

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 017**

51 Int. Cl.:

A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
C12P 13/12 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014** **PCT/EP2014/051308**
87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014** **WO2014114706**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014** **E 14704531 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016** **EP 2948160**

54 Título: **Composiciones que contienen sulfato de condroitina, nattocinasa y compuestos de sulfhidrilo para su uso en el tratamiento de inflamación**

30 Prioridad:

25.01.2013 IT MI20130117

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MIRAGLIA, NICCOLÒ;
ROSSINI, MAURO;
BIANCHI, DAVIDE y
TRENTIN, ANTONELLA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 616 017 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

Composiciones que contienen sulfato de condroitina, nattocinasa y compuestos de sulfhidrilo para su uso en el tratamiento de inflamación

Sumario de la invención

- 5 La invención está definida por las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden sulfato de condroitina (SC), enzimas o mezclas enzimáticas que poseen actividad proteolítica, tanto solas como en presencia de compuestos de sulfhidrilo, y a su uso en el tratamiento y la prevención de la artrosis y de procesos inflamatorios agudos y crónicos correlacionados, o como composiciones nutracéuticas para el mantenimiento del bienestar musculoesquelético en seres humanos y en animales.
- 10 Dichas combinaciones aumentan la absorción intestinal del SC cuando se administran por vía oral. El efecto de dichas combinaciones es ejercido sobre una amplia variedad de pesos moleculares de SC, incluyendo muestras que consisten en oligosacáridos caracterizados por unos pesos moleculares muy bajos (1-10 kDa), para los cuales ya se conoce una biodisponibilidad mayor que para las muestras con un mayor peso molecular.

Antecedentes técnicos

- 15 El SC es recomendado por la EULAR (la European League against Rheumatism) como un fármaco sintomático de acción lenta para la artrosis (SYSADOA) en el tratamiento de la artrosis de la rodilla, la cadera y la mano sobre la base de numerosas pruebas clínicas. El SC también se usa como un nutracéutico, solo o combinado con otros ingredientes, en composiciones que ejercen actividades antiinflamatorias tanto a nivel local como sistémico.

- 20 El sulfato de condroitina (SC) es un polisacárido perteneciente a la clase de los glucosaminoglucanos (GAG), que está presente tanto en vertebrados como en invertebrados, y consiste en secuencias de disacáridos formadas por un residuo de ácido glucurónico (GlcA) que se alterna con un residuo de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), unidos entre sí por enlaces beta 1-3 y sulfatados en diferentes posiciones. Los disacáridos están a su vez unidos entre sí por enlaces beta 1-4. El SC consiste principalmente en unidades de disacáridos monosulfatados en la posición 4 o en la posición 6 del GalNAc (denominado disacárido A y C, respectivamente). Los SC A y C están representados en diferentes porcentajes, dependiendo del origen del polisacárido. Los disacáridos no sulfatados y los disacáridos disulfatados portadores de dos grupos sulfato unidos al átomo de oxígeno en varias posiciones también están presentes en el SC en un menor grado, variable, dependiendo de las fuentes animales específicas: en la posición 2 del GlcA y en la posición 6 de la GalNAc (disacárido D), en la posición 2 del GlcA y en la posición 4 de la GalNAc, o en las posiciones 4 y 6 de la GalNAc (disacárido E) (Volpi N.J. Pharm. Pharmacol. 61, 1271, 2009. Volpi N. J. Pharm. Sci. 96, 3168, 2007. Volpi N. Curr. Pharm. Des. 12, 639, 2006).
- 30

Los SC de diferentes orígenes animales también se caracterizan por diferentes pesos moleculares.

- Los SC procedentes de animales terrestres, por ejemplo, tienen unos valores de masa molecular similares entre sí, pero diferentes de los que son procedentes de especies de peces, que tienen unos valores de masa molecular mayor. Los SC de origen terrestre tienen un peso molecular medio que varía entre 14 y 26 kDa, mientras que los SC de origen marino, procedentes de calamares, de peces cartilaginosos y óseos, tienen un peso molecular medio que supera los 50 kDa.
- 35

- Además de los SC de origen animal, algunos productos de SC se describen como basados en esqueletos de polisacáridos de origen bacteriano posteriormente modificados mediante una síntesis para obtener polímeros análogos al SC natural. Estos SC biotecnológicos de origen bacteriano-sintético superan algunos de los inconvenientes relacionados con el origen animal de los SC extraídos, tales como la posible presencia de virus y/o de priones o de otras macromoléculas potencialmente alergénicas entre las impurezas residuales; el alto contenido en proteína animal en el producto final; la incompatibilidad de los productos animales con restricciones religiosas o dietéticas; y las limitadas fuentes disponibles para cumplir la creciente demanda mundial.
- 40

- Algunos ejemplos de SC de origen bacteriano-sintético se describen, por ejemplo, en el documento EP 1304338, en el que el polisacárido capsular de la cepa de *E. coli* O5:K4:H4 es sulfatado químicamente después de una extracción y una hidrólisis del polímero original. Otros ejemplos de SC bacteriano-sintético se desvelan en el documento WO 2012/152872, en el documento WO 2012/159655 y en el documento WO 2013/174847, en los que un polisacárido capsular bacteriano es sulfatado químicamente para obtener un SC similar al de origen animal.
- 45

- Finalmente, algunos ejemplos de SC de bajo peso molecular se han obtenido mediante la despolimerización de polisacáridos extraídos (Cho SY y col. Biol. Pharm. Bull. 27, 47, 2004, Das A. y col. Osteoart. Cartil. 8, 343, 2000), y de polisacáridos de origen bacteriano (documento WO 2013/174847, documento WO 2012/152872). El menor tamaño de estos tipos de SC da lugar a una mejor absorción oral, mientras se conservan muchas de las actividades conocidas del SC natural.
- 50

- Cuando se administra por vía oral, el SC es absorbido por la mucosa intestinal en el intestino delgado y en el tracto distal. El SC es absorbido parcialmente en forma de un polisacárido de alto peso molecular en el intestino delgado,
- 55

mientras que la mayor parte es absorbida en forma de oligosacáridos en el ciego y el colon (Lauder R.; Compl. Ther. Med. 17, 56-62, 2009). Estos oligosacáridos son generados mediante la despolimerización parcial del polisacárido original por parte de enzimas hidrolíticas producidas por la flora intestinal en el tracto inferior del aparato digestivo.

5 Aunque el mecanismo implicado en la absorción intestinal del polisacárido constituyente del SC no está completamente claro, se cree que la absorción a través del espacio paracelular del epitelio intestinal es cuantitativamente significativa, como es el caso para la mayoría de las macromoléculas; los fragmentos de oligosacáridos del SC también son absorbidos por esta vía. Las uniones estrechas, que forman una barrera que limita la absorción de moléculas grandes cuyo transporte no implica la mediación de portadores moleculares específicos a través de la mucosa intestinal, están presentes a este nivel.

10 La absorción del SC de alto peso molecular se estima que supone aproximadamente un 1-5 %. Como se ha establecido anteriormente, la mayor parte del SC absorbido consiste en oligosacáridos que derivan de su digestión enzimática por parte de la condroitinasa producida por la flora microbiana intestinal. Teniendo en cuenta la absorción de oligosacáridos, sin embargo, la captación total de SC por parte de la mucosa intestinal no supone más del 20-23 % del polisacárido ingerido (Lauder R.; Compl. Ther. Med. 17, 56-62, 2009 - Barthe L. y col. 15 *Arzneimittelforsch./Drug Res.* 2004; 54: 286-92).

En general, la absorción del SC después de una administración oral sigue siendo un problema, y cualquier procedimiento capaz de aumentar la absorción intestinal de dicho glucosaminoglucano está muy de actualidad.

20 La bromelaína es una mezcla de proteasas de cisteína extraída a partir del fruto y del tallo de la piña (*Ananas comosus*), una planta perteneciente a la familia *Bromeliaceae*. La principal fuente para su extracción es el tallo de la fruta, donde su concentración es la más alta. Pueden distinguirse cuatro fracciones distintas de esta mezcla o, según una caracterización analítica más elegante llevada a cabo mediante una espectrometría de masas, ocho constituyentes proteolíticos, todos con una actividad proteolítica comparable. Por esta razón, normalmente se usa la mezcla en la forma natural. La bromelaína está clasificada como una endopeptidasa perteneciente a la subfamilia de las peptidasas C1A (nomenclatura MEROPS). Además de la mezcla de proteasa, el extracto contiene peroxidasa, 25 fosfatasa ácida y glucosidasa. La masa molecular de los ingredientes varía entre 8 y 28,5 kDa. La concentración de bromelaína se expresa a menudo en unidades proteolíticas (unidades GDU o unidades internacionales, UI) en lugar de en unidades de peso.

30 En vista de sus características proteolíticas, la bromelaína tiene una actividad similar a la proteasa pancreática, y por lo tanto favorece la digestión. Se usa en la dispepsia junto con extractos pancreáticos. La bromelaína también divide las grasas de cadena larga.

35 La bromelaína también posee otras actividades farmacológicas, las más importantes de las cuales son una potente actividad antiinflamatoria que la hace eficaz el tratamiento de estados inflamatorios de los tejidos blandos asociados a traumatismos o reacciones postoperatorias e inflamaciones locales. Se ha demostrado que la bromelaína expresa su actividad mediante el aumento de la biosíntesis de las prostaglandinas antiinflamatorias (tales como las prostaglandinas E2), y por el contrario, mediante la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas proinflamatorias.

Otras actividades farmacológicas de la bromelaína incluyen una acción anti-trombótica y pro-fibrinolítica, una actividad hipotensora y la capacidad para inducir la regresión de la placa aterosclerótica. También se han descrito sus capacidades sinérgicas en tratamientos antibióticos y antitumorales.

40 La bromelaína se caracteriza por una buena biodisponibilidad oral, estimada en aproximadamente un 40 %, una característica rara para las proteínas. Además, la mayor parte de la bromelaína no absorbida permanece intacta, y es capaz de expresar su actividad enzimática en la luz intestinal, ya que no es fuertemente atacada por los jugos gástricos ni por las cistatinas presentes en la saliva. En vista de sus características, se parece a la papaína y a la 45 ficaína, unos extractos similares que derivan de la papaya (*Carica papaya*) y de la higuera (*Ficus carica*), respectivamente.

La nattocinasa es una enzima aislada inicialmente a partir de *natto*, un alimento tradicional japonés basado en semillas de soja hervidas fermentadas con una variedad particular de *Bacillus subtilis*, *B. subtilis natto*.

50 La nattocinasa es una proteasa de serina de aproximadamente 32 kDa que posee una potente actividad fibrinolítica. Su homología con la subtilisina supera el 72 %. Sus actividades fibrinolíticas comprenden una acción directa en la fibrinólisis, junto con una capacidad para inducir un aumento en la producción de urocinasa y de plasmina. La nattocinasa se caracteriza por una estabilidad relativamente alta frente a la temperatura y unos bajos valores de pH; esta característica proporciona a la proteína una buena resistencia en el entorno gástrico, permitiendo su uso mediante una administración oral.

55 Sus características de relativa estabilidad en el entorno gástrico y su actividad proteolítica hacen que la enzima pueda presentar analogías con la bromelaína en el uso aquí ilustrado.

El documento US 5679344 desvela composiciones nutrientes para su uso en trastornos particulares que contienen glucosamina y enzimas proteolíticas que tienen unas propiedades antiinflamatorias. Las composiciones contienen al menos una proteasa y al menos una proteasa estabilizada con ácido.

- 5 El documento US 5888514 desvela composiciones que contienen cartílago, enzimas proteolíticas, sulfato de glucosamina y sulfato de condroitina, junto con vitaminas y extractos vegetales, para su uso en el tratamiento de la inflamación de los huesos y las articulaciones.

Descripción de la invención

- 10 Ahora se ha averiguado que la combinación de SC con bromelaína y la presencia simultánea de una actividad potenciadora de la bromelaína tal como cisteína, metionina, glutatión u otros compuestos de sulfhidrilo, aumenta su absorción en el intestino delgado.

También se ha averiguado que la nattocinasa tiene un efecto incluso más sorprendente sobre la biodisponibilidad del SC, que es aumentada hasta más del 250 %.

- 15 El objeto de la presente invención es una composición que comprende sulfato de condroitina y una o más proteasas, y opcionalmente o un compuesto de sulfhidrilo, con la condición de que cuando la proteasa sea distinta a la nattocinasa, esté presente el compuesto de sulfhidrilo.

"Compuesto de sulfhidrilo" significa aquí un aminoácido natural o sintético, o un péptido pequeño u otro compuesto que comprende al menos un grupo sulfhidrilo. El compuesto de sulfhidrilo se selecciona preferentemente entre metionina, cisteína, homocisteína, S-adenosilmetionina, acetilcisteína, glutatión reducido u oxidado y S-acetilglutatión.

- 20 En las composiciones según la invención, la proporción de sulfato de condroitina/proteasa/compuesto de sulfhidrilo es de 1,0/0,05-0,8/0,001-0,05.

El sulfato de condroitina tiene preferentemente un peso molecular que varía entre 1 y 95 kDa, más preferentemente de entre 4 y 50 kDa.

- 25 El sulfato de condroitina se extrae preferentemente de origen animal. El SC puede obtenerse por sulfatación química del polisacárido capsular K4 de *E. coli* después de la eliminación de los residuos de fructosa mediante una hidrólisis, según se describe en el documento EP 1304338, en el documento WO 2012/152872, en el documento WO 2012/159655, o por sulfatación química y la despolimerización ácida o radicalaria posterior del polisacárido capsular K4 de *E. coli* después de la eliminación de los residuos de fructosa mediante una hidrólisis según se describe en el documento WO 2013/174847 y en el documento WO 2012/152872. Como alternativa, el SC puede obtenerse por sulfatación química del polisacárido capsular a partir de una cepa modificada genéticamente de *E. coli* (por ejemplo, la DSM23644), en la que el polisacárido está originalmente desprovisto de residuos de fructosa (documento WO 2012/159655). El tamaño molecular del SC así obtenido, también puede reducirse posteriormente mediante una despolimerización ácida o radicalaria, como en el documento WO 2013/174847.

- 35 La proteasa se selecciona preferentemente entre bromelaína, papaína, ficaina y nattocinasa. Se prefiere la nattocinasa. Una realización preferida de la invención proporciona consecuentemente composiciones que comprenden sulfato de condroitina y nattocinasa, en ausencia de un compuesto de sulfhidrilo. La invención también concierne al uso de nattocinasa para mejorar la permeabilidad intestinal del sulfato de condroitina.

- 40 Las composiciones según la invención también pueden contener uno o más principios activos usados en la prevención o en el tratamiento de estados inflamatorios agudos y crónicos y/o una o más sustancias nutracéuticas usadas para el mantenimiento del bienestar musculoesquelético en seres humanos y en animales.

Los principios activos pueden seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que consiste en clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, N-acetilglucosamina, ácido hialurónico, aminoácidos, colágeno, colágeno hidrolizado, ácidos grasos poliinsaturados, queratina, metilsulfonilmetano, folatos, folatos reducidos, vitaminas, vitaminas del Grupo B, S-adenosil-metionina (SAME), ácido ascórbico y ascorbato de manganeso.

- 45 Las composiciones también pueden contener uno o más excipientes farmacéuticamente o nutracéuticamente aceptables.

Todos los ingredientes, habitualmente combinados con sulfato de condroitina, tales como glucosamina y metilsulfonilmetano (MSM), pueden ser añadidos a dichas preparaciones.

- 50 Algunos excipientes farmacéuticamente o nutracéuticamente aceptables son, por ejemplo, celulosa microcristalina, ácido esteárico, estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal, etil celulosa, metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, sales acuosas de goma laca, alginato de sodio, almidón, almidones modificados, copolímeros de ácido metacrílico, maltodextrinas y polioles.

Las composiciones según la invención se administran preferentemente por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, de cápsulas de gelatina blanda, de comprimidos, de granulados, de bebidas en forma líquida o de bebidas en polvo para ser reconstituídas. La dosis diaria de SC puede variar entre 400 mg y 3.600 mg en el ámbito nutracéutico, y la dosis diaria habitual como medicamento es de 1.200 mg.

5 **Descripción de la figura**

La Figura muestra la permeabilidad a través de la mucosa intestinal de rata del sulfato de condroitina bovino, de 20 kDa (rombos), del sulfato de condroitina de bajo peso molecular, de 9 kDa (cuadrados), y del sulfato de condroitina de alto peso molecular, de 40 kDa (triángulos).

10 **Parte experimental**

La permeabilidad del SC se ha ensayado en un modelo *in vitro* en el que se extirpó una mucosa intestinal de rata del animal inmediatamente después de la eutanasia y se colocó en una cámara de Ussing sumergida en un tampón adecuado en la interfase de dos compartimentos, con el lado de la mucosa originalmente expuesto hacia la luz intestinal hacia uno de los compartimentos, denominado compartimento donante, y la parte basal orientada hacia el otro, denominado compartimento aceptor.

El SC se puso en el compartimento donante en presencia o en ausencia de los demás ingredientes de la combinación, y se determinó la presencia de polisacáridos en el compartimento aceptor después de un periodo durante el cual el SC cruzó al compartimento aceptor a través de la membrana que consiste en mucosa intestinal de rata.

La técnica experimental usada para la evaluación de la permeabilidad intestinal del SC en sus diversas combinaciones se describirá ahora con más detalle. Se sacrificaron ratas de Lewis con un peso de 150-170 g mediante inhalación de CO₂ e inmediatamente se extirpó el intestino delgado, se lavó y se montó en una cámara de Ussing rellena de un medio que consiste en cloruro de sodio 125 mM (NaCl), sulfato de magnesio 1,3 mM (MgSO₄), cloruro de potasio 5 mM (KCl), glucosa 20 mM y carbonato de sodio 25 mM (NaHCO₃). El pH de la solución se ajustó a 7,4 con HEPES. Los estudios de penetración se llevaron a cabo a la temperatura de 37 °C en una atmósfera que consiste en un 95 % O₂ y un 5 % de CO₂. La prueba de penetración se llevó a cabo no más de 15 minutos después de la extirpación de la mucosa intestinal.

Las muestras de SC usadas en la prueba diferían en términos de su naturaleza y tamaño molecular. Las muestras de SC de origen bovino y de origen biotecnológico (bacteriano-sintético) se sometieron a una prueba de penetración intestinal en las diversas combinaciones. Las muestras de SC usadas también se caracterizaban por diferentes pesos moleculares, que variaban entre 1 y 95 kDa, o preferentemente entre 4 y 50 kDa.

Se añadió sulfato de condroitina al compartimento donante a una concentración del 3 % (masa/volumen). Para los estudios de penetración en presencia de bromelaína, se añadió la bromelaína a la solución de SC a una concentración del 1,5 %. Como alternativa, se añadió un compuesto de sulfhidrilo seleccionado entre metionina, cisteína, homocisteína, S-adenosilmetionina, acetilcisteína, S-acetil-glutatión y glutatión reducido u oxidado a una concentración del 0,075 % junto con bromelaína. Para los estudios de penetración en presencia de nattocinasa, la enzima se añadió a la solución a una concentración del 1,5 %, como para la bromelaína.

El periodo de incubación total fue de tres horas, durante el cual se tomaron muestras de 100 µl cada 30 min del compartimento aceptor, y el volumen extraído fue sustituido por medio reciente. Las muestras tomadas fueron analizadas para evaluar la presencia de los disacáridos que forman el SC mediante una HPLC, mediante el uso del procedimiento descrito a continuación, después de la digestión del polisacárido con condroitinasa ABC (actividad específica: 0,5 U/ml).

El procedimiento de HPLC empleado implicaba el uso de una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX), un eluyente basado en agua acidificada a pH 4, y un gradiente lineal con NaCl 1,2 M desde un 0 % hasta un 100 % en 25 min, después de una primera elución en isocrático durante 5 min únicamente en agua acidificada. El caudal usado era de 1,0 ml/min, y la detección de los disacáridos se llevó a cabo a 232 nm con un detector de UV.

La cantidad de SC en el compartimento aceptor se calculó con una curva de calibrado de ocho puntos del patrón de sulfato de condroitina, que se corresponde con un intervalo entre el 0,78 % y el 100 % de la concentración inicial C del SC. Los patrones de sulfato de condroitina se habían preincubado con condroitinasa ABC, diluida en el mismo medio que el usado para los experimentos. Sobre la base del SC encontrado en el compartimento aceptor, se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) con la fórmula $P_{app} \text{ (cm/s)} = Q / A \cdot C \cdot t$, en la que Q es la cantidad de SC que ha penetrado (µg), A es el área de difusión de la cámara de Ussing (cm²), C es la concentración inicial de SC en el compartimento donante (µg/cm³) y t es el tiempo de incubación (30-180 min). El coeficiente acumulativo R se calculó con el P_{app} como $(P_{app} \text{ de SC} + \text{proteasa}) / (P_{app} \text{ de SC solo})$. El P_{app} se calculó cada vez que se tomó una muestra, a saber, a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min. Después se calculó el promedio de los diferentes valores de P_{app} obtenidos en estos puntos para obtener un coeficiente de permeabilidad medio de cada muestra en la totalidad del experimento. Los datos de la penetración del SC se expresaron como la media de los picos de concentración de los disacáridos Δdi-0S, Δdi-6S y Δdi-4S, medidos por separado.

El valor estadístico de los datos fue analizado con la prueba de la "t" de Student, con $p < 0,05$ como significación mínima.

La validez de este modelo experimental está confirmada por el hecho de que tres muestras de SC de diferentes pesos moleculares, a saber, de 9, de 20 y de 40 kDa, presentaron una permeabilidad en la membrana intestinal que es una función del peso molecular, como se produce *in vivo*. Esto es demostrado por una gráfica que muestra el transporte acumulado de SC en todos los intervalos temporales considerados en el periodo de 180 min del experimento (Figura).

Las muestras de SC de origen no animal con un peso molecular bajo (9 kDa) o alto (40 kDa) se usaron a continuación en la prueba de permeabilidad en presencia o en ausencia de la proteasa, y en el caso de la bromelaína, con o sin la adición de compuesto potenciador.

Se obtuvieron los resultados de la penetración con el tiempo de las muestras de SC en ausencia de otros adyuvantes o en presencia de bromelaína, de bromelaína y metionina, o de nattocinasa.

Aunque la capacidad de la bromelaína para favorecer la penetración paracelular de muchas macromoléculas es conocida, esta capacidad está asociada con su capacidad para debilitar las uniones estrechas (Grabovac y col., Int. J. Pharm. 326, 153-159, 2006), en esta prueba, el uso de bromelaína sola, sin la intervención de otros factores, no aumentó la absorción del SC de bajo peso molecular. Esto puede apreciarse a partir de la comparación entre los valores medios del P_{app} encontrados, mostrados en la tabla 1. Sin embargo, se observó un aumento apreciable para la combinación de SC de bajo peso molecular, bromelaína y metionina. También se observó un sorprendente aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal en el caso de la combinación del SC de bajo peso molecular y nattocinasa (Tabla 1). Los coeficientes acumulativos R tienen unos valores superiores a 1 para la combinación de SC/bromelaína/metionina, y claramente superiores a 1 para la combinación de SC/nattocinasa, mientras que R es menor de 1 para la combinación de SC/bromelaína (Tabla 2). Por lo tanto, la metionina muestra un sorprendente efecto favorable sobre la acción de la bromelaína como potenciador de la permeabilidad intestinal del SC, incluso aun más sorprendentemente, la nattocinasa, sin la intervención de los otros factores, prácticamente duplica la permeabilidad intestinal del SC de bajo peso molecular. Es interesante apreciar que la biodisponibilidad del SC de bajo peso molecular, que ya es más biodisponible que el correspondiente polisacárido mayor, puede ser adicionalmente aumentada con las combinaciones descritas.

Tabla 1

	$P_{app} \text{ (cm} \cdot \text{s}^{-1}) \times 10^{-7}$
sulfato de condroitina de bajo peso molecular	$2,13 \pm 0,61$
sulfato de condroitina de bajo peso molecular + bromelaína + metionina	$2,65 \pm 1,36$
sulfato de condroitina de bajo peso molecular + bromelaína	$1,41 \pm 0,76$
sulfato de condroitina de bajo peso molecular + nattocinasa	$3,56 \pm 0,04$

Valores medios del P_{app} determinados para la penetración del sulfato de condroitina de bajo peso molecular (LMW), tanto solo como combinado con bromelaína; con bromelaína + metionina; con nattocinasa

Tabla 2

	Coefficiente acumulativo (R)
sulfato de condroitina de bajo peso molecular + bromelaína + metionina / sulfato de condroitina de bajo peso molecular	$1,25 \pm 0,18$
sulfato de condroitina de bajo peso molecular + bromelaína / sulfato de condroitina de bajo peso molecular	$0,66 \pm 0,35$
sulfato de condroitina de bajo peso molecular + nattocinasa / sulfato de condroitina de bajo peso molecular	$1,67 \pm 0,20$

Coefficientes acumulativos de las combinaciones con respecto al sulfato de condroitina de bajo peso molecular (LMW) solo

Se observó un efecto comparable para la absorción del SC de alto peso molecular (40 kDa), también de origen no animal (Tablas 3 y 4). En este caso, el efecto potenciador de las combinaciones es incluso más evidente, prácticamente el triple de absorción que el SC solo, lo que indica que también se produce el efecto potenciador en el caso de los polisacáridos de gran tamaño, para los que la absorción es más crítica.

Tabla 3

	$P_{app} \text{ (cm} \cdot \text{s}^{-1}) \times 10^{-7}$
sulfato de condroitina de alto peso molecular	$0,53 \pm 0,25$
sulfato de condroitina de alto peso molecular + bromelaína + metionina	$1,27 \pm 0,80$
sulfato de condroitina de alto peso molecular + nattocinasa	$1,57 \pm 1,10$

Valores medios del Papp determinados para la penetración del sulfato de condroitina de alto peso molecular (HMW), tanto solo como combinado con bromelaína; con bromelaína + metionina; con nattocinasa

5

Tabla 4

	Coefficiente acumulativo (R)
sulfato de condroitina de alto peso molecular + bromelaína + metionina / sulfato de condroitina de alto peso molecular	$2,42 \pm 0,36$
sulfato de condroitina de alto peso molecular + nattocinasa / sulfato de condroitina de alto peso molecular	$2,86 \pm 1,64$

Coefficientes acumulativos de las combinaciones con respecto al sulfato de condroitina de alto peso molecular (HMW) solo

10 Una muestra de SC de origen animal (peso molecular: 15-20 kDa) también se sometió a la prueba de permeabilidad en ausencia o en presencia del cóctel de bromelaína y metionina, confirmando la capacidad de la combinación para aumentar la permeabilidad del SC procedente de cualquier fuente (Tabla 5).

Tabla 5

	$P_{app} \text{ (cm} \cdot \text{s}^{-1}) \times 10^{-7}$
sulfato de condroitina de referencia	$1,34 \pm 1,24$
sulfato de condroitina + bromelaína + metionina de referencia	$1,45 \pm 0,45$

15 Valores medios del Papp determinados para la penetración del sulfato de condroitina bovino, tanto solo como combinado con bromelaína + metionina

Los siguientes son ejemplos de composiciones de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

20 1.200 mg de sulfato de condroitina bovino,
600 mg de bromelaína,
30 mg de L-metionina.

Ejemplo 2

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

25 1.200 mg de sulfato de condroitina bovino,
600 mg de nattocinasa.

Ejemplo 3

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

30 1.200 mg de sulfato de condroitina biotecnológico con un peso molecular de 9 kDa,
600 mg de bromelaína,
30 mg de L-metionina.

Ejemplo 4

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

1.200 mg de sulfato de condroitina biotecnológico con un peso molecular de 9 kDa,
600 mg de nattocinasa.

Ejemplo 5

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

- 5 1.200 mg de sulfato de condroitina biotecnológico con un peso molecular de 40 kDa,
 600 mg de bromelaína,
 30 mg de L-metionina.

Ejemplo 6

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

- 10 1.200 mg de sulfato de condroitina biotecnológico con un peso molecular de 40 kDa,
 600 mg de nattocinasa.

Ejemplo 7

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

- 15 1.200 mg de sulfato de condroitina biotecnológico con un peso molecular de 9 kDa,
 600 mg de nattocinasa,
 30 mg de L-metionina.

Ejemplo 8

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

- 20 1.200 mg de sulfato de condroitina biotecnológico con un peso molecular de 40 kDa,
 600 mg de nattocinasa,
 30 mg de L-metionina.

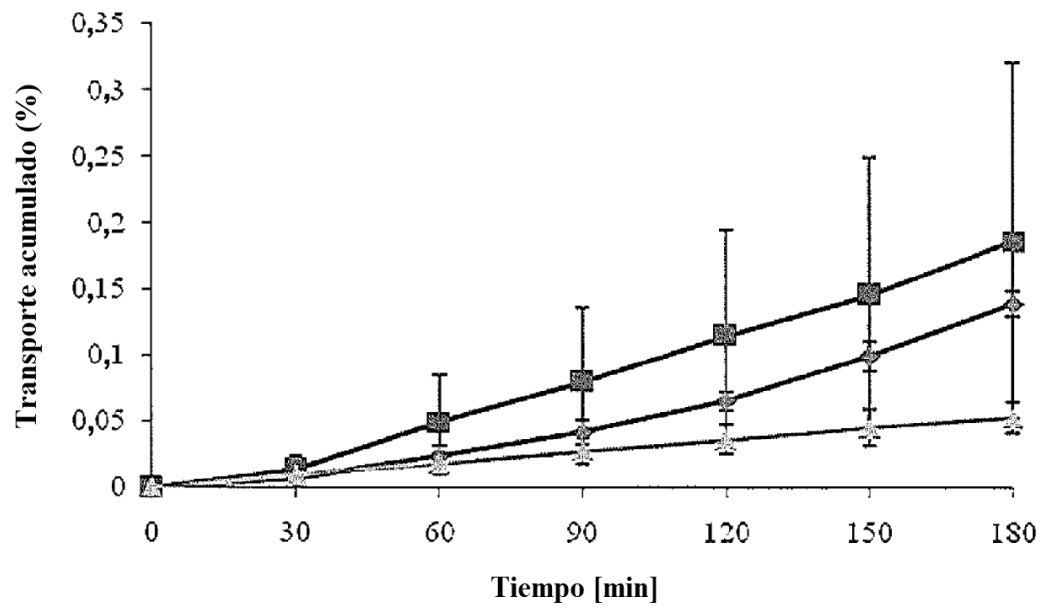
Ejemplo 9

Se preparó una composición mediante la mezcla de:

- 25 1.200 mg de sulfato de condroitina bovino,
 600 mg de nattocinasa,
 30 mg de L-metionina.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende sulfato de condroitina, nattocinasa y opcionalmente un compuesto sulfhidrilado, siendo la proporción de sulfato de condroitina/proteasa/compuesto sulfhidrilado de 1,0/0,05-0,8/0,001-0,05 en peso.
2. Una composición según la reivindicación 1, en ausencia de un compuesto sulfhidrilado.
- 5 3. Una composición según la reivindicación 1, en presencia de un compuesto sulfhidrilado.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que el sulfato de condroitina tiene un peso molecular que varía de 1 a 95 kDa.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la que el sulfato de condroitina se obtiene por extracción de una fuente animal.
- 10 6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 en la que el sulfato de condroitina se obtiene por sulfatación química del polisacárido capsular K4 de *E. coli* después de la eliminación de los residuos de fructosa mediante hidrólisis.
- 15 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 en la que el sulfato de condroitina se obtiene por sulfatación química y despolimerización ácida o radicalaria posterior del polisacárido capsular K4 de *E. coli* después de la eliminación de los residuos de fructosa mediante hidrólisis.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 en la que el sulfato de condroitina se obtiene por sulfatación química del polisacárido capsular de una cepa modificada genéticamente de *E. coli*, en la que dicho polisacárido está originalmente exento de residuos de fructosa.
- 20 9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 en la que el sulfato de condroitina se obtiene por sulfatación química y despolimerización ácida o radical posterior del polisacárido capsular de una cepa modificada genéticamente de *E. coli*, en la que dicho polisacárido está originalmente exento de residuos de fructosa.
10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la que el compuesto sulfhidrilado se selecciona entre metionina, cisteína, homocisteína, S-adenosilmetionina, acetilcisteína, glutatión reducido u oxidado, S-acetil-glutatión.
- 25 11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que contiene adicionalmente uno o más principios activos usados en la prevención o en el tratamiento de la inflamación aguda o crónica y/o una o más sustancias nutraceuticas usadas para el mantenimiento del bienestar musculoesquelético en el hombre y animales.
12. La composición según la reivindicación 11 en la que el uno o más principios activos se seleccionan del grupo que consiste en clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, N-acetil-glucosamina, ácido hialurónico, aminoácidos, colágeno, colágeno hidrolizado, ácidos grasos poliinsaturados, queratina, metilsulfonilmetano, folato, folato reducido, vitaminas, vitaminas del grupo B, S-adenosilmetionina (SAmE), ácido ascórbico y ascorbato de manganeso.
- 30 13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que contiene adicionalmente uno o más excipientes farmacéutica o nutraceuticamente aceptables seleccionados entre celulosa microcristalina, ácido esteárico, estearato de magnesio, sílice coloidal, etil celulosa, metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, sales acuosas de goma laca, alginato de sodio, almidón, almidones modificados, copolímeros de ácido metacrílico, maltodextrinas y polioles.
- 35 14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en la prevención o en el tratamiento de inflamaciones agudas y crónicas.
- 40 15. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en formulaciones sólidas orales que comprenden cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, comprimidos, granulados, bebidas líquidas o bebidas en polvo reconstituidas.



Figura