualmente, la presente invención también se refiere a un complemento alimenticio o a un alimento funcional, definido anteriormente, para su uso en prevenir la formación de una herida o de una úlcera, en mejorar la calidad de cicatrización de una herida, de una úlcera o de una quemadura, en prevenir o revertir una lesión psoriásica, en prevenir la artrosis, en nutrir la articulación, en prevenir, estabilizar o reparar una lesión o un defecto de cartílago, de la membrana sinovial o del hueso subcondral, en aumentar la movilidad articular, en reducir la sinovitis, en prevenir la osteoporosis o la osteopenia, en aumentar la densidad de masa ósea, en reparar fracturas óseas, en aumentar la absorción de calcio, en prevenir o reparar una lesión de un tendón o de un ligamento, en prevenir o revertir una afección periodontal o una afección muscular, en retrasar, disminuir o prevenir las señales de envejecimiento de la piel o como condroprotector.

35

La presente invención también se refiere al uso de un producto de cartílago, definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una herida, de una úlcera, de una quemadura, de la psoriasis, de la artrosis, de la sinovitis, de la osteoporosis, de la osteopenia, de una fractura ósea, de una enfermedad o lesión de un tendón, de una enfermedad o lesión de un ligamento, de una enfermedad periodontal, de una afección muscular o los efectos dañinos de la exposición a la radiación ultravioleta, más preferentemente, de una herida, de una úlcera, de la artrosis o de la osteoporosis.

40

En otra realización preferida, el tratamiento o prevención de la artrosis y de la osteoporosis es simultáneo.

45

La presente invención también se refiere al uso de una composición cosmética, definida anteriormente, para tratar, retrasar, disminuir o prevenir las señales de envejecimiento de la piel o las estrías.

50

La presente invención también se refiere al uso de un producto de cartílago, definido anteriormente, para la preparación de un complemento alimenticio o de un alimento funcional para prevenir la formación de una herida o de una úlcera, mejorar la calidad de cicatrización de una herida, de una úlcera o de una quemadura, prevenir o revertir una lesión psoriásica, prevenir la artrosis, nutrir la articulación, prevenir, estabilizar o reparar una lesión o un defecto de cartílago, de la membrana sinovial o del hueso subcondral, aumentar la movilidad articular, reducir la sinovitis, prevenir la osteoporosis o la osteopenia, aumentar la densidad de masa ósea, reparar fracturas óseas, aumentar la absorción de calcio, prevenir o reparar una lesión de un tendón o de un ligamento, prevenir o revertir una afección periodontal o una afección muscular, retrasar, disminuir o prevenir las señales de envejecimiento de la piel o como condroprotector.

55

Debido a que el procedimiento de preparación del producto de cartílago incluye una digestión enzimática, y la materia prima es de origen animal, las características analíticas del producto de cartílago obtenido pueden variar ligeramente dependiendo del lote de producción.

60

La proteína contenida en el producto de cartílago de la presente invención presenta un grado de hidrólisis comprendido entre 0,5% y 3,0%, como por ejemplo 1,7%.

65

En procedimientos descritos en la bibliografía, se obtienen productos de cartílago con grados de hidrólisis de proteína inferiores a los de la presente invención o bien muy superiores.

5 El grado de hidrólisis de la proteína se puede determinar mediante un método estándar, expresándose como el porcentaje de aminoácidos libres con relación a los aminoácidos totales.

El grado de hidrólisis del hidrolizado de colágeno se puede determinar mediante un método estándar, expresándose como el porcentaje de hidroxiprolina libre con relación con la hidroxiprolina total.

10 En los procedimientos de preparación de productos de cartílago descritos en la bibliografía, es usual incluir una etapa en la cual el producto se trata con un solvente orgánico, tal como acetona o hexano, para eliminar la grasa (ver US 3,400,199 y US 5,503,990),

15 El procedimiento de la invención presenta la ventaja de no utilizar solventes orgánicos, lo cual permite obtener un producto de cartílago sin trazas de dichos solventes.

En los procedimientos de la bibliografía en los que se obtiene un producto de cartílago parcialmente soluble en agua, durante el procedimiento de lavado se pierde una parte de hidrolizado de proteína y de glicosaminoglicanos.

20 En el procedimiento de la presente invención, las condiciones de digestión enzimática de la etapa e), permiten, por un lado, obtener un producto de cartílago con factores de crecimiento de origen natural, y por otro lado, obtener una solución acuosa del producto de cartílago, evitando que se produzcan pérdidas de hidrolizado de proteína, de glicosaminoglicanos y de factores de crecimiento.

25 Los presentes inventores han encontrado que las siguientes variables: tipo de enzima, concentración de enzima, temperatura, valor de pH, tiempo de digestión enzimática, tipo de solvente, tipo de ácido y tipo de base, son clave para la obtención de un determinado producto de cartílago.

30 En la presente invención se ha encontrado que utilizando pepsina para la digestión enzimática, en una cantidad en peso, respecto al peso de cartílago inicial, comprendida entre 0,6% y 1,0%, durante un tiempo comprendido entre 10 y 30 horas, a una temperatura entre 45 °C y 55 °C, y a un pH comprendido entre 3,0 y 3,5, y empleando en el procedimiento H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> como ácido, Ca(OH)<sub>2</sub> como base y agua como solvente, se obtiene un nuevo producto de cartílago que presenta las siguientes ventajas: (i) contiene factores de crecimiento de origen natural, a una concentración no superior a la fisiológica, (ii) es totalmente soluble en agua, (iii) está libre de solventes orgánicos, (iv) no contiene sodio inorgánico añadido, (v) contiene una elevada cantidad de hidrolizado de proteína con un grado de hidrólisis comprendido entre 0,5% y 3,0%, (vi) contiene una elevada cantidad de sulfato de condroitina, (vii) no es tóxico, (viii) es estable, (ix) induce la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos, (x) induce la migración de fibroblastos dérmicos humanos, (xi) induce la producción de ácido hialurónico en fibroblastos dérmicos humanos, lo cual se traduce en una acción hidratante, (xii) induce la producción de elastina, (xiii) presenta un efecto inhibitorio de la actividad metaloproteasa, (xiv) mejora la calidad de cicatrización de heridas, (xv) inhibe la atrofia muscular, (xvi) es eficaz en el tratamiento de la psoriasis, inhibiendo los niveles de IL-17, (xvii) reduce la degradación del cartílago, (xviii) incrementa el volumen de hueso, (xix) incrementa el número trabecular y (xx) incrementa la densidad de la superficie ósea.

45 Además, el producto de cartílago de la presente invención no contiene colágeno nativo.

50 Los inventores de la presente invención han encontrado que cuando cambian las condiciones del procedimiento de preparación, el producto de cartílago que se obtiene es distinto del obtenido según el procedimiento de la presente invención. Así, cuando se utiliza 0,35% de pepsina y se lleva a cabo la digestión durante sólo seis horas, se obtiene un producto de cartílago en el que no se detectan aminoácidos libres, por lo que el grado de hidrólisis se puede considerar que es inapreciable. Por otro lado, cuando se sigue el mismo procedimiento de la presente invención, pero se emplea 10% de pepsina, el producto de cartílago que se obtiene presenta un mayor grado de hidrólisis de la proteína, más en concreto un 5,2%, en lugar del grado de hidrólisis de entre 0,5% y 3,0% que presenta el producto de cartílago de la presente invención.

55 En la presente invención se han utilizado las siguientes abreviaturas:

TGF-β1, para el factor de crecimiento transformante beta 1

TGF-β3, para el factor de crecimiento transformante beta 3

BV, para el volumen de hueso (mm<sup>3</sup>)

60 BS, para la superficie de hueso (mm<sup>2</sup>)

TV, para el volumen total (mm<sup>3</sup>)

Tb.Th, para la densidad trabecular (mm)

BV/TV(%), para volumen de hueso/volumen total de tejido= % de volumen de hueso.

BS/TV, para superficie de hueso/volumen total de tejido = densidad de la superficie de hueso (mm<sup>-1</sup>).

65 Tb.N, para número trabecular (mm<sup>-1</sup>); (Tb.N=BV/TVxTb.Th).

En la presente invención, cuando se habla de señales de envejecimiento de la piel se hace referencia, principalmente, a las arrugas, las líneas de expresión, la flacidez, la sequedad de la piel y la falta de vitalidad.

5 Para utilizar el producto de cartílago de la presente invención en el tratamiento o prevención de una herida, de una úlcera, de una quemadura, de la psoriasis, de la artrosis, de la sinovitis, de la osteoporosis, de la osteopenia, de una fractura ósea, de una enfermedad o lesión de un tendón, de una enfermedad o lesión de un ligamento, de una enfermedad periodontal, de las señales de envejecimiento de la piel o de una afección muscular, se formula en composiciones farmacéuticas adecuadas, recurriendo a técnicas y excipientes o vehículos convencionales, como los descritos en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2000, edited by Lippincott Williams and Wilkins, 20th edition, Philadelphia*. Las composiciones farmacéuticas comprenden el producto de cartílago y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para la administración al paciente. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente en dosis requeridas. La administración de las composiciones farmacéuticas puede efectuarse por diferentes vías, por ejemplo, tópica, oral, intravenosa, intralesional, perilesional, intratendinosa, peritendinosa, subcutánea, intramuscular, sublingual, transdérmica o intranasal. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz del producto de cartílago, dependiendo dicha cantidad de muchos factores, como por ejemplo, el estado físico del paciente, edad, sexo, vía de administración, frecuencia de administración o gravedad de la enfermedad. Además, se entenderá que dicha dosificación de producto de cartílago puede administrarse en unidades de dosis única o múltiple para proporcionar los efectos terapéuticos deseados.

20 Las preparaciones farmacéuticas de la invención generalmente estarán en forma sólida, líquida o como gel. Entre las preparaciones farmacéuticas en forma sólida que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención se incluyen polvos, minigránulos (pellets), microesferas, nanopartículas, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, sellos y supositorios. Entre las preparaciones en forma líquida se incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Se contemplan también las preparaciones de formas sólidas que se desean convertir, inmediatamente antes de ser utilizadas, en preparaciones en forma líquida. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

30 Preferentemente, las preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de heridas o úlceras por vía tópica estarán en forma de gel, polvos o en cualquier forma que presente una alta viscosidad para retener la composición farmacéutica en la herida. Una vez depositada la composición farmacéutica en la herida, ésta puede taparse con una gasa estéril y/o un vendaje. También se pueden preparar apósitos o parches que contengan el producto de cartílago y un soporte sólido, o bien membranas impregnadas con el producto de cartílago.

35 Para utilizar el producto de cartílago de la presente invención en el campo de la ingeniería de tejidos óseos o cartilaginosos, por ejemplo en el tratamiento de un defecto o lesión de hueso o de cartílago, se contempla preparar hidrogeles, cementos inyectables o matrices tridimensionales (scaffolds) que contengan el producto de cartílago. Las matrices tridimensionales se pueden preparar con el propio producto de cartílago o con un material biodegradable, como por ejemplo ácido poliglicólico, ácido poliláctico, celulosa, gelatina, colágeno, colágeno-hidroxiapatita, hidroxapatita, pectina, alginato, dextrano, ácido hialurónico o derivados de los mismos. También se pueden utilizar matrices constituidas por materiales no biodegradables tales como teflón, poliestireno, poliácrlato o polivinilo. La matriz puede ser flexible o rígida. La estructura tipo esponja también puede utilizarse.

45 Para preparar tanto un complemento alimenticio como un alimento funcional, el producto de cartílago se formula con componentes y/o excipientes adecuados empleados en nutrición. El complemento alimenticio puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones o sobres. El alimento funcional puede estar en forma de yogures, leche, leche fermentada, jugos de frutas, jugos de vegetales, sopas, alimentos deshidratados, galletas o alimentos infantiles.

50 Cuando se utiliza el producto de cartílago de la presente invención para tratar, retrasar, disminuir o prevenir las señales de envejecimiento de la piel, las estrías o los efectos dañinos de la exposición a la radiación ultravioleta o de la polución, se formula en composiciones cosméticas adecuadas, recurriendo a técnicas y a excipientes o vehículos de uso conocido en cosmética y dermatología. La composición cosmética puede contener además del producto de cartílago de la presente invención, cualquier extracto vegetal, por ejemplo, y sin ser limitativo, extracto de algas, de romero o de frutas, y uno o varios excipientes y aditivos de uso conocido en las composiciones cosméticas y dermatológicas, tales como, por ejemplo, y sin ser limitativo, perfumes, suavizantes, colorantes, tensioactivos, vitaminas, conservantes, emulsionantes, emolientes, aceites, filtros UV, glicoles, etc... Las composiciones cosméticas de la presente invención se pueden presentar bajo cualquier forma conocida por un experto en cosmética y dermatología, por ejemplo, en forma de crema, aceite, emulsión, microemulsión, pomada, gel, espuma, pasta, loción, cataplasma, spray o leche. Dichas composiciones cosméticas se pueden aplicar sobre el rostro, cuerpo o cabello.

### **Breve descripción de las Figuras**

65 En la Figura 1 se representa a tres concentraciones (50 µg/ml, 500 µg/ml y 2 mg/ml) el efecto del producto de cartílago sobre el porcentaje de proliferación de fibroblastos dérmicos humanos a 48 horas. También se incluyen el

Control Positivo (cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en medio 10% FCS, en ausencia del producto de cartílago y en presencia de bromodeoxiuridina) y el Control Basal (cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en medio de cultivo y en ausencia del producto de cartílago).

5 En la Figura 2 se representa a tres concentraciones (250 µg/ml, 500 µg/ml y 2 mg/ml) el efecto del producto de cartílago sobre el porcentaje de migración de fibroblastos dérmicos humanos a las 48 horas. También se incluyen el Control Basal (cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en medio de cultivo y en ausencia del producto de cartílago) y dos Controles Positivos (un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en medio de cultivo al 10% FCS y en ausencia del producto de cartílago y un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en ausencia del producto de cartílago y en presencia de EGF).

15 En la Figura 3 se representa a tres concentraciones (250 µg/ml, 500 µg/ml y 2 mg/ml) el efecto del producto de cartílago sobre el porcentaje de síntesis de elastina en un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos a las 72 horas de exposición. También se incluyen el Control Basal (cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en medio de cultivo y en ausencia del producto de cartílago) y el Control Positivo (cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en ausencia del producto de cartílago y en presencia de TGF-β).

20 En la Figura 4 se representa a tres concentraciones (250 µg/ml, 500 µg/ml y 2 mg/ml) el efecto del producto de cartílago sobre la actividad de la metaloproteasa 1 (MMP-1) en un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos estimulados con IL-1β. También se incluyen el Control Basal (cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en medio de cultivo y en ausencia del producto de cartílago y de IL-1β), el Control estimulado con IL-1β y el Control Positivo de inhibición (cultivo de fibroblastos dérmicos humanos en ausencia del producto de cartílago y en presencia de IL-1β y de dexametasona).

25 En la Figura 5 se representa el efecto de dos composiciones a base de producto de cartílago, hidroxiapatita y vitamina D3, a dosis baja (Composición 1 D.B.) y a dosis alta (Composición 2 D.A.) sobre la degradación del cartílago, utilizando la escala de puntuación OARSI. También se incluyen el Blanco (grupo de ratas sin inducción de osteoporosis ni de artrosis), Control 1 (Grupo de ratas con inducción de osteoporosis y artrosis. Este fue el grupo Control para el tratamiento del compuesto de Referencia), Control 2 (Grupo de ratas con inducción de osteoporosis y artrosis. Este fue el grupo Control para el tratamiento con las composiciones a base del producto de cartílago) y el Compuesto OHC (producto de Referencia).

35 En la Figura 6 se representa el efecto de dos composiciones a base de producto de cartílago, hidroxiapatita y vitamina D3, a dosis baja (Composición 1 D.B.) y a dosis alta (Composición 2 D.A.) sobre el volumen de hueso (BV/TV %). También se incluyen el Blanco (grupo de ratas sin inducción de osteoporosis ni de artrosis), Control 1 (Grupo de ratas con inducción de osteoporosis y artrosis. Este fue el grupo Control para el tratamiento del compuesto de Referencia), Control 2 (Grupo de ratas con inducción de osteoporosis y artrosis. Este fue el grupo Control para el tratamiento con las composiciones a base del producto de cartílago) y el Compuesto OHC (producto de Referencia).

40 En la Figura 7 se representa el efecto de dos composiciones a base de producto de cartílago, hidroxiapatita y vitamina D3, a dosis baja (Composición 1 D.B.) y a dosis alta (Composición 2 D.A.) sobre la densidad de la superficie del hueso (BS/TV (mm<sup>-1</sup>)). También se incluyen el Blanco (grupo de ratas sin inducción de osteoporosis ni de artrosis), Control 1 (Grupo de ratas con inducción de osteoporosis y artrosis. Este fue el grupo Control para el tratamiento del compuesto de Referencia), Control 2 (Grupo de ratas con inducción de osteoporosis y artrosis. Este fue el grupo Control para el tratamiento con las composiciones a base del producto de cartílago) y el Compuesto OHC (producto de Referencia).

50 En la Figura 8 se representa el efecto de dos composiciones a base de producto de cartílago, hidroxiapatita y vitamina D3, a dosis baja (Composición 1 D.B.) y a dosis alta (Composición 2 D.A.) sobre el número trabecular (TbxN (mm<sup>-1</sup>)). También se incluyen el Blanco (grupo de ratas sin inducción de osteoporosis ni de artrosis), Control 1 (Grupo de ratas con inducción de osteoporosis y artrosis. Este fue el grupo Control para el tratamiento del compuesto de Referencia), Control 2 (Grupo de ratas con inducción de osteoporosis y artrosis. Este fue el grupo Control para el tratamiento con las composiciones a base del producto de cartílago) y el Compuesto OHC (producto de Referencia).

### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

#### **Ejemplos**

60 Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no representan una limitación del alcance de la presente invención.

#### **Ejemplo 1: Preparación de un producto de cartílago de tráquea porcina de la invención**

65

Piezas de tráquea porcina se sometieron a una limpieza mecánica para eliminar grasa y tejidos no cartilagosos y a continuación se picaron. En un reactor se introdujeron 3.100 ml de agua desionizada. Se añadieron 1.575 g de cartílago de tráquea porcina picado. La mezcla se calentó a 50 °C y se ajustó el pH entre 3,0 y 3,5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Una vez ajustado el pH, se añadieron 5,9 g de pepsina (Biocatalysts, 1:3000 MDP) y se mantuvo la temperatura a 50 °C. Se comprobó el pH cada 30 minutos, las tres horas siguientes, y se ajustó en caso que fuese necesario. A las diez horas del inicio de la digestión se volvieron a añadir 5,9 g de pepsina (Biocatalysts, 1:3000 MDP) y se comprobó el pH cada 30 minutos, durante las tres horas siguientes. En total, la digestión se llevó a cabo durante 24 horas, empleándose en total una cantidad de pepsina en peso respecto al peso del cartílago de tráquea porcina del 0,75%. Transcurridas las 24 horas, se calentó a 80 °C durante una hora. A continuación, se filtró para clarificar el producto. Una vez filtrado, se añadieron 7,9 g de carbón activo y se calentó a 50 °C durante 30 minutos. Se neutralizó con hidróxido de calcio. A continuación, se filtró, obteniéndose una solución acuosa de producto de cartílago. El producto final en forma sólida (polvo color crema) se obtuvo atomizando la solución acuosa de producto de cartílago.

Características analíticas del producto de cartílago sólido obtenido:

Hidrolizado de proteína: 77% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Hidrolizado de colágeno: 54,9% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Aminoácidos totales: 70,7% en peso, respecto al peso del producto de cartílago;  
 Aminoácidos libres: 1,2% en peso, respecto al peso del producto de cartílago;  
 Hidroxiprolina total: 6,9% en peso, respecto al peso del producto de cartílago;  
 Grado de hidrólisis de la proteína: 1,7%;  
 Grado de hidrólisis del hidrolizado de colágeno: 0,1%;  
 Sulfato de condroitina: 19,7% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Acido hialurónico: 0,3% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Factor de crecimiento TGF-β1: 53,0 pg por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro;  
 Factor de crecimiento TGF-β3: 31,3 pg por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro;  
 Cenizas: 8,9% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 Calcio: 0,4% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro,  
 Fosfatos: 0,3% en peso, respecto al peso del producto de cartílago anhidro.

En el 77% del hidrolizado de proteína se incluye el hidrolizado de colágeno con un grado de hidrólisis inferior al 3,0%.

Las características analíticas del producto de cartílago pueden variar ligeramente dependiendo del lote del producto de cartílago obtenido.

Determinación de los grados de hidrólisis:

El grado de hidrólisis de la proteína se determinó mediante un método estándar. Se expresó como el porcentaje de aminoácidos libres con relación a los aminoácidos totales.

El grado de hidrólisis del hidrolizado de colágeno se determinó mediante un método estándar. Se expresó como el porcentaje de hidroxiprolina libre con relación con la hidroxiprolina total.

Determinación de los factores de crecimiento:

Para la determinación de los factores de crecimiento se utilizaron los siguientes kits de ELISA (R&D Systems), siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante:

Quantikine porcine TGF-β1 (catálogo: MB100B);  
 DuoSet Human TGF-β3 (catálogo: DY243).

**Ejemplo 2: Comprimidos de producto de cartílago de tráquea porcina, sal de calcio y vitamina D3**

Los comprimidos se prepararon siguiendo procedimientos convencionales. Por comprimido:

Producto de cartílago de tráquea porcina.....300 mg  
 Hidroxiapatita.....400 mg  
 Vitamina D3.....100 UI

**Ejemplo 3: Comprimidos de producto de cartílago de tráquea porcina, sal de calcio, vitamina D3 y vitamina K2**

Por comprimido:

Producto de cartílago de tráquea porcina.....300 mg

Hidroxiapatita.....	400 mg
Vitamina D3.....	100 UI
Vitamina K2.....	22,5 µg

## 5 **Biología**

### **Ejemplo 4: Actividad estimuladora de la proliferación de fibroblastos**

10 El proceso de curación o cicatrización de heridas es un proceso muy ordenado y controlado caracterizado por distintas fases: inflamación, proliferación y remodelación (R.F. Diegelmann and M.C. Evans, *Front. Biosci.* 9, 283-289 (2004)). El proceso de curación precisa de la coordinación de varias células, factores de crecimiento y citoquinas. La inflamación es la fase inicial. En el proceso de curación de heridas, la proliferación de fibroblastos interviene en la restauración de la estructura y función en la herida (R.A. Clark, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 355-367 (2001)).

15 La estimulación del grado de proliferación de fibroblastos también es interesante como tratamiento anti-edad. Con el envejecimiento se ve disminuido el número de fibroblastos dérmicos y, por tanto, se produce una pérdida progresiva de tejido dérmico.

### 20 **Materiales y métodos**

25 El grado de proliferación se cuantificó midiendo la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) en el ADN de células en proliferación, durante la fase de replicación. Para la cuantificación de la BrdU incorporada se utilizó un inmunoensayo colorimétrico mediante un anticuerpo anti-BrdU específico, detección ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) y posterior lectura de la absorbancia a 450 nm. La cantidad de BrdU detectada es proporcional al número de células que se han dividido y, por tanto, proporcional al crecimiento o proliferación experimentada por el cultivo.

30 Los fibroblastos dérmicos humanos fueron sembrados a 5.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y pasadas 24 horas se dejaron con medio de cultivo de privación de factores de crecimiento durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron tratadas a tres concentraciones (2mg/ml, 500 µg/ml y 50 µg/ml) de un producto de cartílago de la presente invención, en concreto del producto de cartílago del Ejemplo 1. La cantidad de bromodeoxiuridina se determinó mediante inmunoensayo específico (técnica ELISA) después de 48 horas de exposición del cultivo al producto de cartílago.

35 Como Control Basal se utilizó un cultivo de fibroblastos con medio de cultivo y como Control Positivo, los fibroblastos fueron expuestos a medio de cultivo 10% FCS (Fetal Calf Serum).

### 40 **Resultados**

45 Como se puede observar en la Figura 1, el producto de cartílago a las dosis de 500 µg/ml y 2 mg/ml mostró un efecto estimulador estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de la proliferación de fibroblastos, si lo comparamos con el Control Basal. Concretamente, a la dosis intermedia se incrementó la proliferación en un 35,9% y a la dosis alta un 73%.

### **Ejemplo 5: Valoración de la capacidad migratoria celular *in vitro***

50 Este estudio permite la evaluación de la capacidad de inducción de la migración celular en cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos y, por tanto, es útil para evaluar la potencial eficacia de un producto en la curación de heridas y como tratamiento anti-edad. De hecho con el envejecimiento se produce una disminución del grado de proliferación y migración de los fibroblastos.

### **Materiales y métodos**

55 Para evaluar el potencial efecto de un producto de cartílago de la presente invención sobre la migración celular se utilizó el sistema Oris™ Cell Migration assay de Platypus. Este sistema consiste en una placa especial que permite la siembra de los fibroblastos y su crecimiento en monocapa, pero dejando un área central del pocillo libre de células gracias a los denominados Oris™ Cell Seeding Stoppers que restringen la siembra a la región anular exterior del pocillo. Posteriormente se retiran los Oris™ Cell Seeding Stoppers y esta área es ocupada posteriormente por las células durante el proceso de migración.

60 Los fibroblastos dérmicos humanos fueron incubados 48 horas en presencia de un producto de cartílago de la presente invención, concretamente del producto de cartílago del Ejemplo 1 (2 mg/ml y 500 µg/ml) y a continuación se marcaron con el marcador fluorescente calceína. La fluorescencia emitida por las células en migración se midió mediante un fluorímetro. También se tomaron fotografías por microscopía de fluorescencia que permitieron ver el área ocupada en comparación con el Control Basal.

Como Control Basal se utilizó medio de cultivo y como Controles Positivos se incluyeron medio de cultivo al 10% en FCS (Fetal Calf Serum) y también medio de cultivo con EGF 5 ng (Epidermal Growth Factor).

## 5 Resultados

Como se puede observar en la Figura 2, el producto de cartílago produjo un importante efecto inductor de la migración celular a las 48 h de exposición para las concentraciones de 500 µg/ml y 2 mg/ml (42% y 75% de inducción, respectivamente). Además debe destacarse que el efecto de dicho producto superó al mostrado por los  
10 controles positivos (medio al 10% FCS y EGF a 5 ng/ml).

### **Ejemplo 6: Valoración de la acción hidratante**

El ácido hialurónico es un componente esencial de las pieles sanas y está involucrado en la hemostasis, la hidratación y los procesos de reparación. Gracias a su capacidad de retener el agua en un porcentaje equivalente a miles de veces, desarrolla una función primordial en la piel. La piel joven es rica en ácido hialurónico, sin embargo a medida que envejecemos, la distribución y función del ácido hialurónico en la piel van cambiando y aparecen los signos característicos del envejecimiento como arrugas y líneas de expresión.

## 20 Materiales y métodos

Para evaluar la eficacia inductora de la hidratación de la piel por un producto de cartílago de la presente invención, en concreto por el producto de cartílago del Ejemplo 1, se llevó a cabo un estudio para la cuantificación de glicosaminoglicanos, principalmente ácido hialurónico sintetizado por los fibroblastos dérmicos humanos tras la incubación con el producto de cartílago (2mg/ml, 500 µg/ml y 250 µg/ml) durante 24 horas. Para ello se utilizó el método de incorporación de <sup>3</sup>H-glucosamina en los glicosaminoglicanos de nueva síntesis.

La radioactividad unida se analizó en un contador de centelleo líquido. Los valores de CPMs (cuentas por minuto) obtenidos son proporcionales a la cantidad de ácido hialurónico sintetizado en un 90%.

Como Control Positivo los fibroblastos se expusieron a TGF-β1 (Transforming growth factor beta 1), conocido como inductor de la producción de proteína de la matriz extracelular. El Control Basal consistió únicamente en fibroblastos en medio de cultivo.

## 35 Resultados

El producto de cartílago mostró un leve efecto hidratante a las 24 horas de exposición a la concentración de 500 µg/ml. Concretamente, estimuló la síntesis de ácido hialurónico en un 12% si se compara con el Control Basal.

### **Ejemplo 7: Valoración de la capacidad inductora de la producción de elastina**

En la piel humana, el envejecimiento intrínseco está caracterizado por atrofia de la dermis debida a la pérdida de colágeno, a la degeneración de la malla de fibras de elastina y a la pérdida de hidratación. La elastina es la proteína que confiere las propiedades elásticas a la piel.

## 45 Materiales y métodos

La capacidad inductora de la elasticidad de la piel por parte de un producto de cartílago de la presente invención, concretamente del producto de cartílago del Ejemplo 1, fue evaluada a partir de la cuantificación de la producción de elastina en los fibroblastos.

Los fibroblastos dérmicos humanos fueron sembrados en placas de cultivo de 96 pocillos y se mantuvieron en crecimiento hasta llegar a confluencia. Seguidamente, se expusieron durante 72 horas a las concentraciones de 2 mg/ml, 500 µg/ml y 250 µg/ml. Finalizado este período de tratamiento, las células fueron lavadas y fijadas para su procesamiento ELISA. En este proceso se utilizó un anticuerpo primario contra la elastina (Monoclonal Anti-Elastin antibody produced in mouse, Sigma), seguido de anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y revelado con o-fenilendiamina (sustrato de la HRP) y urea-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La lectura de la absorbancia se realizó en lector de ELISA a 492 nm.

El valor de elastina producida fue ponderado con el de proteína total en cada condición experimental, resultando en los valores del índice de producción de elastina/proteína total.

Como Control Positivo los fibroblastos fueron expuestos a TGF-β1 (Transforming Growth Factor Beta 1). Como Control Basal los fibroblastos se cultivaron en medio de cultivo.

## 65 Resultados

Como se puede observar en la Figura 3, el producto de cartílago mostró un importante efecto inductor de la producción de elastina a la concentración superior estudiada (2 mg/ml). Debe remarcarse que se consiguió cerca del 50% del valor mostrado por el control TGF- $\beta$ , un potente inductor de la síntesis de elastina y proteínas de matriz extracelular.

5

#### **Ejemplo 8: Determinación del potencial inhibidor de la actividad MMP-1**

Con el envejecimiento se produce una pérdida de matriz extracelular, un aumento de las metaloproteasas (MMPs) que degradan el colágeno tipo I responsable de la firmeza de la piel, así como también una pérdida de fibroblastos y de la red vascular. Se estima que el colágeno de la dermis disminuye un 1% por año en toda la vida adulta y a medida que aumenta la edad también se incrementan los niveles de metaloproteasas, lo que hace que aumente la pérdida de colágeno en forma progresiva. La presencia de niveles elevados de algunas metaloproteasas se ha asociado a la destrucción celular en una amplia variedad de procesos patológicos y del envejecimiento (K.C.N. Chang *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 22(11), 2407-2419 (2008); G.J. Fisher *et al.*, *Am. J. Pathol.* 174(1), 101-114 (2009); A. L. Clutterbuck *et al.*, *Curr. Drug Targets* 10(2), 1245-1254 (2009); H. Nagase *et al.*, *Cardiovascular Research* 69, 562-573 (2006))

10

15

#### **Materiales y métodos**

Para la evaluación del efecto de un producto de cartílago de la presente invención, en concreto del producto de cartílago del Ejemplo 1, sobre la regulación de metaloproteasas, se determinó la actividad MMP-1 en un cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos expuestos al producto de cartílago e inducidos con IL-1 $\beta$  durante 48 horas.

20

Se sembraron los fibroblastos dérmicos humanos en placas de cultivo de 24 pocillos. Tras su llegada a confluencia y privación con medio sin suero durante 16 horas, se aplicó el producto de cartílago (2 mg/ml, 500  $\mu$ g/ml y 250  $\mu$ g/ml). Tras 24 horas, se aplicó IL-1 $\beta$  como estimulador de la producción de MMPs y el cultivo se mantuvo 24 horas más. Al finalizar el tratamiento, el sobrenadante se recogió y se cuantificó la metaloproteasa activa mediante ensayo inmuno-fluorimétrico específico tras la activación enzimática con APMA (p-AminoPhenylMercuric Acetate).

25

30

Los valores de MMP-1 activa fueron ponderados por los de proteína total, previamente determinada por el método del ácido bicinónico, BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit).

El Control Basal consistió en medio de cultivo. En el estudio también se incluyó un grupo Control estimulado con IL-1 $\beta$ . Como Control Positivo de inhibición se utilizó dexametasona a 5  $\mu$ M (Control Dexa), glucocorticoide potente de acción anti-inflamatoria.

35

#### **Resultados**

El producto de cartílago mostró un potente efecto inhibidor ( $p < 0,05$ ) de la actividad metaloproteasa 1 inducida por IL-1 $\beta$ , en todas las dosis estudiadas y de manera dosis-dependiente, con una reducción del 61%-70% respecto al Control estimulado con IL-1 $\beta$ .

40

#### **Ejemplo 9: Eficacia del producto de cartílago de tráquea porcina en la calidad de cicatrización de heridas**

45

#### **Materiales y métodos**

Se llevó a cabo el estudio en un modelo de herida por excisión en un cerdo miniatura tipo Yucatán. Las heridas eran de espesor total con un diámetro de 3 cm. En el estudio se utilizaron dos cerdos hembra y se practicaron ocho heridas por animal. Cuatro heridas fueron tratadas con el producto de cartílago del Ejemplo 1 y las otras cuatro no fueron tratadas y se consideraron el grupo control. El producto se aplicó a diario durante 14 días en forma de gel constituido por 1 g de producto de cartílago resuspendido en 1 ml de suero salino estéril. Se realizó seguimiento visual de la cicatrización con fotografías y evaluación de la granulación, epitelización, hidratación y observaciones generales para cada herida los días 1, 2, 4, 8 y 15.

50

55

#### **Resultados**

La evaluación visual demostró que las heridas tratadas con producto de cartílago de la presente invención presentaban menos cicatriz hipertrófica que las correspondientes al control no tratado.

60

#### **Ejemplo 10: Efecto del producto de cartílago de tráquea porcina sobre la atrofia muscular**

La medición del tamaño de los miotubos es una buena aproximación para estudiar compuestos que puedan prevenir o tratar la atrofia del músculo esquelético o inducir hipertrofia. La línea celular C2C12 ha sido comúnmente usada como modelo in vitro para estudios de atrofia e hipertrofia muscular. Las células C2C12 proliferan en forma de mioblastos mononucleados que posteriormente se fusionan y se diferencian a miotubos multinucleados.

65

Materiales y métodos

Se sembraron mioblastos C2C12 en placas de cultivo con medio de crecimiento (DMEM/Suero fetal bovino 10%, 2mM L-glutamina) y se dejaron crecer hasta confluencia. A continuación, las células fueron tratadas con un medio (MEM/Suero bovino 2%, 2mM L-glutamina) para inducir la diferenciación de los mioblastos a miotubos. Después de 5 días, los miotubos fueron incubados 48 horas con medio libre de suero (DMEM/2mM L-glutamina) con/sin producto de cartílago del Ejemplo 1 (0,3, 1 y 1,5 mg/ml). Después del tratamiento, los miotubos fueron fijados con formaldehído y tratados con un anticuerpo de la cadena pesada de miosina. El tamaño de los miotubos se determinó por medio de Microscopía de Fluorescencia.

Resultados

La eliminación del suero de diferenciación (0% Control) resultó en una reducción aproximada del 20% del tamaño de los miotubos comparado con los miotubos que se mantuvieron en condiciones de diferenciación (2% Control).

El tratamiento con el producto de cartílago de la presente invención fue capaz de contrarrestar de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) la atrofia de los miotubos a todas las concentraciones estudiadas.

**Ejemplo 11: Efecto del producto de cartílago en un modelo *in vitro* de psoriasis. Liberación de la citoquina IL-17 por linfocitos CD4<sup>+</sup>T estimulados con una mezcla de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.**

La psoriasis es una enfermedad de base inmunológica mediada por los linfocitos T los cuales inducen determinadas respuestas fisiopatológicas en los queratinocitos por medio de la liberación de citoquinas. Las citoquinas señalizan e inducen la expresión de genes específicos y el desarrollo de la patología. La IL-17 es una citoquina crucial en la patogenésis de la psoriasis. De hecho, fármacos que atacan a dicha citoquina son efectivos en el tratamiento de esta enfermedad (A. M. Lin *et al.*, *J. Immunol.* 187 (1), 490-500 (2011)). Un producto activo para esta enfermedad podría actuar tanto a nivel de linfocitos (inhibiendo la activación/infiltración o la liberación de citoquinas) como a nivel de queratinocitos (inhibiendo la señalización de las citoquinas).

Materiales y métodos

Las células CD4<sup>+</sup>T fueron aisladas y pre-incubadas durante 24 horas en medio de cultivo con o sin el producto de cartílago del Ejemplo 1 (0,25, 0,5, 1 mg/ml) o la referencia ciclosporina A. En paralelo, la placa de 96 pocillos se cubrió con anticuerpo anti-CD3. Las células se transfirieron a la placa con medio de cultivo con anticuerpo anti-CD28 y con o sin el producto de cartílago o la referencia. Se incluyó un control no-estimulado incubando las células en pocillos no cubiertos con anticuerpo y con ausencia de anticuerpo CD28. A continuación las células fueron incubadas durante 24 horas y se recogieron los sobrenadantes del cultivo para cuantificar los niveles de IL-17 mediante un ensayo ELISA (R&D Systems, ref. DY317).

Resultados

La activación de las células CD4<sup>+</sup>T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 resultó en una liberación significativa de IL-17. El compuesto de referencia, ciclosporina A, inhibió en un 100% la liberación de IL-17.

El producto de cartílago de la presente invención a 1 mg/ml, inhibió de forma estadísticamente significativa los niveles de IL-17: 42% de inhibición.

**Ejemplo 12: Efecto del producto de cartílago sobre un modelo animal de osteoporosis y artrosis.**Materiales y métodos

Se utilizó un modelo en rata de osteoporosis inducida por ovariectomía y artrosis inducida por transección del ligamento cruzado anterior (ACLT).

El estudio incluyó los siguientes grupos de tratamiento:

- Blanco: Grupo sin inducción de osteoporosis ni artrosis. Tratado con 1 ml de agua.
- Control 1: Grupo con inducción de osteoporosis y artrosis tratado con 1 ml de agua. Se trata del grupo Control para el tratamiento con el Compuesto Oseína-Hidroxiapatita (Compuesto OHC; ver patente EP255565B1).
- Compuesto OHC: Producto de referencia utilizado a una dosis de 290,5 mg/kg/día en rata.
- Control 2: Grupo con inducción de osteoporosis y artrosis tratado con 1 ml de agua. Se trata del grupo Control para el tratamiento con la composición a base de producto de cartílago de la presente invención.
- Composición 1 a dosis baja (Composición 1 D.B.): Formulación consistente en 600 mg de producto de cartílago del Ejemplo 1, 800 mg de hidroxiapatita y 200 UI de Vitamina D3. La dosis administrada en rata fue de 163.5 mg/kg/día de esta formulación.

- Composición 2 a dosis alta (Composición 2 D.A.): Formulación consistente en 900 mg de producto de cartílago del Ejemplo1, 1200 mg de hidroxapatita y 200 UI de Vitamina D3. La dosis administrada en rata fue de 245 mg/kg/día de esta formulación.

5 La cantidad utilizada en el estudio de producto de cartílago e hidroxapatita de las composiciones 1 y 2 fue inferior a la cantidad de oseína e hidroxapatita del producto de referencia (Compuesto OHC).

El número de ratas por grupo de tratamiento fue de 15. Los compuestos se administraron a diario durante 12 semanas mediante sonda intragástrica, resuspendidos en 1 ml de agua.

10 La evaluación de la degradación del cartílago se llevó a cabo mediante la escala recomendada por OARSI (K.P.H. Pritzker *et al*, *Osteoarthritis and Cartilage* 14, 13-29 (2006)). Los efectos sobre la densidad mineral y sobre la microarquitectura ósea fueron evaluados por medio de la técnica micro-CT (M.L. Bouxsein *et al*, *J. Bone Miner. Res.* 25 (7), 1468-86 (2010))

15 Resultados en artrosis:

Los tratamientos con la Composición 2 a dosis alta y también con la Composición 1 a dosis baja han demostrado ser altamente efectivos en la reducción de la degradación del cartílago ( $p < 0.05$ ). El compuesto OHC no ha producido ningún efecto significativo (ver Figura 5).

20 Resultados en osteoporosis:

25 Como se puede observar en la Figura 6, los tratamientos con el Compuesto OHC y la Composición 1 a dosis baja han producido un incremento importante en el porcentaje de volumen de hueso. No obstante, el tratamiento con la Composición 2 a dosis alta ha sido el único que ha conllevado un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de volumen de hueso ( $p < 0,05$ ).

30 Como se puede observar en la Figura 7, el tratamiento con el Compuesto OHC ha producido sólo un ligero efecto sobre la densidad de la superficie del hueso (comparar el Compuesto OHC con el Control 1). Los tratamientos con la Composición 1, a dosis baja y con la Composición 2, a dosis alta, han producido un incremento considerable de la densidad de superficie del hueso, siendo el efecto de la Composición 2 a dosis alta estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ).

35 Por otro lado, en la Figura 8 se puede observar que el tratamiento con la Composición 1 a dosis baja ha producido un incremento no estadísticamente significativo del número trabecular (45 % de aumento). El Compuesto OHC ha provocado un incremento del 88 %, estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Y la Composición 2 a dosis alta ha sido la que ha demostrado unos mejores resultados, con un incremento del número trabecular de un 180% ( $p < 0,01$ ).

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un producto de cartílago que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) picar el cartílago;  
 b) mezclar el cartílago picado y agua;  
 c) calentar la mezcla de la etapa b) a una temperatura entre 45 °C y 55 °C;  
 d) añadir una solución acuosa de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para ajustar el pH de la mezcla de la etapa c) a un valor  
 10 comprendido entre 3,0 y 3,5;  
 e) tratar la mezcla ácida de la etapa d) con una cantidad de pepsina en peso respecto al peso del  
 cartílago de la etapa a) comprendida entre 0,6% y 1,0%, durante un periodo de tiempo  
 comprendido entre 10 y 30 horas, de modo que se obtiene una solución;  
 f) neutralizar la solución de la etapa e) con Ca(OH)<sub>2</sub>, y  
 15 g) filtrar la solución de la etapa f) que contiene sales insolubles, de modo que se obtiene una  
 solución acuosa del producto de cartílago, en el que el producto de cartílago comprende un  
 hidrolizado de proteína con un grado de hidrólisis comprendido entre 0,5% y 3,0%, al menos un  
 glicosaminoglicano y al menos un factor de crecimiento.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende una etapa adicional después de la etapa g),  
 20 en la cual se obtiene un producto de cartílago sólido a partir de la solución acuosa de la etapa g).
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que en la etapa e) la cantidad de pepsina en peso  
 respecto al peso del cartílago de la etapa a) está comprendida entre 0,7% y 0,8%, en la etapa e) el periodo de  
 25 tiempo está comprendido entre 20 y 28 horas y en la etapa c) la temperatura es 50 °C.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3, en el que la etapa f) de neutralización  
 se lleva a cabo después de (i) calentar la solución de la etapa e) durante una hora a una temperatura comprendida  
 entre 75 °C y 90 °C; (ii) filtrar, y (iii) decolorar.
- 30 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una etapa adicional  
 antes de la etapa a), en la cual el cartílago se somete a una limpieza mecánica para eliminar grasa y tejidos no  
 cartilaginosos.
- 35 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cartílago es cartílago de  
 tráquea porcina.
7. Un producto de cartílago obtenible por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a  
 6.
- 40 8. El producto de cartílago según la reivindicación 7, en el que el glicosaminoglicano se selecciona de entre  
 el grupo que consiste en sulfato de condroitina, ácido hialurónico, sulfato de queratano y mezclas de los mismos, y el  
 factor de crecimiento se selecciona de entre el grupo que consiste en TGF-β1, TGF-β3 y mezclas de los mismos.
- 45 9. El producto de cartílago según una cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8, que comprende:
- a) entre 67% y 87% en peso de hidrolizado de proteína con un grado de hidrólisis comprendido  
 entre 0,5% y 3,0%, respecto al peso del producto de cartílago anhidro;  
 b) entre 15% y 25% en peso de sulfato de condroitina, respecto al peso del producto de cartílago  
 50 anhidro;  
 c) entre 0,1% y 1,0% en peso de ácido hialurónico, respecto al peso del producto de cartílago  
 anhidro;  
 d) entre 20 pg y 200 pg de TGF-β1 por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro, y  
 e) entre 20 pg y 200 pg de TGF-β3 por cada 100 mg de producto de cartílago anhidro.
- 55 10. Un complemento alimenticio o un alimento funcional que comprende el producto de cartílago según una  
 cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, y al menos un excipiente nutricional.
- 60 11. Una composición cosmética que comprende el producto de cartílago según una cualquiera de las  
 reivindicaciones 7 a 9, y al menos un excipiente cosméticamente aceptable.
12. Una composición farmacéutica que comprende el producto de cartílago según una cualquiera de las  
 reivindicaciones 7 a 9, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 65 13. Un producto de cartílago según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso como  
 medicamento.

14. Un producto de cartílago según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso en el tratamiento o prevención de una herida, de una úlcera, de una quemadura, de la psoriasis, de la artrosis, de la sinovitis, de la osteoporosis, de la osteopenia, de una fractura ósea, de una enfermedad o lesión de un tendón o de un ligamento, de una enfermedad periodontal, preferiblemente periodontitis, de una afección muscular, preferiblemente atrofia muscular, o de los efectos dañinos de la exposición a la radiación ultravioleta.

5

15. Un complemento alimenticio o un alimento funcional según la reivindicación 10, para su uso en prevenir la formación de una herida o de una úlcera, en mejorar la calidad de cicatrización de una herida, de una úlcera o de una quemadura, en prevenir o revertir una lesión psoriásica, en prevenir la artrosis, en nutrir la articulación, en prevenir, estabilizar o reparar una lesión o un defecto de cartílago, de la membrana sinovial o del hueso subcondral, en aumentar la movilidad articular, como un condroprotector, en reducir la sinovitis, en prevenir la osteoporosis o la osteopenia, en aumentar la densidad de masa ósea, en reparar fracturas óseas, en aumentar la absorción de calcio, en prevenir o reparar una lesión de un tendón o de un ligamento, en prevenir o revertir una afección periodontal, preferiblemente periodontitis, en prevenir o revertir una afección muscular, preferiblemente atrofia muscular, en retrasar, disminuir o prevenir las señales de envejecimiento de la piel.

10

15

16. Uso de una composición cosmética según la reivindicación 11, para tratar, retrasar, disminuir o prevenir las señales de envejecimiento de la piel o las estrías.

20

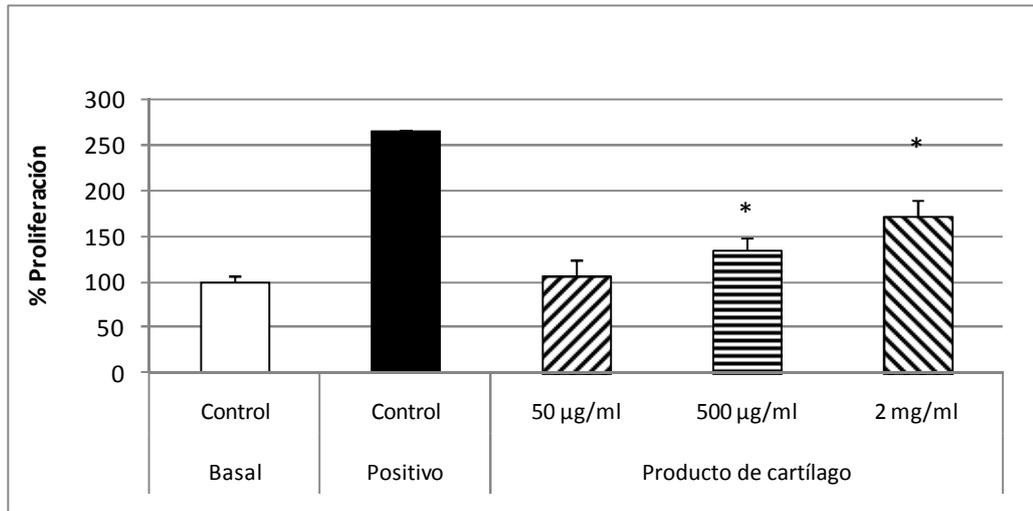


Figura 1

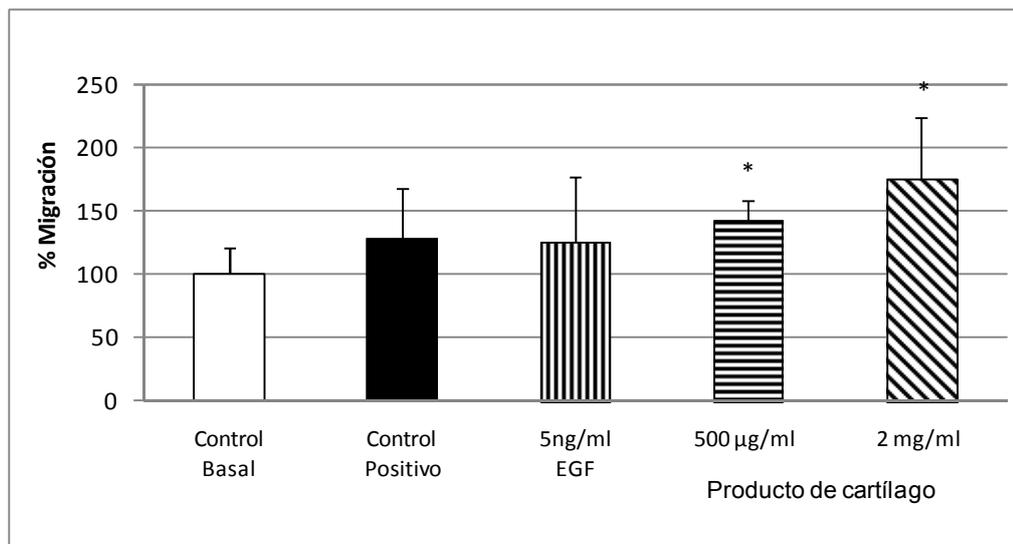


Figura 2

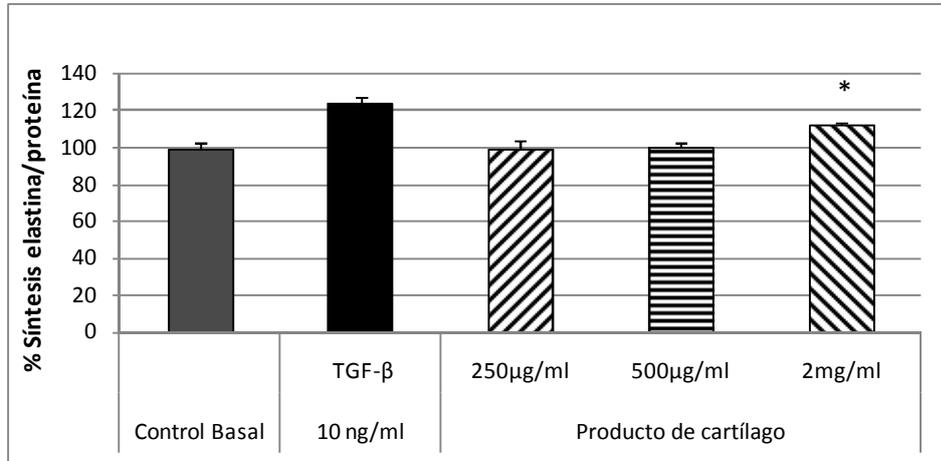


Figura 3

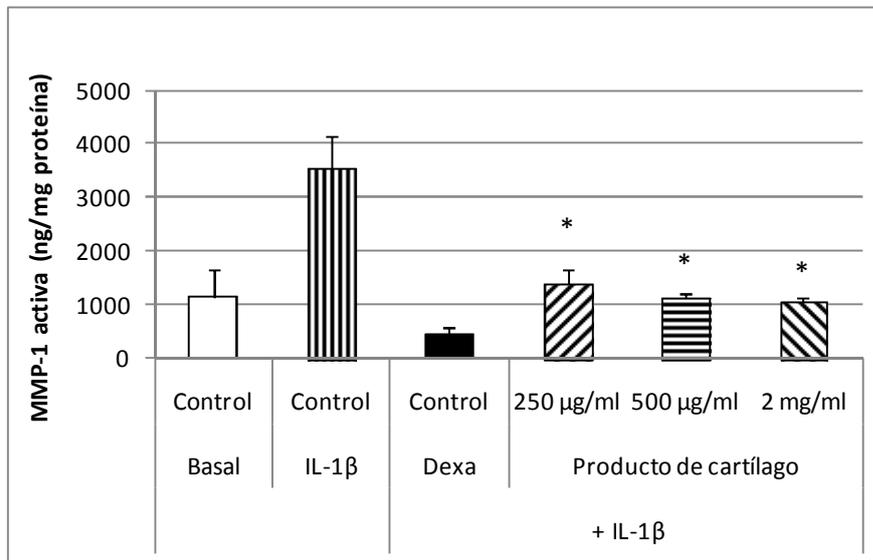


Figura 4

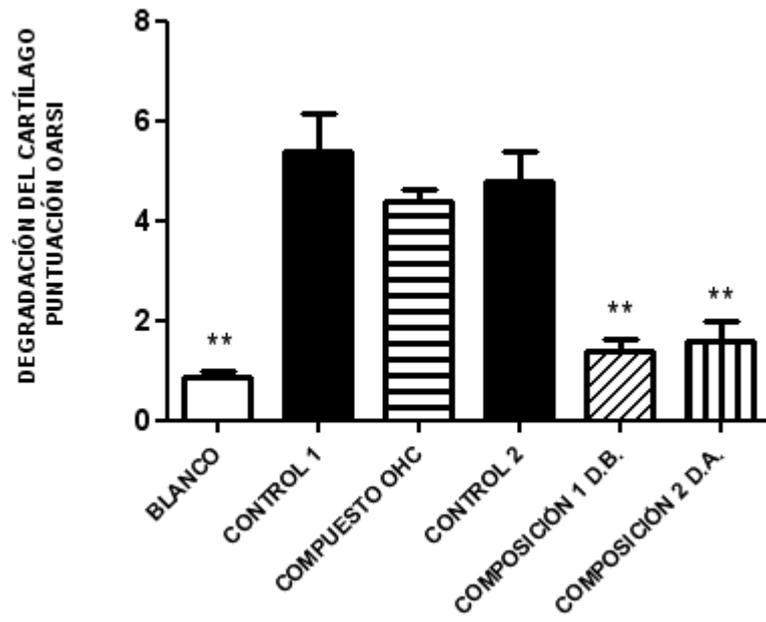


Figura 5

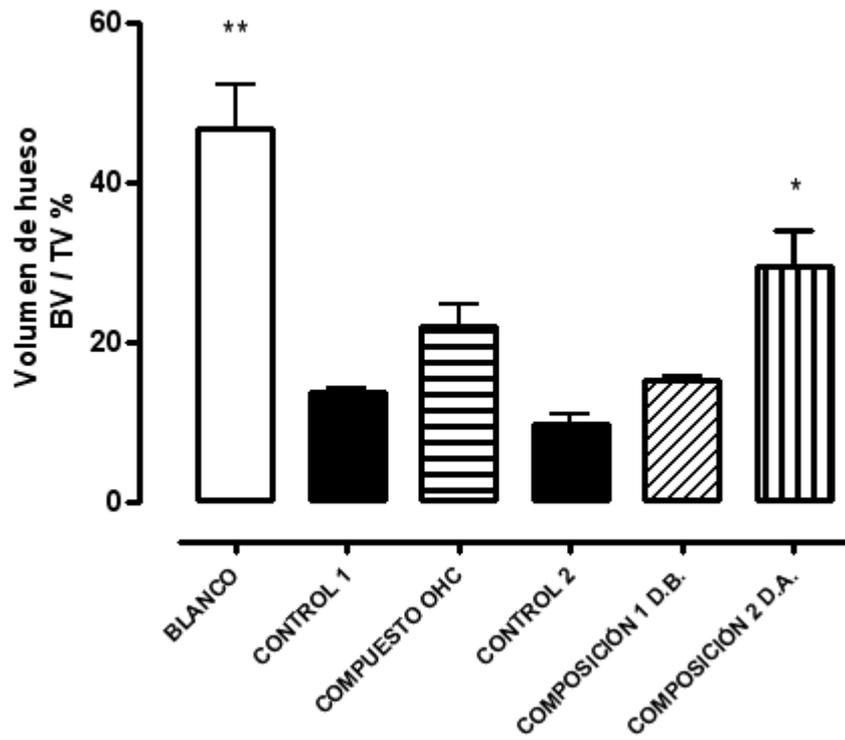


Figura 6

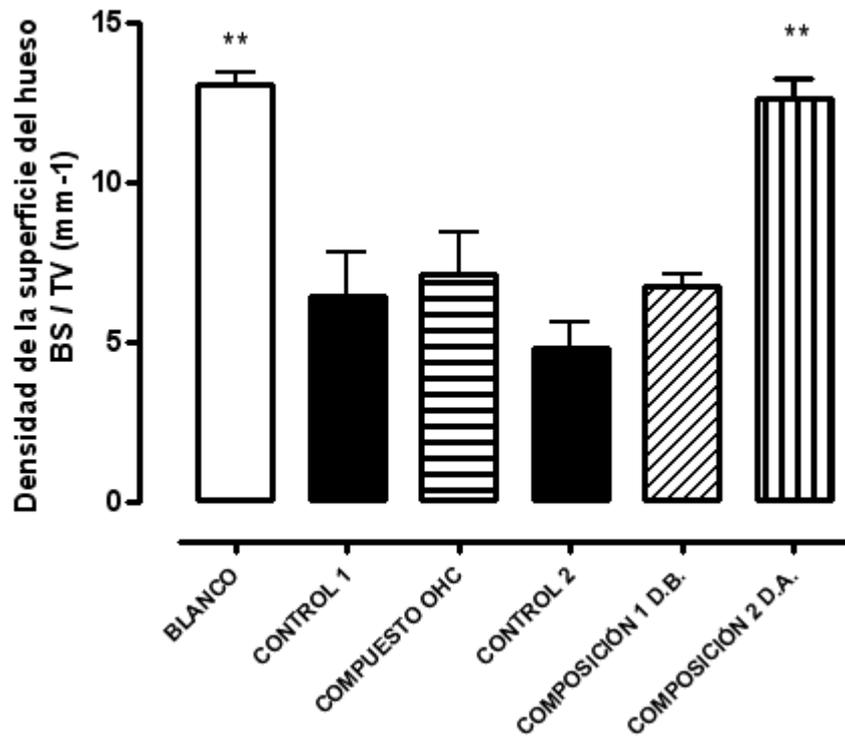


Figura 7

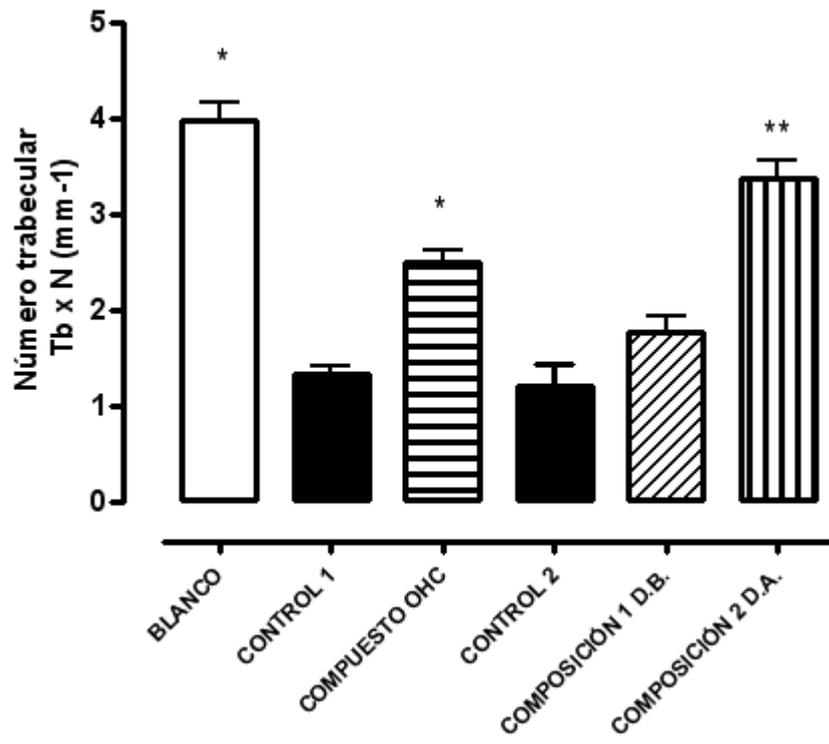


Figura 8