

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 816**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7008 (2006.01)

A61K 31/722 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2009 PCT/IS2009/000009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10007631**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2009 E 09787621 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2318014**

54 Título: **Nueva composición para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios**

30 Prioridad:

18.07.2008 IS 8751

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

16.03.2017

73 Titular/es:

**GENÍS HF. (100.0%)
Adalgata 34
580 Siglufjördur, IS**

72 Inventor/es:

**GISLASON, JOHANNES;
EINARSSON, JON, M. y
NG, CHUEN HOW**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 605 816 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

Nueva composición para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a una nueva composición quitoooligomérica para uso médico. Más específicamente, la invención se refiere a biomateriales y medicamentos preparados a partir de quitina que promueven sinérgicamente efectos regenerativos y antiinflamatorios *in vivo* e *in vitro*.

10

Antecedentes técnicos y técnica anterior

[0002] El desarrollo de la primera generación de biomateriales, aunque tenían una resistencia mecánica aceptable, resultó en una contribución pasiva a la cicatrización de tejidos, ya que su función se limitaba a apoyar la sustitución de los tejidos. Esta primera generación de biomateriales liberaba residuos de degradación que, a su vez, conducían a la aparición de inflamaciones crónicas, dolor y derrames. El principal objetivo del desarrollo de la segunda generación de biomateriales biodegradables fue eliminar los problemas crónicos a largo plazo resultantes de la liberación continua de partículas residuales procedentes de los materiales de la primera generación. Esto resultó en materiales biodegradables implantables que ofrecían propiedades de soporte de tejidos durante el periodo de tiempo deseado (meses) y después experimentaban una degradación local por parte de los tejidos circundantes y se excretaban subsiguientemente fuera del cuerpo con la orina y/o las heces. Un ejemplo de esta tecnología son las suturas vasculares biodegradables de uso en la actualidad.

[0003] A pesar de las buenas propiedades de biocompatibilidad de la segunda generación de biomateriales, su contribución a la promoción de la cicatrización de tejidos es limitada, debido a su papel pasivo en los procesos biológicos que intervienen en la cicatrización y la regeneración de los tejidos. La necesidad de desarrollar un conjunto más moderno que constituya una tercera generación de biomateriales reside en el deseo de desarrollar compuestos que contribuyan activamente al proceso de cicatrización y regeneración de los tejidos.

[0004] La solicitud previa del solicitante WO 2006/134614 desvela un procedimiento para preparar un biomaterial de quitina parcialmente desacetilada altamente purificado para aplicaciones terapéuticas. Las composiciones oligoméricas producidas por este procedimiento se denominan en este documento "quitoooligosacáridos terapéuticos" (T-ChOS). Los quitoooligosacáridos terapéuticos se caracterizan por su longitud de cadena de 4-20 restos monoméricos y por su secuencia específica de D-glucosamina (D) y N-acetil-D-glucosamina (A), en que la parte interna del oligómero tiene al menos suficientes restos de glucosamina (D) para evitar que haya un resto de N-acetilglucosamina (A) adyacente a otro resto de N-acetilglucosamina (como AA).

[0005] Básicamente, hay dos vías para la reparación o cicatrización de un tejido dañado o enfermo. Una es a través de fibrosis que conduce a la formación de cicatrices. Dado que los fibroblastos que intervienen en la formación del tejido fibrótico no tienen las funciones de las células originales del tejido, esta ruta de reparación conduce a una función deficiente de dicho tejido. En la fibrosis intervienen normalmente citocinas inflamatorias.

[0006] Se piensa que YKL-40 desempeña un papel en la fibrosis a través de quimiotaxia y estimulación del crecimiento de los fibroblastos.

45

[0007] La ruta alternativa de reparación de tejidos es la regeneración de los tejidos o la reparación de tejidos funcionales. En esta ruta se regeneran las células funcionales del tejido concreto, probablemente a partir de células progenitoras específicas del tejido, lo que resulta en la regeneración de un tejido funcional sano.

[0008] En el tejido óseo, los biomateriales o dispositivos osteógenos y osteoinductores promueven el crecimiento óseo al inducir la proliferación de células progenitoras capaces de transformarse en cartílago y/o tejido óseo y se caracterizan como materiales que no solo rellenan los huecos, sino que también muestran propiedades intrínsecas que causan o inducen la producción de hueso nuevo por el cuerpo, dentro del armazón proporcionado por la composición de biomaterial. Estos materiales no solo actúan como armazón, sino que también contienen proteínas y otras sustancias que inducen la formación de hueso nuevo. Los autoinjertos, que se han estado usando durante muchos años en procedimientos quirúrgicos ortopédicos, constituyen el procedimiento más común de contribuir a la capacidad regenerativa del cuerpo. Solo un producto disponible comercialmente demuestra tener

propiedades verdaderamente osteoinductoras, el dispositivo introducido recientemente por Medtronic, denominado InFUSE®, que incorpora una versión recombinante de la proteína morfogenética ósea humana (BMP). Además, se ha usado ampliamente glucosamina para el tratamiento de la osteoartritis.

- 5 **[0009]** Hasta ahora no se han descubierto agentes capaces de promover la regeneración de tejidos a través de su administración sistémica (por ejemplo, por vía oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, etc.).

Resumen de la invención

- 10 **[0010]** En una solicitud de patente anterior (WO 2006/057011), los inventores han demostrado que derivados de quitina parcialmente desacetilados implantados en un defecto óseo son capaces de inducir una osificación endocondral. La presente invención demuestra el efecto regenerativo de T-ChOS y T-ChOS + glucosamina en modelos *in vitro* e *in vivo*, lo que demuestra el efecto de los aminoazúcares específicos a través de su administración sistémica. Adicionalmente, se demuestra que dímeros y trímeros de glucosamina y *N*-acetilglucosamina (DP2 y DP3)
15 presentan un efecto inhibitorio. La presente invención también desvela un efecto sinérgico sorprendente de T-ChOS y glucosamina como composición bioactiva que actúa contra la inflamación y facilita la regeneración de tejidos en la artritis reumatoide (AR). Además, en los ejemplos se demuestra que la combinación de T-ChOS y glucosamina constituye un agente activo para promover y potenciar la formación de colágeno de tipo II en explantes de cartílago, aparentemente a través de la interacción con YKL-40, un miembro de la familia de proteínas CLP. Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición, un uso y un procedimiento para reducir la inflamación y promover la reparación de tejidos o la regeneración de tejidos a través de un efecto sinérgico de T-ChOS y glucosamina y/o *N*-acetilglucosamina administrados sistémica o localmente a humanos y otros mamíferos que lo necesiten.

- 25 **[0011]** En un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición para el tratamiento de la artritis reumatoide, en que la composición comprende quitooligómeros terapéuticamente activos (T-ChOS) de *N*-acetilglucosamina (A) y glucosamina (D), en que los quitooligómeros comprenden heteroquitooligómeros que han de cumplir los criterios siguientes: los oligómeros tienen una longitud de cadena en el intervalo de 5-20 restos monoméricos y cada cadena oligomérica puede tener dos restos de *N*-acetilglucosamina (AA) en uno o en los dos
30 extremos de la cadena oligomérica. La secuencia de la cadena interna (la porción dentro de los dos restos terminales en cada extremo) es tal que no hay ningún resto de *N*-acetilglucosamina (A) adyacente a otro resto de *N*-acetilglucosamina (como AA). La composición comprende además monómeros de glucosamina, en que la relación entre monómeros y oligómeros está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1 y en que el grado de desacetilación (DD) de dichos quitooligómeros terapéuticamente activos está en el intervalo del 30-60 %.
35 La composición de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención es un biomaterial que presenta las principales características de los biomateriales, es decir, biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad.

- [0012]** La relación adecuada entre los quitooligómeros terapéuticamente activos (T-ChOS) y el monómero puede depender de la indicación, aplicación, dispositivo y forma de dosificación específicos. En general, la relación
40 (ponderal) entre monómeros y oligómeros puede estar en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1, incluido el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1. En ciertas realizaciones, la cantidad en peso de monómeros es mayor y la relación puede estar en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1, incluido el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1, tal como la relación de aproximadamente 2:1, de aproximadamente 4:1 o, con mayor preferencia, de aproximadamente 3:1. En otras realizaciones, se usan
45 más oligómeros T-ChOS, de manera que la relación entre monómeros y oligómeros está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:4, incluida la relación de aproximadamente 1:1, de aproximadamente 1:2 y de aproximadamente 1:3.

- [0013]** La presente invención desvela también una composición farmacéutica que comprende
50 quitooligómeros terapéuticamente activos de *N*-acetilglucosamina (A) y glucosamina (D) (T-ChOS) en sinergia con monómeros añadidos de glucosamina y/o *N*-acetilglucosamina. El componente quitooligomérico comprende heteroquitooligómeros, según se definen anteriormente, que tienen una distribución de la longitud de la cadena significativa en el intervalo de 4-20 restos monoméricos y cada cadena oligomérica puede tener dos restos de *N*-acetilglucosamina (AA) en uno o en los dos extremos de la cadena oligomérica. La secuencia de la cadena interna
55 es tal que no hay ningún resto de *N*-acetilglucosamina (A) adyacente a otro resto de *N*-acetilglucosamina (como AA). La composición comprende además monómeros de glucosamina y/o *N*-acetilglucosamina, preferentemente en la relación ponderal según se describe anteriormente. Esta composición farmacéutica puede estar en forma de polvo,

suspensión, gel, sol, aerosol, pasta, película, espuma, comprimido y cápsula. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 **[0014]** La presente invención desvela además el uso de las composiciones de la invención para la producción de un biomaterial/medicamento contra la inflamación y para la regeneración tisular.

10 **[0015]** La presente invención desvela también un uso de las composiciones para la producción de un biomaterial/medicamento para la regulación de la síntesis de colágeno con el fin de prevenir la formación de cicatrices en la reparación de tejidos. La composición comprende quitooligómeros terapéuticamente activos de *N*-acetilglucosamina (A) y glucosamina (D) (T-ChOS), de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

Descripción de la presente invención

15 **[0016]** La composición de la presente invención es una combinación de dos materiales de quitina que muestran un efecto sinérgico en la regeneración de tejidos. Se ha demostrado que los quitooligómeros terapéuticamente activos (T-ChOS) se unen a proteínas similares a quitinasa (CLP) en el cuerpo y nuestros datos demuestran que las CLP pueden desempeñar un papel en la síntesis de colágeno en el cuerpo y que, como resultado de la interacción entre CLP y T-ChOS, la síntesis de colágeno se regula por aumento. La síntesis de colágeno de tipo II en el cartilago articular se inicia mediante la formación de procolágeno, que se sintetiza en dos formas de corte y empalme alternativo, PIIANP y PIIBNP, en que PIIANP inmoviliza TGF- β 1, BMP-2 y BMP-4, de la superfamilia TGF- β . Esto regula potencialmente la señalización de los factores de crecimiento durante el desarrollo y es un elemento clave para la regulación de la formación ósea endocondral, la ruta natural de la formación ósea (osificación endocondral) que implica la formación de tejido cartilaginoso, la vascularización del tejido cartilaginoso, la potenciación de la mineralización y la subsiguiente osificación del tejido cartilaginoso inducido con la formación de hueso laminar. Las proteínas morfogénicas óseas (BMP) son indeseadas durante la formación del colágeno articular y las primeras etapas de la formación ósea, pero se liberan específicamente cuando el tejido se conduce a la ruta de la formación ósea endocondral.

20 **[0017]** Dado que la presente invención demuestra que la presencia de DP2-3 bloquea la acción biológica deseada de la composición, el componente T-ChOS de la composición de la presente invención se caracteriza adicionalmente porque la cantidad de monómeros, dímeros y trímeros (DP1, DP2 y DP3) está muy reducida.

35 **[0018]** Las composiciones oligoméricas de la presente invención representan la optimización de la actividad terapéutica de las composiciones oligoméricas que incluye biodisponibilidad, bioestabilidad y bioactividad. Las composiciones oligoméricas denominadas en este documento "quitooligosacáridos terapéuticos" (T-ChOS) han sido producidas por un procedimiento desvelado en el documento WO 2006/134614 para la obtención de un polímero de quitina parcialmente desacetilado de gran pureza y totalmente soluble. Una composición polimérica de quitina parcialmente desacetilada se trata con una endoquitinasa de la familia 18 y después se filtra para dar la composición deseada con una longitud de cadena en el intervalo de 4-20 restos monoméricos y cada cadena oligomérica puede tener dos restos de *N*-acetilglucosamina (AA) en uno o los dos extremos de la cadena oligomérica. La secuencia de dicha cadena interna es tal que no hay ningún resto de *N*-acetilglucosamina (A) adyacente a otro resto de *N*-acetilglucosamina (es decir, no se forman pares "AA" en la porción interna de la cadena, cuyos extremos terminales están formados por dos restos que pueden ser AA). Como resultado de esta construcción, la composición con una longitud de cadena en el intervalo de 4-20 restos monoméricos no puede ser escindida por quitinasas en el cuerpo.

45 **[0019]** El grado de desacetilación de los oligómeros está preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 30-60 %, tal como aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 % o aproximadamente el 60 %.

50 **[0020]** El patrón secuencial de los quitooligómeros terapéuticos afecta directamente a su *actividad biológica*, es decir, cómo se transportan a través de membranas biológicas (biodisponibilidad), con cuánta rapidez se degradan en los sistemas vivos (bioestabilidad) y cómo interaccionan con proteínas similares a quitinasa y otros receptores específicos que se unen a secuencias quitinosas (bioactividad).

55 **[0021]** La *biodisponibilidad*, o la capacidad que tiene una sustancia dada de pasar a través de membranas biológicas, está relacionada con la hidrofobicidad de las moléculas. Dado que todas las membranas biológicas son predominantemente de naturaleza hidrófoba, la regla general es que cuanto más hidrófoba sea una sustancia, mejor

puede penetrar a través de tales membranas biológicas. La *N*-acetilglucosamina y los oligómeros de quitina totalmente acetilados son más hidrófobos que el correspondiente monómero de glucosamina u oligómeros de quitosano altamente desacetilados, lo que sugiere que los heterooligómeros quitinosos tendrán mayor biodisponibilidad al aumentar la acetilación. Por lo tanto, las formulaciones de T-ChOS han sido optimizadas para 5 contener una cantidad máxima de *N*-acetilglucosamina en su estructura molecular con el fin de maximizar su biodisponibilidad, sin comprometer su bioestabilidad.

[0022] La *bioestabilidad* de un compuesto orgánico se refiere a su sensibilidad a enzimas endógenas en un organismo vivo y a su semivida ($t_{1/2}$) en dicho organismo. Cuanto más sensible sea el compuesto, menor es su 10 bioestabilidad. En humanos, las enzimas quitinolíticas puede dividirse en dos grupos: enzimas con un alto nivel de especificidad quitinolítica como las quitinasas de la familia 18 (AMCasa, quitotriosidasa), que tienen alta actividad específica, o enzimas con menor especificidad quitinolítica como lisozima y probablemente algunas proteasas que pueden degradar quitina y quitosano pero con menor actividad específica. Mediante la desacetilación parcial, las composiciones de T-ChOS han sido optimizadas para una estabilidad máxima frente a la hidrólisis por quitinasas de 15 la familia 18. Dado que estas enzimas requieren una secuencia de dos o más restos consecutivos de *N*-acetilglucosamina como reconocimiento para la escisión, las composiciones de T-ChOS están optimizadas específicamente para excluir tales secuencias en la parte interna de la molécula.

[0023] La *bioactividad* de una sustancia orgánica o un ligando está directamente relacionada con la afinidad 20 del ligando por el receptor diana que desencadena la respuesta biológica. Todavía se sabe poco sobre el papel biológico de los compuestos quitinosos en el cuerpo humano, aunque hay indicaciones de que los oligómeros de quitina desempeñan un papel vital en el desarrollo embrionario. Esto sugiere que el genoma humano es capaz de expresar receptores específicos que se activan específicamente cuando se unen a oligómeros de quitina. Las únicas proteínas conocidas que se unen a quitina en el cuerpo humano son las proteínas similares a quitinasa (CLP), que 25 pertenecen genéticamente a las quitinasas de la familia 18, aunque la mayoría de ellas ha perdido su actividad enzimática, pero conserva aún su dominio de unión a quitina.

[0024] El término "osificación endocondral" se refiere a un proceso de formación ósea en el que el cartílago se desarrolla produciendo en primer lugar el armazón del hueso final. El tejido cartilaginoso necesita menos tensión 30 de oxígeno local para su desarrollo y mantenimiento que el tejido óseo maduro y, por lo tanto, donde sea que el sistema de suministro sanguíneo no ha alcanzado su estado final de desarrollo, el cartílago sustituirá al hueso. El cartílago solo se reemplaza por hueso nuevo después que la vascularización ha alcanzado su estado avanzado y se garantiza el suministro esencial de oxígeno a los tejidos en desarrollo. Este proceso de formación ósea también es típico durante la etapa embrionaria, en particular en el caso de las vértebras, huesos largos, esternón, etc. 35

[0025] En el presente contexto, el término "dispositivo médico" se refiere generalmente a un instrumento, aparato, implemento, máquina, artilugio, implante, reactivo *in vitro* u otro artículo similar o relacionado, que incluye una parte componente o accesorio que se destina al uso en el diagnóstico de enfermedades u otros procesos o en la 40 cura, alivio, tratamiento o prevención de enfermedades en humanos u otros animales o que se destina a afectar la estructura o cualquier función del cuerpo en humanos u otros animales. En el contexto de este documento, el término "*producto de biomaterial*" se usa de forma intercambiable con el término "*dispositivo médico*".

[0026] Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento comprenden los quitoooligómeros terapéuticos (T-ChOS) en sinergia con glucosamina y/o *N*-acetilglucosamina. Pueden administrarse sistémicamente 45 y unirse a CLP endógenas, para muchas de las cuales se ha demostrado o se piensa que desempeñan un papel en diversas enfermedades y procesos. Entre las enfermedades y procesos que están asociados con una expresión elevada de las CLP se cuentan enfermedades degenerativas (por ejemplo, artritis reumatoide) y otras enfermedades incluida la osteoartritis. Las composiciones de T-ChOS de la invención resultan útiles para el tratamiento y/o la cura de estas enfermedades, así como en procesos relacionados con la formación del tejido óseo y procesos tales como 50 la regeneración ósea después de intervenciones quirúrgicas o traumas. Sin embargo, conjuntamente con glucosamina, este efecto aumenta. La relación adecuada entre los oligómeros T-ChOS y los monómeros es preferentemente según se describe anteriormente.

[0027] La composición puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un 55 auxiliar de procesamiento o agentes estabilizantes, diluyentes, aromas, nutrientes, colorantes o ingredientes adicionales apropiados biológicamente activos o inactivos.

[0028] Preferentemente, la composición farmacéutica debe estar en una forma adecuada para administración por vía oral, tal como una forma seca que puede disolverse fácilmente, por ejemplo, en un vaso de agua. Tales formas incluyen la forma de polvo seco, suspensión, gel, película, espuma, sol, aerosol, granular, en escamas, fibrosa y de pasta. Sin embargo, la composición puede estar contenida también en comprimidos o cápsulas.
5 Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0029] También se desvelan composiciones que se usan para la producción de un biomaterial/medicamento para la regeneración de tejidos, tal como la potenciación de la regeneración ósea en la cicatrización de un hueso fracturado o seccionado en un mamífero. Un medicamento tal potencia, por ejemplo, la formación ósea a través de
10 la osificación endocondral mediante la activación de células progenitoras específicas del tejido.

[0030] El biomaterial puede comprender uno o más componentes adicionales seleccionados de entre el grupo que consta de fosfatos de calcio, incluido hidroxiapatito, sulfato de calcio, tripolifosfato de sodio, alginato, colágeno, ácido hialurónico y polímero de quitosano.
15

[0031] La composición puede estar en una forma adecuada para otras formas de administración sistémica, tales como la administración por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa. Tales formas adecuadas son formas en disolución con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar. Dichas formas en disolución son estériles y su pH está ajustado y tamponado adecuadamente. Para uso
20 por vía intravenosa, la concentración total del soluto debe controlarse para que la preparación sea isotónica.

[0032] Los T-ChOS pueden usarse por sí solos como medicamento para dirigir la reparación tisular de un tejido dañado o enfermo lejos de la fibrosis que conduce a la formación de cicatrices y más bien inducir la regeneración del tejido o la reparación del tejido funcional, lo que resulta en la regeneración de un tejido funcional
25 sano. Esta regulación de la ruta de reparación del tejido se lleva a cabo a través del control de la síntesis de colágeno en el tejido lesionado o inflamado.

En una realización de la presente invención, se usa T-ChOS + glucosamina como medicamento para reducir la ganancia de peso en mujeres postmenopáusicas.
30

[0033] En el presente contexto, el término "dispositivo médico" se refiere generalmente a un instrumento.

Los quitooligómeros terapéuticos de esta invención son especialmente útiles en biomateriales para diversas finalidades. Además de presentar todas las características ventajosas del quitosano convencional (biocompatibilidad,
35 capacidad de mezclarse con otros componentes para producir mezclas adecuadas para dispositivos médicos, tales como implantes mecánicos, dispositivos de liberación de fármacos, etc.), tienen significativamente mayor solubilidad, así como mayor actividad biológica o terapéutica debido a su alta afinidad por las CLP del cuerpo, según se describe anteriormente.

[0034] La formulación de los biomateriales puede incluir adecuadamente otros componentes orgánicos e inorgánicos, tales como diversos biopolímeros (alginatos y otros polisacáridos, etc.), colágeno, fosfatos de calcio, incluido hidroxiapatito, sulfato de calcio, tripolifosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, glicerofosfato de sodio, óxido de calcio, hidróxido de calcio y diversos ácidos orgánicos o carboxílicos, etc.
40

45 **Descripción detallada de una realización preferida**

[0035] La presente invención se desvelará ahora en más detalle usando ejemplos y figuras para hacer posible la invención reivindicada.

50 **Figuras**

[0036]

Figura 1. Análisis de HPLC (columna TSK-Oligo; TosoHaas, Japón) de Oligomin y T-ChOS.

55 **Figura 2.** Efecto de diversos aminoazúcares sobre la liberación acumulada de sulfato de condroitina en los días 10-23. Concentraciones de 200 y 400 µg/ml de Oligomin (OI 200 y OI 400), así como 400 µg/ml de glucosamina (D400)

muestran una reducción significativa de la degradación del sulfato de condroitina. Valores medios y EEM (error estándar de la media); N (grupo) = 24.

Figura 3. Efecto de T-ChOS sobre el propéptido N-terminal del colágeno de tipo II (PIINP) liberado al medio entre los días 20 y 22. No hay efecto, excepto para 50, 100, 200 y 400 µg/ml de T-ChOS. Medias y EEM; N (grupo) = 4.

Figura 4. Efecto de T-ChOS + glucosamina (D) sobre el propéptido N-terminal del colágeno de tipo II (PIINP) acumulativo liberado al medio entre los días 20 y 24 conjuntamente. Valores medios y EEM; N (grupo) = 8.

10 **Figura 5.** Efecto de T-ChOS + glucosamina (D), glucosamina e IGF-1 sobre la liberación acumulativa de sulfato de condroitina del día 17 al día 24. Medias y EEM; N (grupo) = 16. IGF-1 y T-ChOS +D muestran un aumento significativo de la liberación acumulativa de sulfato de condroitina. Basado en los datos mostrados en la figura 9.

15 **Figura 6.** Inducción relacionada con la dosis de T-ChOS del nivel de propéptido N-terminal del colágeno de tipo II (PIINP) en el medio los días 18 a 25 en un explante de cartílago osteoartrítico (OA) humano. Sólo se observó inducción para T-ChOS. Los asteriscos indican la significación de las concentraciones de 400 µg/ml a 0 µg/ml de T-ChOS mediante una prueba t (* = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001). Valores medios y EEM; N (grupo) = 4.

20 **Figura 7.** Efecto de tres aminoazúcares sobre la expresión de YKL-40 en el periodo (N = 4; valores medios y EEM).

Figura 8. Expresión de YKL-40 en relación con la expresión de PIINP para los grupos de control, glucosamina, Oligomin y T-ChOS los días 15-25. Solo el grupo de T-ChOS muestra una expresión de PIINP significativamente más alta (N = 20).

25 **Figura 9.** Efecto de glucosamina, T-ChOS y la combinación de T-ChOS + glucosamina sobre el diámetro del tobillo acumulado (DT Ac) del día 9 al día 17. 0: sin tratamiento, D21: 21 mg/kg/rata de glucosamina, T: 7,1 mg/kg/rata de T-ChOS, T+D14, 21 y 28: T: 7,1 mg/kg/rata de T-ChOS + 14, 21 y 28 mg/kg/rata de glucosamina, respectivamente.

30 **Figura 10.** Efecto de glucosamina, T-ChOS (T) y la combinación de T-ChOS + glucosamina (T+D21) sobre la puntuación del daño en el cartílago del tobillo. Los números indican dosis diarias (mg/kg/rata). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 0 mediante una prueba t.

35 **Figura 11.** Efecto de glucosamina, T-ChOS (T) y la combinación de T-ChOS + glucosamina (T+D21) sobre la puntuación de la reabsorción ósea en el tobillo. Los números indican dosis diarias (mg/kg/rata). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 0 mediante una prueba t.

40 **Figura 12.** Efecto de glucosamina, T-ChOS (T) y la combinación de T-ChOS + glucosamina (T+D21) sobre la puntuación del paño sinovial en el tobillo. Los números indican dosis diarias (mg/kg/rata). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 0 mediante una prueba t.

Figura 13. Efecto de glucosamina, T-ChOS (T) y la combinación de T-ChOS + glucosamina (T+D21) sobre la puntuación histopatológica total del tobillo. Los números indican dosis diarias (mg/kg/rata). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 0 mediante una prueba t.

45 **Figura 14.** Efecto de glucosamina (D21), T-ChOS (T) y la combinación de T-ChOS + glucosamina (T+D) sobre la formación de paño sinovial en la rodilla. Los números indican dosis diarias (mg/kg/rata). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 0 mediante una prueba t.

50 **Figura 15.** Efecto de glucosamina (D21), T-ChOS (T) y la combinación de T-ChOS + glucosamina (T+D) sobre la reabsorción ósea en la rodilla. Los números indican dosis diarias (mg/kg/rata). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 0 mediante una prueba t.

55 **Figura 16.** Efecto de glucosamina (D21), T-ChOS (T) y la combinación de T-ChOS + glucosamina (T+D) sobre la puntuación histopatológica total de la rodilla. Los números indican dosis diarias (mg/kg/rata). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 0 mediante una prueba t.

Figura 17. Efecto de Oligomin, T-ChOS solo y T-ChOS en combinación con *N*-acetilglucosamina (A) o glucosamina

(D) sobre el dolor y la inflamación en un paciente con artritis reumatoide (AR). La calificación es de 0 (sin alivio) a 10 (alivio total). Las dosis diarias fueron Oligomin: 2.200 mg, T-ChOS: 700 mg, *N*-acetilglucosamina (A) o glucosamina (D): 1.500 mg. Las flechas indican cuándo se añadieron los monómeros a los T-ChOS.

5 EJEMPLOS

Ejemplo1: Efectos regenerativos de aminoazúcares específicos en explantes de cartílago bovino y humano en condiciones anabólicas y catabólicas

10 **[0037]** El objetivo de estos experimentos fue evaluar el efecto de aminoazúcares sobre la formación de cartílago en un cartílago articular en condiciones de ausencia de estimulación. Estos experimentos pudieron identificar posibles efectos condroanabólicos de estos azúcares como fármacos potenciales para la osteoartritis. El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), 100 ng/ml, sirvió como control positivo de estimulación anabólica de los explantes de cartílago.

15

MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS

[0038] Todos los reactivos usados fueron de calidad analítica. El medio de cultivo fue medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) con penicilina y estreptomycinina (Life Technologies, EE. UU.). La oncostatina M (OSM) recombinante humana fue de Sigma Aldrich (Reino Unido), mientras el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) recombinante humano fue de R&D Systems (Reino Unido).

AMINOAZÚCARES: PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS

25 **[0039]** Oligomin. Los quitooligosacáridos fueron producidos por Genis a escala de prueba (lote G061023). Brevemente, la quitina parcialmente desacetilada (DDA 45 %) se hidrolizó casi totalmente mediante quitinasa. La disolución se ultrafiltró (10 kDa) para eliminar la quitinasa y las sustancias insolubles y se secó por atomización.

30 **[0040]** T-ChOS. Las composiciones quitooligoméricas con una cantidad muy reducida de DP1-4 fueron producidas por Genis a partir de Oligomin a escala de prueba (lote G051128). El monómero (DP1 o *N*-acetilglucosamina) se eliminó y la cantidad de oligómeros de menor tamaño se redujo por ultrafiltración. El producto se secó por atomización. La *N*-acetilglucosamina (A) y la glucosamina (D) se adquirieron a YSK, Japón. Para el análisis de todos los aminoazúcares empleados se usó HPLC, con un sistema Beckman Gold. Se usó una columna TSK-oligo (TosoHaas, Japón), que separa los ChOS por su peso molecular (DP1, DP2, etc.). El disolvente fue hidróxido de amonio 5 mM, pH 10,0, la tasa de flujo de 0,5 ml/min, la absorbancia óptica de 205 nm, el volumen de inyección de 20 μ l y la concentración de los aminoazúcares de 10 mg/ml.

40 **[0041]** Para los experimentos con explantes de cartílago, las concentraciones de aminoazúcares probadas fueron las siguientes. Oligomin y T-ChOS, 50, 100, 200 y 400 μ g/ml en el medio. *N*-acetilglucosamina (A) y glucosamina (D), 200 y 400 μ g/ml en el medio. La combinación A + D, 200 μ g/ml de cada uno en el medio.

EXPLANTES DE CARTÍLAGO

Condiciones anabólicas

45

[0042] Se usan cultivos de explantes de cartílago bovino como modelo de enfermedades degenerativas del cartílago, lo que permite llevar a cabo experimentos en un modelo de prueba/ensayo robusto y simple, en el que puede investigarse el efecto de factores de crecimiento y fármacos sobre el metabolismo del cartílago (Olsen, A. K., y col., Anabolic and catabolic function of chondrocyte ex vivo is reflected by the metabolic processing of type II collagen. Osteoarthritis and Cartilage, 2007, 15(3): págs. 335-342).

PREPARACIÓN DE EXPLANTES DE CARTÍLAGO ARTICULAR

55 **[0043]** Las rodillas se abrieron en condiciones de semiesterilidad en una cámara de flujo laminar. Se retiraron cortes de cartílago articular superficial en una maniobra de un solo movimiento, retirando solo la capa más externa. Cortes demasiado profundos contendrían hueso subcondral / material condrosteo. Se recogieron explantes uniformes del fémur y de la tibia. Se evitaron explantes del cartílago situado en los cóndilos. Los explantes se

transfirieron a una placa de Petri que contenía PBS + pen/strep (penicilina/estreptomicina).

PREPARACIÓN Y CULTIVO

5 **[0044]** Los explantes se pesaron individualmente y se transfirieron a una placa de 96 pocillos estéril en condiciones de semisterilidad en una cámara de flujo laminar. Previamente, los pocillos se llenaron con 200 µl de PBS + pen/strep, para mantener los explantes húmedos después de pesarlos. Después se eliminó el PBS y se añadió a los pocillos un medio que contenía diferentes tipos y concentraciones de aminoazúcares, 200 µl/pocillo, de acuerdo con el planteamiento. Para cada prueba se usaron cuatro réplicas de explantes. Las placas se incubaron a 10 37 °C y el 5 % de CO₂, con agitación a 50 rpm. Las placas se cubrieron con una bolsa de plástico permeable al CO₂ para limitar/evitar la contaminación por esporas. El medio de acondicionamiento se renovó cada segundo-tercer día y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos que se almacenó a -20 °C hasta el final del experimento. Cada segundo-tercer día se añadió a los pocillos medio fresco con diferentes tipos y concentraciones de aminoazúcares, 200 µl/pocillo, de acuerdo con el planteamiento.

15 **[0045]** El último día del experimento (días 22-24), se retiraron los sobrenadantes y se midió la viabilidad celular mediante azul de Alamar, para investigar el número de células y su viabilidad. También el último día del experimento se procesó el cartílago para extraer las proteínas del mismo en diversos ensayos.

20 **[0046]** En los sobrenadantes se determinó la formación de colágeno de tipo II (PIINP) y la degradación de agrecano mediada por agrecanasa. Se usaron kits ELISA de Nordic Bioscience.

MEDICIONES DE LA VIABILIDAD CELULAR Y EL NÚMERO DE CÉLULAS

25 **[0047]** Para asegurar la acción específica y no tóxica de los aminoazúcares, se midió la actividad metabólica de los condrocitos mediante azul de Alamar, que previamente se ha demostrado que se correlaciona con el número de células y la viabilidad celular.

EVALUACIÓN DE LA RENOVACIÓN DEL CARTÍLAGO

30 **[0048]** *Degradación de agrecano mediada por agrecanasa.* Detección del fragmento de agrecano 374ARGS: el ensayo ELISA para detectar los fragmentos producidos por agrecanasa del extremo N-terminal 374ARGS combina dos anticuerpos monoclonales en un sistema ELISA sándwich. El procedimiento seguido es el descrito por Kardsal y col., *Arthritis & Rheumatism*, 2007, 56(5): págs. 1549-1558.

CONTENIDO TOTAL DE PROTEOGLUCANO - MEDICIÓN DE SGAG

35 **[0049]** Para la detección de glucosaminoglucanos sulfatados (sGAG), es decir, la liberación de sulfato de condroitina, se usó el ensayo de unión cuantitativa de colorante para el análisis *in vitro* de la liberación de GAG de 40 acuerdo con las instrucciones del fabricante (Wieslab, Suecia).

FORMACIÓN DE COLÁGENO DE TIPO II: ELISA PARA PIINP

45 **[0050]** La formación de colágeno de tipo II se mide mediante un ensayo ELISA específico a base de un anticuerpo que reconoce un epítipo en la molécula de PIINP por fuera del exón 2 (PIIANP). Por lo tanto, el ensayo ELISA no es específico para la forma IIA ni la forma IIB pero reacciona con las dos.

EXTRACCIÓN DEL CARTÍLAGO

50 **[0051]** El cartílago se sometió a extracción para determinar el contenido de diversas proteínas en el mismo, en comparación con las secretadas al medio.

[0052] Los explantes de cartílago se congelaron en nitrógeno líquido. Los explantes congelados se trituraron mediante un triturador de tejido Bessman de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El polvo se puso en un tubo de 14 ml mediante un escalpelo congelado. Se añadió un tampón de digestión helado (tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 con NaCl 0,1 M y Triton X-100 al 0,1 %) y la disolución se homogeneizó durante 30 segundos con un homogeneizador Polytron PT-MR 3000 (Brinkmann, Littau, Suiza). A continuación, el homogenado

se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se recogió y se almacenó a -80 °C hasta su análisis posterior.

CONTENIDO DE COLÁGENO TOTAL: MEDICIONES DE HIDROXIPROLINA

5

[0053] El colágeno total se evalúa midiendo el contenido de hidroxiprolina en los explantes mediante una versión modificada del procedimiento descrito por Podenphant (Podenphant, J., N. Larsen y C. Christiansen, An easy and reliable method for determination of urinary hydroxyproline, Clinica Chimica Acta, 1984, 142: págs. 145-148).

10

Resultados

Análisis de aminoazúcares

15 **[0054]** La figura 1 muestra la comparación de los quitooligosacáridos Oligomin y T-ChOS. En el caso de Oligomin, el principal componente fueron monómeros a trímeros (DP1-DP3) (58,4 %) y el contenido de DP4 y oligómeros mayores fue del 41,6 %.

20 **[0055]** En el caso de T-ChOS, no se detectó ningún monómero (DP1) y la fracción DP1-DP3 fue solo del 6,1 %. El octámero (DP8) fue el principal oligómero en T-ChOS. La principal fracción, del 93,9 %, estuvo compuesta por DP4 y oligómeros mayores.

25 **[0056]** El análisis de *N*-acetilglucosamina (A) y glucosamina (D) mediante HPLC reveló que el monómero (DP1) era el principal componente y no se detectaron oligómeros (resultados no mostrados).

30

Estudios con explantes de cartílago bovino

Efecto de diferentes aminoazúcares

30 *Condiciones anabólicas*

[0057] La viabilidad de los explantes de cartílago no se vio afectada por los aminoazúcares, no se observó ninguna diferencia significativa entre los diversos aminoazúcares y los grupos de control de acuerdo con el ensayo del azul de Alamar al final del tratamiento.

35

[0058] La liberación de sulfato de condroitina (ChS) al medio de los explantes se midió desde el día 3 al día 23 en intervalos de 2-3 días. Se observó un efecto de disminución relacionado con la dosis de Oligomin para el periodo tardío (días 10-23; regresión lineal). Al analizar la liberación acumulada de ChS para los días 10-23 (figura 2), se observó una clara disminución de la liberación de ChS inducida por Oligomin en dicho periodo ($p < 0,05$ para 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$ de Oligomin; reducción del 51 %). La glucosamina (D, 400 $\mu\text{g/ml}$) mostró el mismo efecto ($p < 0,05$). T-ChOS y *N*-acetilglucosamina (A) no mostraron ningún efecto significativo sobre la liberación acumulada de sulfato de condroitina en este periodo (figura 2).

40

Propéptido N-terminal del colágeno de tipo II (PIINP)

45

[0059] De todos los biomarcadores probados, la formación de colágeno de tipo II (concentración de PIINP) fue la más claramente afectada por los aminoazúcares. Esta se midió como la liberada de los explantes de cartílago al medio en un intervalo de 2-3 días. Solo T-ChOS mostró un marcado efecto relacionado con la dosis. Este efecto solo se observó en el periodo tardío de la incubación con los aminoazúcares. El día 20 *ex vivo*, no se observó ningún efecto con los diferentes aminoazúcares. La concentración de PIINP fue de entre 0,1 y 0,2 ng/ml por mg de cartílago. El día 22 se observó un claro aumento de PIINP relacionado con la dosis, pero solo para T-ChOS (figura 3). El efecto fue significativamente diferente de cero (M) a todas las concentraciones (50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$) y el efecto máximo fue de 0,62 ng/ml por mg de cartílago o 17 veces el control. No se observó ningún efecto para Oligomin en el mismo intervalo de concentraciones. Los monosacáridos glucosamina (D) y *N*-acetilglucosamina (A) no mostraron ningún efecto (figura 3). Por lo tanto, de todos los aminoazúcares probados, solo T-ChOS mostró un marcado efecto relacionado con la dosis sobre la expresión de PIINP.

50

55

[0060] Para el contenido de proteína extraída del cartílago no se encontró ninguna diferencia significativa entre los diversos aminoazúcares (o sus concentraciones) y el control. Sin embargo, se observó una disminución lineal significativa del contenido de proteína del cartílago al aumentar la concentración de Oligomin ($p = 0,027$; $N = 20$). Para Oligomin se observó un aumento lineal del contenido de proteína del cartílago al aumentar la liberación acumulada de sulfato de condroitina (ChS) ($p = 0,019$; $N = 20$).

Combinación de T-ChOS y glucosamina (T-ChOS+D)

[0061] En este conjunto de experimentos en explantes bovinos se probó glucosamina (200 $\mu\text{g/ml}$) en combinación con T-ChOS (50 y 400 $\mu\text{g/ml}$). Los controles fueron solo T-ChOS (50 y 400 $\mu\text{g/ml}$), solo Oligomin (50 y 400 $\mu\text{g/ml}$) o solo glucosamina. El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), 100 ng/ml, sirvió como control positivo de estimulación anabólica.

Pro péptido N-terminal del colágeno de tipo II (PIINP)

[0062] Se observó una considerable inducción de la liberación de PIINP por T-ChOS y la inducción de PIINP por T-ChOS + glucosamina (400 $\mu\text{g/ml}$ + 200 $\mu\text{g/ml}$) fue aún mayor. Esto resulta evidente al observar el efecto acumulativo (figura 4). La prueba t de Student reveló una diferencia significativa entre T-ChOS y T-ChOS+D en la liberación acumulada de PIINP (figura 4). La glucosamina sola no mostró ningún efecto. Oligomin 50-400 $\mu\text{g/ml}$ con o sin 200 $\mu\text{g/ml}$ de glucosamina (D) no mostró ningún efecto sobre la liberación de PIINP los días 20 y 24.

[0063] El efecto de T-ChOS, T-ChOS+D e IGF-1 sobre la liberación acumulada de sulfato de condroitina (días 17-24) se muestra en la figura 5. Tanto IGF-1 como T-ChOS+D mostraron un aumento significativo de la liberación acumulativa de sulfato de condroitina (días 17-24), pero ni T-ChOS ni glucosamina por sí solos tuvieron un efecto significativo (figura 5).

[0064] El ensayo de proteína extraída del cartílago el día 24 no reveló ningún efecto significativo de T-ChOS, T-ChOS+D ni IGF-1.

Estudios con explantes de cartílago humano

[0065] Se obtuvieron explantes de cartílago de la rodilla de una mujer de 40 años que padecía osteoartritis. Los explantes se mantuvieron en medio de crecimiento en condiciones anabólicas durante 25 días. Cada 2-3 días se añadió medio fresco. Los aminoazúcares (Oligomin, T-ChOS, A y D; diferentes concentraciones) se mantuvieron en el medio desde el día 0 hasta el día 25.

[0066] La degradación de agregano mediada por agreganasa (ensayo ELISA para el fragmento 374ARGS del agregano) no se vio afectada por los diferentes aminoazúcares el día 9.

[0067] La formación de colágeno de tipo II (concentración de PIINP) fue la más claramente afectada por los aminoazúcares. Esta se midió como la liberada de los explantes de cartílago al medio en un intervalo de 2-3 días (días 18-25). Solo T-ChOS mostró un marcado efecto relacionado con la dosis. Este efecto solo se observó en el periodo tardío de la incubación con los aminoazúcares (días 18, 20, 22 y 25; figura 6). El máximo efecto se observó el día 22, 1,37 ng/ml por mg de cartílago o 3,9 veces el control. Oligomin no mostró ningún efecto en el mismo intervalo de concentraciones. Glucosamina (D) no mostró ningún efecto. Por lo tanto, de todos los aminoazúcares probados, solo T-ChOS mostró un marcado efecto relacionado con la dosis sobre la expresión de PIINP.

[0068] Dado que YKL-40 se propone como receptor de los T-ChOS, se analizó la liberación de YKL-40 extracelular al medio los días 4, 11, 15, 20 y 25 en explantes tratados con 400 $\mu\text{g/ml}$ de T-ChOS, Oligomin y glucosamina (D). La figura 7 muestra el efecto de los diferentes aminoazúcares en este periodo. En el control se observó un descenso significativo de la expresión de YKL-40 entre los días 10 y 20. T-ChOS y, en menor medida, Oligomin mantuvieron una expresión elevada de YKL-40 en el periodo tardío (días 15-25). Se detectó una diferencia significativa el día 15, en que T-ChOS mantuvo una expresión elevada de YKL-40. La glucosamina no mostró ningún efecto (figura 7). La figura 8 muestra la relación entre la expresión de YKL-40 y PIINP en el periodo entre los días 15-25 para todos los grupos probados. Solo T-ChOS indujo la liberación de PIINP y mantuvo una expresión elevada de YKL-40 (una regresión lineal clara). Esta relación desapareció cuando el grupo de T-ChOS se excluyó de los datos (no hubo regresión lineal).

[0069] El contenido de sulfato de condroitina total (extracción de sulfato de condroitina) el día 25 no se vio afectado por los diversos aminoazúcares. Tampoco los niveles de proteínas totales (ensayo de proteínas de BioRad) ni los niveles de hidroxiprolina totales en los explantes el día 25.

5

[0070] Los aminoazúcares indujeron la viabilidad celular en los explantes de cartílago articular osteoartrítico humano el día 25 (ensayo de azul de Alamar). Se observó un efecto relacionado con la dosis para los tres aminoazúcares probados (regresión lineal; $p < 0,05$). El efecto fue mayor para Oligomin, después para T-ChOS y por último para glucosamina.

10

Ejemplo 2: Efecto de T-ChOS en combinación con glucosamina sobre la artritis reumatoide, usando el modelo de artritis reumatoide inducida por colágeno de tipo II en ratas

Introducción

15

[0071] Este ejemplo describe un estudio en animales de los posibles efectos de los quitoooligosacáridos usando un modelo de artritis reumatoide en ratas. La mezcla de ChOS probada es la composición T-ChOS. El objetivo de este estudio fue investigar si una combinación de glucosamina y T-ChOS tendría un efecto mayor que solo T-ChOS.

20

Materiales y procedimientos

[0072] Los animales usados fueron diez por grupo para los grupos con artritis inducida y cuatro por grupo para el grupo de control no inducido, alojados de cuatro a cinco por jaula. Para la inducción de la artritis, los animales se anestesiaron con isoflurano y se les administraron por vía subcutánea/intradérmica (SC/ID) inyecciones de 300 μ l del adyuvante incompleto de Freund (Difco, Detroit, MI, EE. UU.) con 2 mg/ml de colágeno bovino de tipo II (Elastin Products, Owensville, MO, EE. UU.) en la base de la cola y en dos puntos en la espalda los días 0 y 6. La dosificación de las diversas composiciones oligoméricas y/o monoméricas por vía oral (cada día, a intervalos de 24 horas) se inició el día 0 del estudio y se continuó hasta el día 16. Los grupos experimentales fueron según se muestran en la tabla 1:

30

Tabla 1

Grupo	N	Tratamiento, días 0-16
1	4	Controles normales + agua como vehículo
2	10	Artritis + agua como vehículo
3	10	Artritis + T-ChOS (7,1 mg/kg)
4	10	Artritis + D (21,4 mg/kg)
5	10	Artritis + T-ChOS (7,1 mg/kg) + D (21,4 mg/kg)
6	10	Artritis + T-ChOS (7,1 mg/kg) + D (14,3 mg/kg)
7	10	Artritis + T-ChOS (7,1 mg/kg) + D (28,6 mg/kg)

Los animales se sacrificaron el día 17 del estudio.

35

[0073] La evaluación de la eficacia se basó en mediciones del tobillo con el calibrador, expresadas como área bajo la curva (ABC), pesos terminales de las patas traseras y evaluación histopatológica de los tobillos y las rodillas. Para el análisis estadístico se llevaron a cabo diversos cálculos de inflamación para los datos del diámetro del tobillo y se aplicaron Anova y pruebas t (pruebas paramétricas y no paramétricas) de acuerdo con las recomendaciones del software (SigmaStat). Todos los animales sobrevivieron hasta la terminación del estudio.

40

Resultados

[0074] Las ratas de control de la enfermedad tratadas con el vehículo presentaron una ganancia de peso corporal de 14 g. La ganancia de peso corporal para los grupos de tratamiento no difirió significativamente de los controles de la enfermedad.

45

[0075] Se observó una reducción significativa del diámetro del tobillo en las ratas tratadas con T-ChOS + 21 mg/kg de D (grupo 5) (significativa, días 12-13), T-ChOS + 14 mg/kg de D (grupo 6) (día 12) o T-ChOS + 28 mg/kg

de D (grupo 7) (días 12, 15) en comparación con los controles de la enfermedad. El efecto de T-ChOS y glucosamina sobre el diámetro del tobillo acumulativo (días 9-17) se muestra en la figura 9. T-ChOS fue eficaz en solitario, así como en las tres combinaciones de concentración con glucosamina. La glucosamina sola no tuvo ningún efecto. El mayor efecto correspondió a T-ChOS + 21 mg/kg (grupo 5).

5

Las puntuaciones del daño en el cartílago del tobillo se redujeron significativamente hacia el valor normal en las ratas del grupo 5 (reducción del 27 %), en comparación con los controles de la enfermedad (figura 10). Solo el grupo 5 de ratas mostró una reducción significativa.

10 Las puntuaciones de la reabsorción ósea en el tobillo se redujeron significativamente hacia el valor normal en las ratas del grupo 5 (reducción del 22 %), en comparación con los controles de la enfermedad (figura 11). Solo el grupo 5 de ratas mostró una reducción significativa.

15 Las puntuaciones del paño sinovial en el tobillo se redujeron significativamente hacia el valor normal en las ratas del grupo 5 (reducción del 24 %), en comparación con los controles de la enfermedad (figura 12). Solo el grupo 5 de ratas mostró una reducción significativa.

20 La inhibición de los parámetros histopatológicos sumados para el tobillo fue significativa en los animales tratados con todos los grupos de aminoazúcares (figura 13). Las ratas del grupo 5 mostraron el mayor efecto (21 %; $p < 0,01$), después T-ChOS solo (grupo 3) (14 %; $p < 0,05$) y después el grupo 4 (12 %; $p < 0,05$), seguido por el grupo 6 (11 %) y el grupo 7 (10 %); véase la figura 13.

25 Las puntuaciones del paño sinovial en la rodilla se redujeron significativamente hacia el valor normal en las ratas tratadas con T-ChOS + 21 mg/kg de D (reducción del 42 %), en comparación con los controles de la enfermedad (figura 14). Solo T-ChOS + 21 mg/kg de D mostró una reducción significativa.

30 Las puntuaciones de la reabsorción ósea en la rodilla se redujeron significativamente hacia el valor normal en las ratas tratadas con T-ChOS + D21 (reducción del 41 %), en comparación con los controles de la enfermedad. Solo T-ChOS + 21 mg/kg de D mostró una reducción significativa (figura 15).

35 La inhibición de los parámetros histopatológicos sumados para la rodilla fue significativa para los animales tratados con T-ChOS (26 %; $p < 0,05$) y significativa para aquellos tratados con T-ChOS + 21 mg/kg de D (32 %; $p < 0,01$) en comparación con los controles de la enfermedad (figura 16). Las puntuaciones sumadas para la rodilla no aumentaron significativamente por el tratamiento con 21 mg/kg de D (14 % de aumento), T-ChOS + 14 mg/kg de D (10 %) ni T-ChOS + 28 mg/kg de D, en comparación con los controles de la enfermedad. T-ChOS + 21 mg/kg de D mostró el mayor efecto (figura 16).

40 **[0076]** En resumen, los resultados de este estudio indican que el tratamiento diario por vía oral con T-ChOS (7,1 mg/kg) + D (21,4 mg/kg) inhibe eficazmente el daño en el cartílago, la reabsorción ósea y la formación de paño sinovial en el tobillo. T-ChOS (7,1 mg/kg) + D (21,4 mg/kg) también inhibe la formación de paño sinovial y la reabsorción ósea en la rodilla, asociadas con el desarrollo de artritis por colágeno de tipo II en ratas. Otras dosis de T-ChOS en combinación con D-glucosamina tuvieron efectos significativos esporádicos sobre las mediciones del tobillo con el calibrador y T-ChOS en solitario mostró un ligero beneficio no significativo. Sin embargo, la D-glucosamina sola no tuvo ningún efecto beneficioso.

45

[0077] En conclusión, T-ChOS en combinación con glucosamina mejoró los efectos de T-ChOS contra la artritis reumatoide en el modelo de artritis reumatoide inducida por colágeno de tipo II en ratas. La concentración más eficaz de glucosamina en la combinación con T-ChOS fue de 21 mg/kg de rata.

50 Ejemplo 3: Efecto de Oligomin, T-ChOS, T-ChOS + N-acetilglucosamina y T-ChOS + glucosamina en un paciente humano de artritis reumatoide

55 **[0078]** Una mujer con diagnóstico de artritis reumatoide ha estado usando quitoooligómeros producidos por Genis ehf ("Oligomin") durante varios años para aliviar el dolor. Ella misma ha evaluado la puntuación del alivio de su dolor y movilidad de manera que 0 indica ningún alivio y 10 es un alivio total. Su puntuación de alivio para Oligomin (2.200 mg/día) es de 7.

[0079] Se pidió a la paciente que cambiara a T-ChOS (700 mg/día). Su estado empeoró gradualmente. El día 20, su puntuación de alivio se redujo a 5. El día 32 del consumo de T-ChOS se añadió *N*-acetilglucosamina (1.500 mg/día) a T-ChOS. Como resultado, su estado mejoró. A los 12 días de añadir *N*-acetilglucosamina a T-ChOS, su puntuación de alivio subió de 5 a 7 (figura 17). Trece días después, su estado seguía sin cambios (puntuación = 7).
 5 Entonces cambió de *N*-acetilglucosamina a glucosamina (1.500 mg/día), todavía en combinación con T-ChOS (figura 17). A los 16 días, su estado mejoró ligeramente, lo que resultó en un aumento de 7 a 8. Ahora, ha estado usando esta combinación durante más de un año y su estado sigue siendo el mismo con una puntuación de alivio todavía de 8.

10 Conclusiones

[0080] Los ejemplos anteriores muestran que T-ChOS es una combinación específica de composiciones de quitooligosacáridos parcialmente desacetilados, en que los monómeros se han eliminado de la combinación y los dímeros y los trímeros se ha reducido a menos del 10 % con el fin de aumentar la afinidad de unión a las proteínas
 15 similares a quitinasa. Esto se muestra en el análisis de aminoazúcares del ejemplo 1 (figura 1).

[0081] Oligomin, que es una mezcla cruda de ChOS con grandes fracciones de monómeros, dímeros y trímeros, no tiene las propiedades bioactivas mostradas por T-ChOS. La composición se muestra en el ejemplo 1, figura 1. En el ejemplo 1 se demuestra que Oligomin no induce la síntesis de colágeno de tipo II en explantes de
 20 cartílago, mientras T-ChOS muestra un aumento de la liberación de PIINP de 15-20 veces.

[0082] Las composiciones de oligosacáridos tienen mayor actividad protectora/regeneradora de tejidos que otros aminoazúcares y composiciones de quitooligosacáridos. En el ejemplo 1 se muestra la liberación de PIINP de
 25 explantes de cartílago (figura 3).

[0083] La actividad de T-ChOS está mediada por su interacción con las quitinasas de mamíferos de la familia 18 (proteínas similares a quitinasa). Esto se demuestra en el ejemplo 1, T-ChOS ejerce su actividad de formación de colágeno a través de la interacción con YKL-40 (figuras 7 y 8). Oligomin no muestra un efecto semejante (figura 8)
 30 en el intervalo de concentraciones probado.

[0084] La actividad de T-ChOS puede reforzarse en combinación con el monómero glucosamina. Esto se demuestra en el ejemplo 1, en el que la liberación de PIINP de los explantes de cartílago es potenciada por T-ChOS. La combinación de T-ChOS y glucosamina también es significativamente más eficiente que T-ChOS solo (figura 4). En el ejemplo 1, en la liberación de sulfato de condroitina (ChS) de los explantes de cartílago, el efecto de T-ChOS +
 35 glucosamina es similar al efecto del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) (figura 5). Además, en el ejemplo 2, figuras 19-26, la administración por vía oral de T-ChOS y glucosamina conjuntamente en un modelo de artritis reumatoide en ratas es superior a T-ChOS o glucosamina solos.

[0085] T-ChOS y glucosamina ejercerán su actividad *in vivo* después de su administración por vía oral. Esto se demuestra en el ejemplo 3, figuras 4-8, en que la administración por vía oral de T-ChOS y glucosamina conjuntamente tiene un efecto protector de tejidos significativo en el modelo de artritis reumatoide en ratas.
 40

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el tratamiento de la artritis reumatoide que comprende:
- 5 - quitooligómeros terapéuticamente activos de *N*-acetilglucosamina (A) y glucosamina (D), en que los quitooligómeros comprenden heteroquitooligómeros que cumplen los criterios siguientes:
- dichos oligómeros tienen una longitud de cadena en el intervalo de 5-20 restos monoméricos,
 - cada cadena oligomérica puede tener dos restos de *N*-acetilglucosamina (AA) en uno o en los dos extremos de
- 10 la cadena oligomérica,
- la parte interna restante del oligómero tiene al menos una cantidad suficiente de restos D para evitar que la secuencia de dicha cadena interna comprenda un resto de *N*-acetilglucosamina (A) adyacente a otro resto de *N*-acetilglucosamina (como AA),
- 15 - en combinación con glucosamina,
- en que la relación entre monómeros y oligómeros está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1, y
- 20 - en que el grado de desacetilación (DD) de dichos quitooligómeros terapéuticamente activos está en el intervalo del 30-60 %.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en que dicha relación entre monómeros y oligómeros está en el intervalo de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 4:1.
- 25 3. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el biomaterial comprende además un componente seleccionado de entre cualquiera de los siguientes: fosfatos de calcio, incluido hidroxapatito, sulfato de calcio, tripolifosfato de sodio, alginato, colágeno, ácido hialurónico y polímero de quitosano.
- 30 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, formulada en una forma seleccionada del grupo que consta de un polvo, una suspensión, un gel, un sol, un aerosol, una pasta, una película, una espuma, un comprimido y una cápsula.
- 35 5. La composición de la reivindicación 4 que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

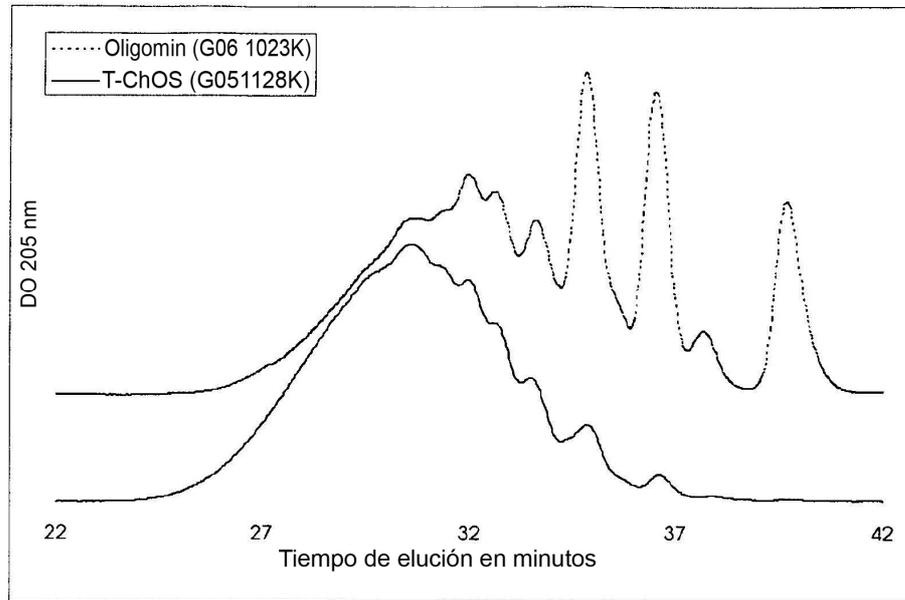


Fig 1.

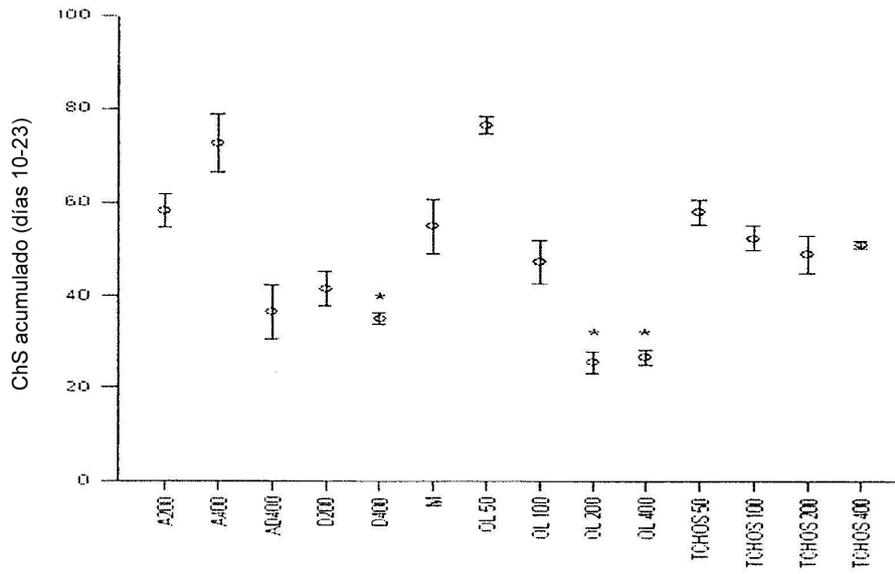


Fig.2

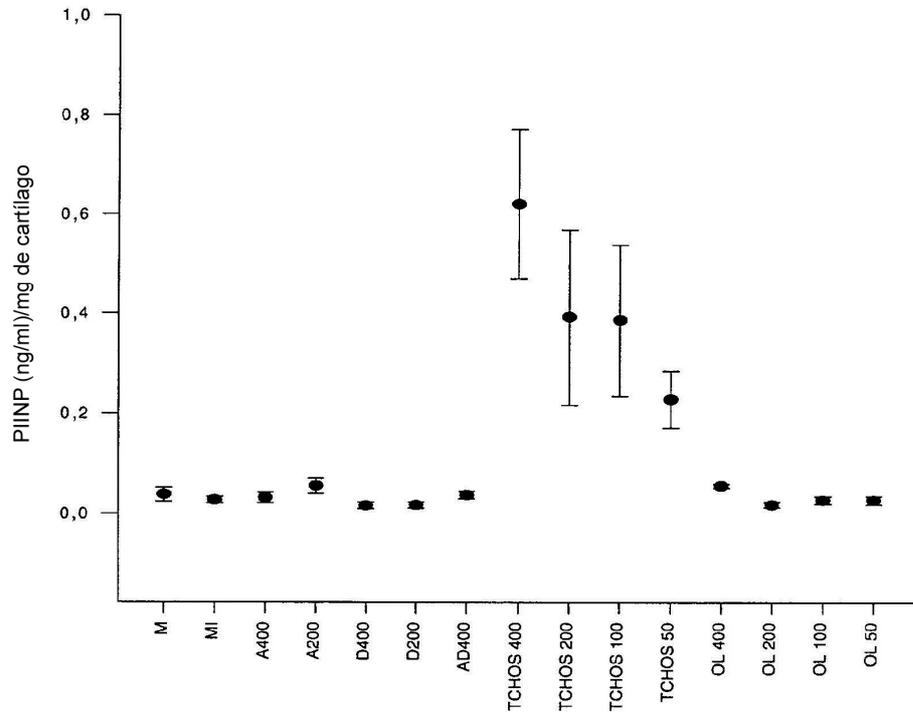


Fig.3

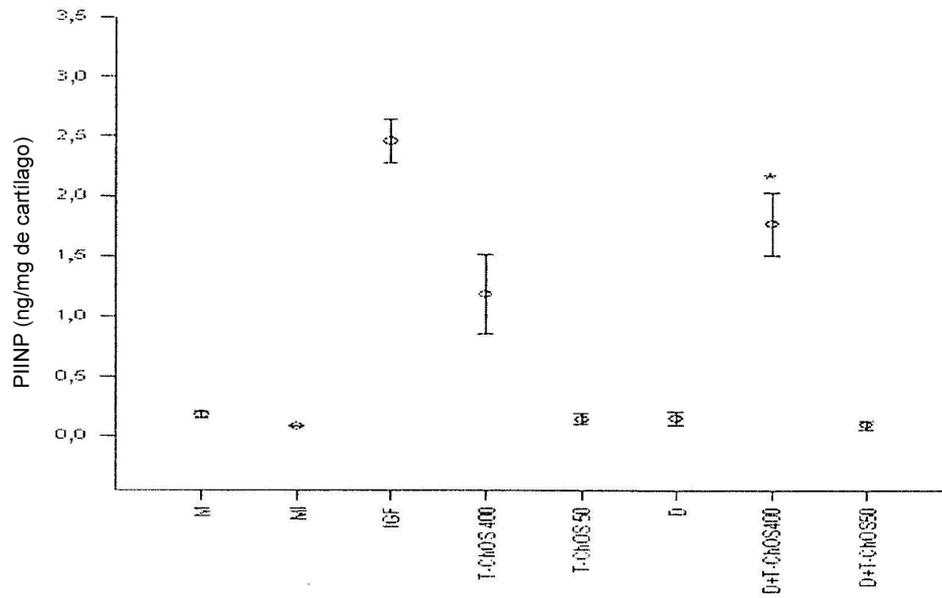


Fig 4.

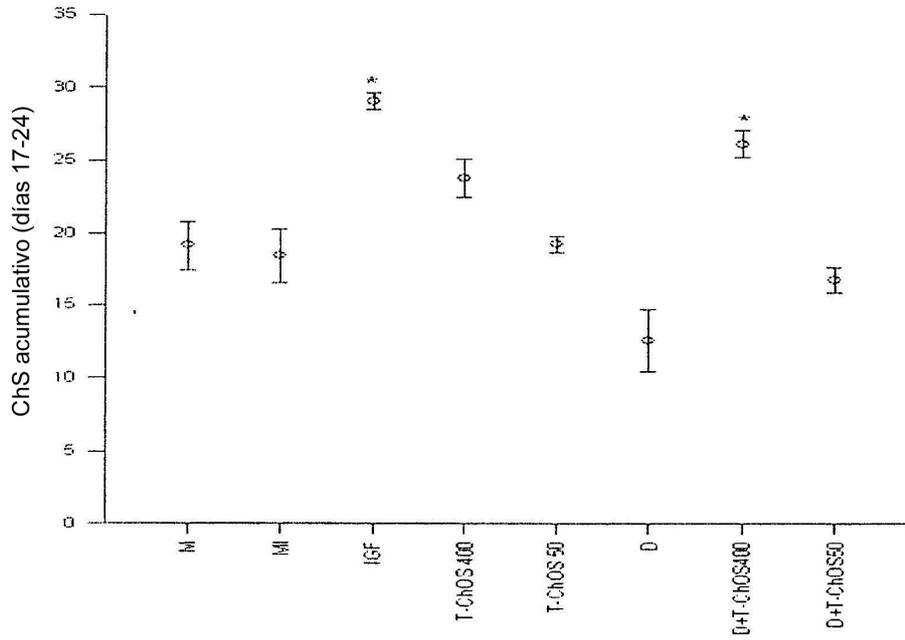


Fig. 5

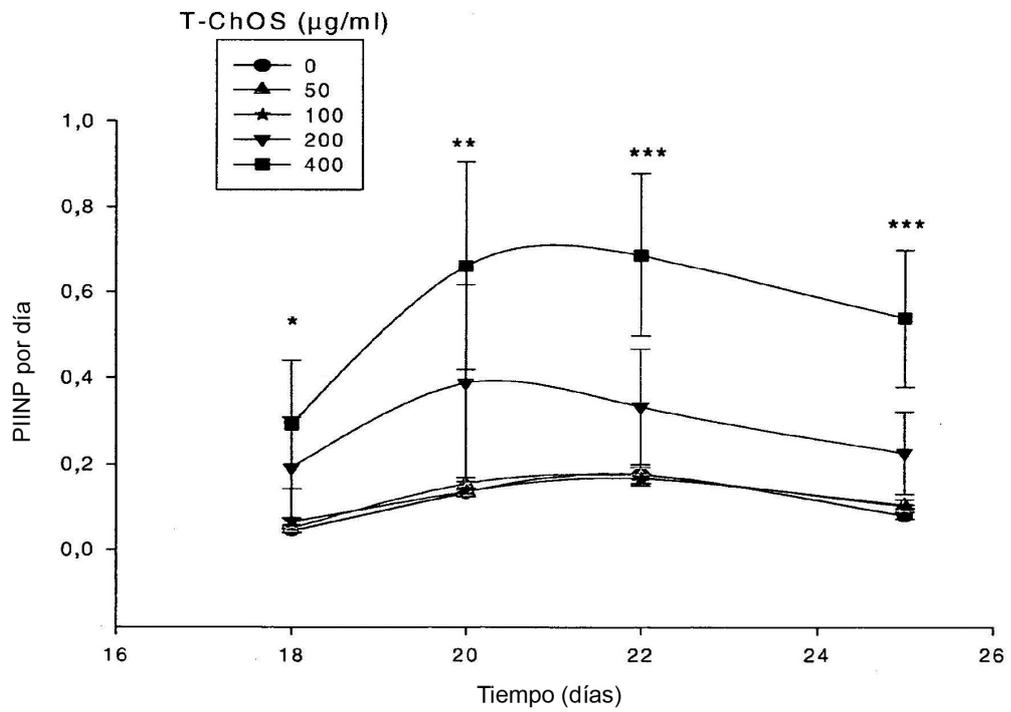


Fig. 6

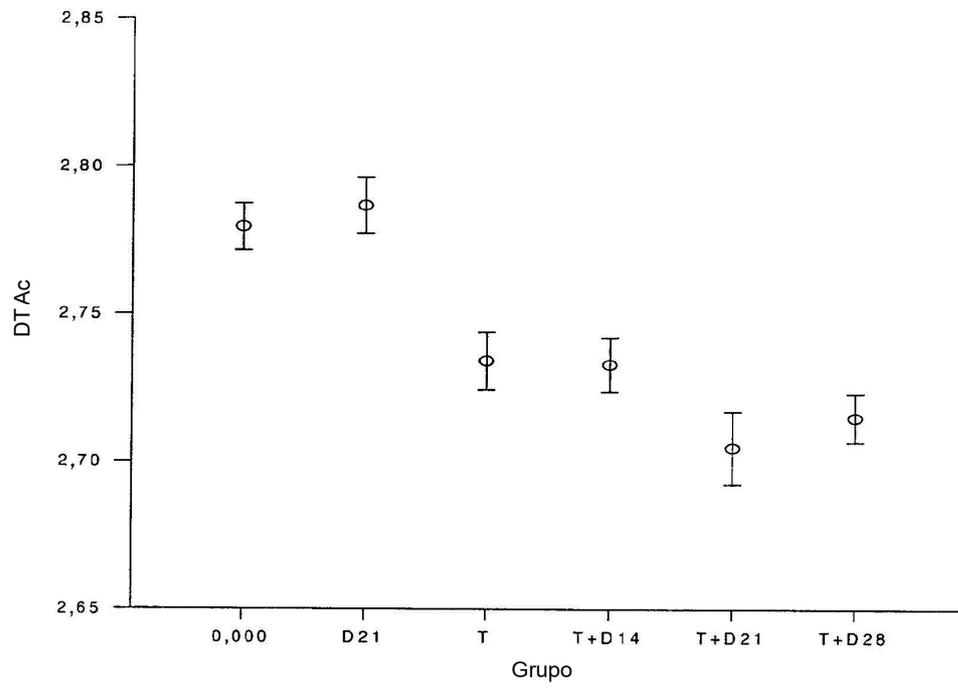


Fig.9

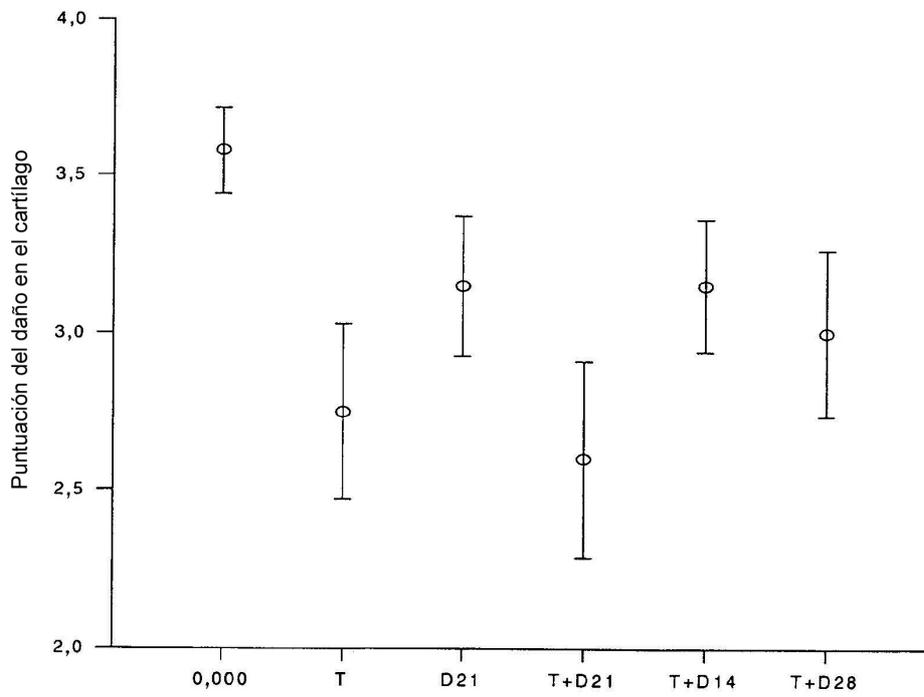


Fig.10

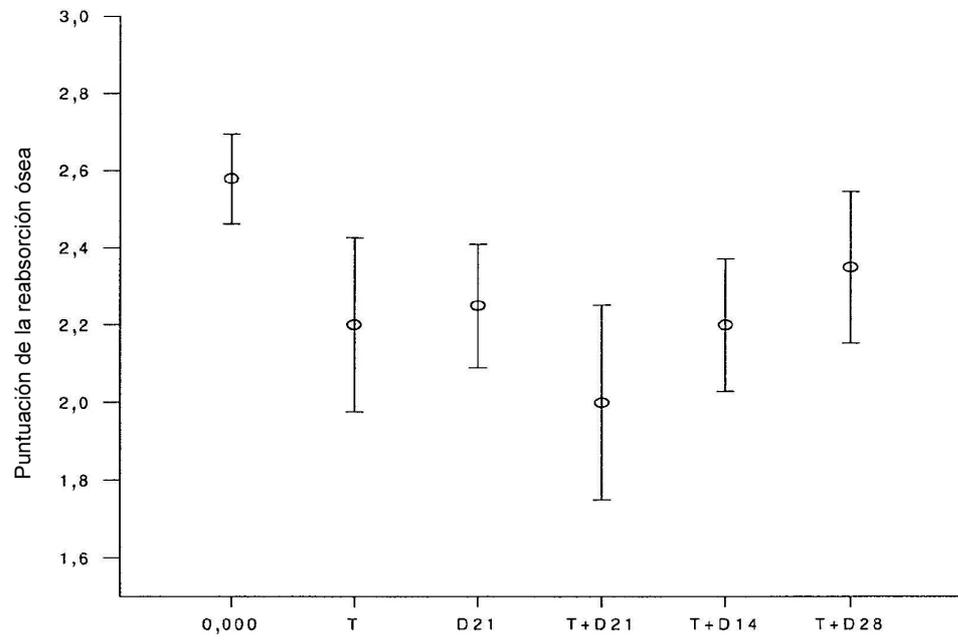


Fig.11

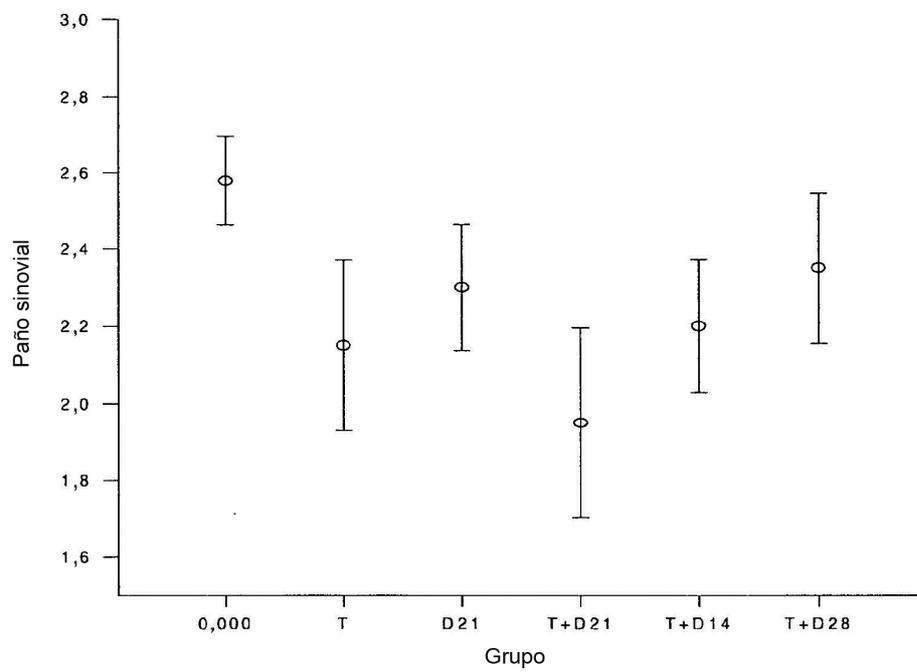


Fig.12

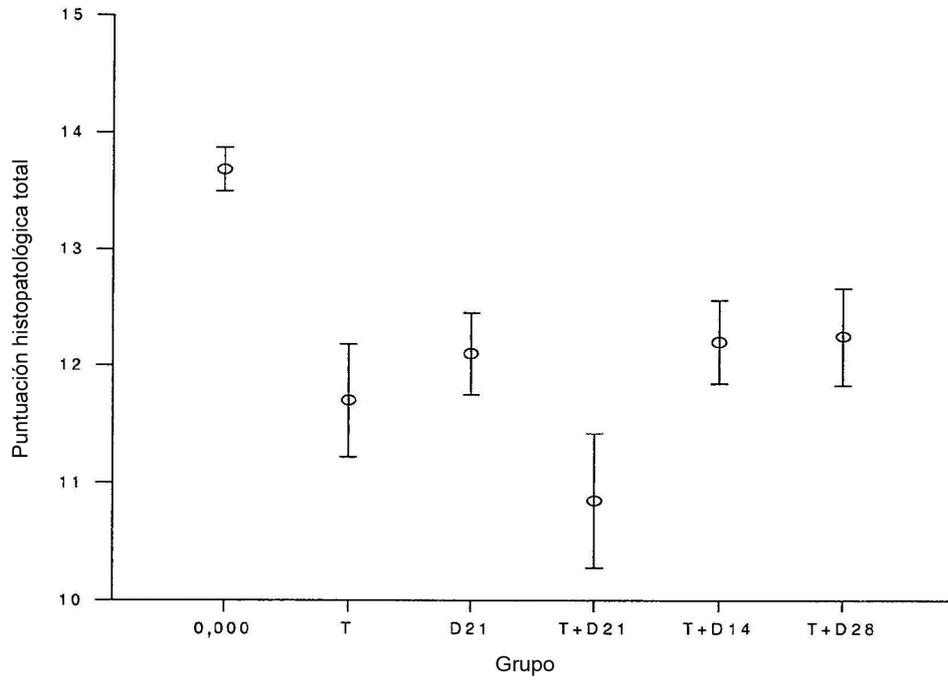


Fig.13

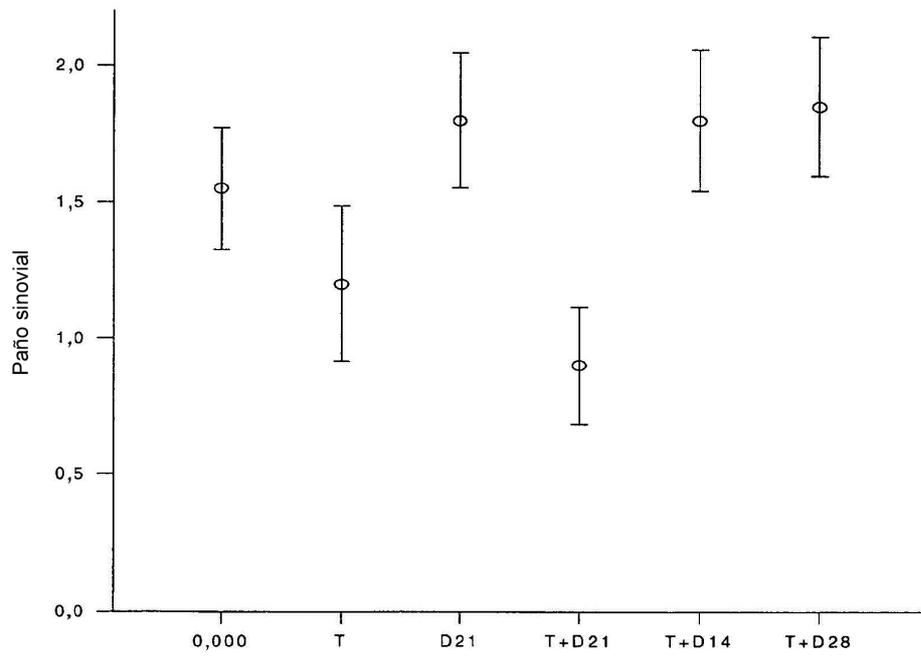


Fig 14

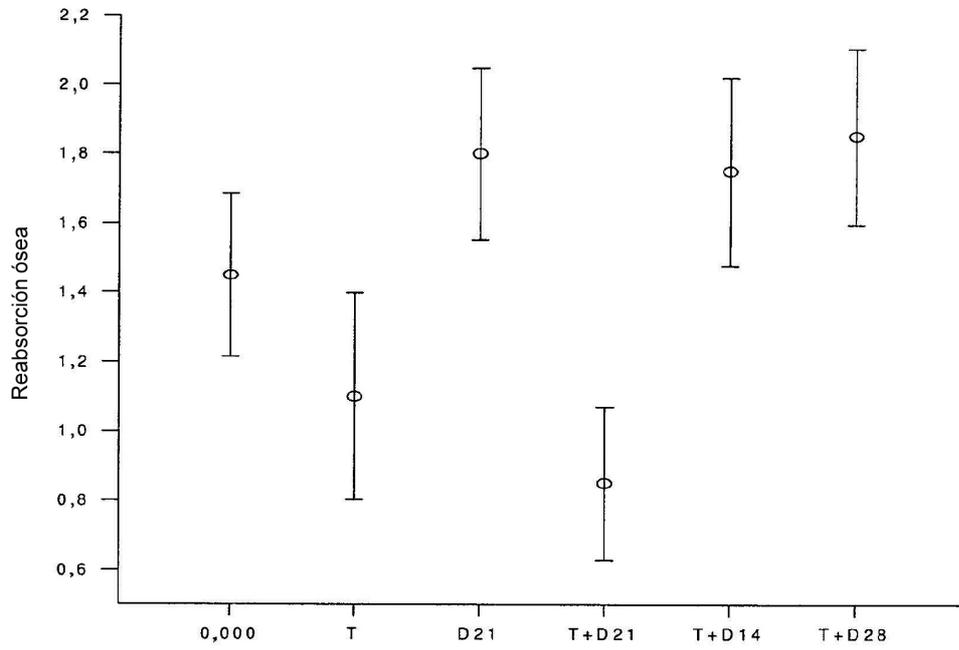


Fig.15

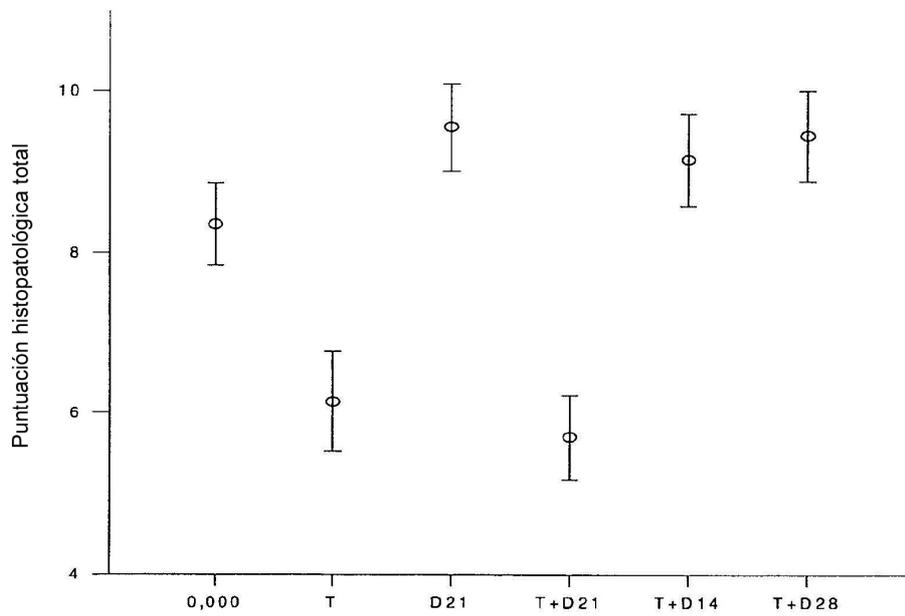


Fig.16

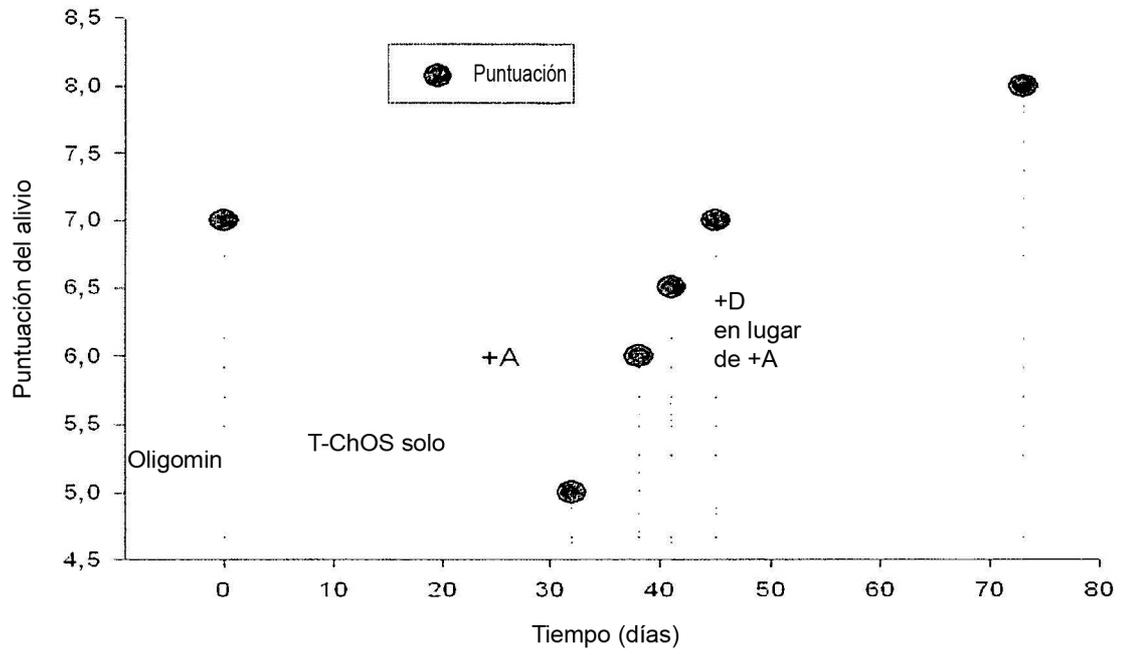


Fig.17