

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 918**

51 Int. Cl.:

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2006 PCT/EP2006/010851**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2007 WO07059874**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2006 E 06829019 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 1951265**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento de osteoartritis**

30 Prioridad:

24.11.2005 ES 200502901

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

26.09.2017

73 Titular/es:

**BIOIBÉRICA, S.A. (100.0%)
7, plaza Francesc Macià
08029 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**ESCAICH FERRER, JOSEP;
GUIX SALICHS, JOAQUIMA;
UBIA RUEDA, ANA;
RUHI ROURA, RAMÓN;
RECIO VERDALET, JUAN y
TORRENT GIBERT, ANA MARÍA**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

Observaciones :

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

ES 2 633 918 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 para el tratamiento de osteoartritis

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de composiciones para administración oral para el tratamiento de la osteoartritis y del dolor asociado al mismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

La osteoartritis es una enfermedad degenerativa articular que afecta a la mayoría de las personas a partir de los 65 años.

- 15 La osteoartritis puede definirse como la degeneración del cartílago hialino articular. De forma secundaria, se ven afectados la membrana sinovial y el hueso subcondral (hueso en contacto con el cartílago) y se forma hueso nuevo en los márgenes de las superficies de la articulación.

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

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

- 30 Aunque se desconoce todavía la etiología de la osteoartritis, actualmente se acepta generalmente que las primeras alteraciones se producen a nivel de condrocito, alteraciones que posteriormente darán origen a la aparición de una articulación afectada por la osteoartritis.

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

- 35 La osteoartritis es una enfermedad que no tiene un tratamiento definitivo. Los presentes inventores subrayan las siguientes posibilidades terapéuticas actuales:

- 40 Fármacos de acción sintomática que actúan de forma rápida. Entre estos se encuentran: los analgésicos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los corticoides y los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). El uso de algunos de ellos conlleva un alto riesgo de efectos secundarios potencialmente graves, como son los problemas gastrointestinales en el caso de los AINE.

- 45 Los fármacos de acción sintomática que actúan de forma algo más lenta. Son conocidos como SYSADOA ((Symptomatic Slow Acting Drug for Osteoarthritis (Fármacos con acción sintomática lenta para el tratamiento de la osteoartritis) (M.G. Lequesne, *Rev. Rhum.* (Eng./Ed.), 61, 69-73 (1994); B.F. Leeb *et al.*, *J. Rheumatol.*, 27, 205-211 (2000)). Entre estas sustancias se encuentran: el ácido hialurónico, el sulfato de condroitina, el clorhidrato de glucosamina y el llamado sulfato de glucosamina. Este grupo se caracteriza por presentar una eficacia global similar a los AINE y, además, como ventajas adicionales, una mayor seguridad y una acción más prolongada, incluso durante algunos meses después de la supresión del tratamiento (efecto *carry over* o remanente). Algunos ensayos clínicos realizados con ácido hialurónico (M. Dougados *Semin. Arthritis. Rheum.*, 30(2 Suppl 1), 19-25 (2000)) y sulfato de condroitina (D. Uebelhart *et al.*, *Osteoarthritis Cart.*, 12, 269-276 (2004)). han puesto en evidencia la posibilidad de que ambos compuestos, además de actuar como SYSADOA, puedan influir en el curso de la enfermedad artrósica, frenando o retrasando la enfermedad como fármacos S/DMOAD (Structure/Disease Modifying anti-Osteoarthritis Drug).

- 60 El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano no sulfatado de origen natural, con una estructura polimérica constituida por disacáridos de *N*-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico. Se extrae principalmente de órganos o tejidos de aves y mamíferos. Es uno de los principales componentes del cartílago, de la membrana sinovial y del líquido sinovial. El ácido hialurónico endógeno es sintetizado principalmente por los sinoviocitos, además de, en menor grado, por los condrocitos. En los pacientes que padecen osteoartritis, el líquido sinovial presenta una menor concentración de ácido hialurónico endógeno, en consecuencia, el efecto lubricante y las propiedades viscoelásticas del líquido sinovial se hallan disminuidas, ya que el líquido sinovial, que es un líquido viscoso que está presente en la cavidad articular, lubrica y nutre el cartílago articular, reduciendo la fricción entre las superficies articulares, con lo que facilita el movimiento de la articulación. La vía de administración más extendida del ácido hialurónico en el tratamiento de la osteoartritis es la intraarticular. La acción del ácido hialurónico intraarticular radica en mejorar la

movilidad de las articulaciones con superficie del cartilago degenerativa y alteraciones en el líquido sinovial.

El ácido hialurónico también se utiliza en el campo de los implantes intraarticulares, en oftalmología, para acelerar la cicatrización de las heridas y en cosmética.

5 El sulfato de dermatano, también conocido como sulfato de condroitina B, es un glucosaminogucano de origen natural, con una estructura polimérica constituida mayoritariamente por disacáridos de *N*-acetil-D-galactosamina sulfatada y ácido L-idurónico. Algunas unidades de disacáridos contienen *N*-acetil-D-galactosamina sin grupos sulfatos o ácido D-glucurónico en vez de ácido L-idurónico. Se extrae de órganos o tejidos de aves y mamíferos.

10 El sulfato de dermatano se utiliza, mezclado con otros glucosaminogucanos, como antitrombótico por vía subcutánea y en la fabricación de cosméticos.

15 El hidrolizado de colágeno comprende una mezcla de aminoácidos y péptidos de peso molecular bajo. Se obtiene por hidrólisis enzimática controlada de la proteína colagenosa contenida en la piel y en otros tejidos conjuntivos. Se utiliza mayoritariamente en cosmética.

20 La solicitud de patente US 2005084518 describe un alimento para la salud que contiene ácido hialurónico y sulfato de dermatano. Este alimento difiere de las composiciones de la presente invención en que es útil para el embellecimiento de la piel.

25 En el documento US 2002068718 se describe el uso del ácido hialurónico administrado oralmente para tratar la osteoartritis. También se describen composiciones condroprotectoras que contienen ácido hialurónico. Además de ácido hialurónico, las composiciones pueden contener sulfato de glucosamina y/o sulfato de condroitina.

El documento US 6607745 describe un suplemento alimenticio que consiste esencialmente en ácido hialurónico para aliviar el dolor articular y otros malestares asociados a la osteoartritis.

30 El problema a solucionar por la presente invención es conseguir una composición más eficaz que el ácido hialurónico para el tratamiento de la osteoartritis y del dolor asociado a la osteoartritis, para nutrir la articulación y para mejorar el movimiento articular.

35 Hasta el momento no se ha encontrado descrito el uso de una composición que comprenda ácido hialurónico y sulfato de dermatano en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de la osteoartritis o del dolor articular asociado a la osteoartritis.

40 Adicionalmente, hasta el momento no se ha encontrado descrito el uso de una composición que comprenda ácido hialurónico y sulfato de dermatano en la preparación de un alimento o de un suplemento alimenticio para la nutrición de la articulación, más en concreto para nutrir el líquido sinovial presente en la articulación o para mejorar el movimiento articular.

Descripción de la invención

45 La presente invención se refiere al uso de composiciones que comprenden ácido hialurónico y sulfato de dermatano para la preparación de un medicamento para administración oral para el tratamiento, prevención o profilaxis de la osteoartritis en mamíferos.

50 Otro aspecto de la presente invención es el uso de composiciones que incluyen ácido hialurónico y sulfato de dermatano para la preparación de un medicamento para administración oral para el tratamiento, prevención o profilaxis del dolor articular asociado a la osteoartritis.

En una realización preferida el sulfato de dermatano está presente en una cantidad eficiente para potenciar la actividad antiosteoartrítica del ácido hialurónico.

55 En una realización más preferida la relación en peso de ácido hialurónico a sulfato de dermatano está comprendida entre 1:0,05 y 1:0,7. La relación en peso especialmente preferida está comprendida entre 1:0,1 y 1:0,5.

60 En una realización igualmente preferida las composiciones contienen además hidrolizado de colágeno. La relación en peso preferida entre el ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno está comprendida entre 1:0,05:0,05 y 1:0,7:0,7. La relación en peso especialmente preferida está comprendida entre 1:0,1:0,1 y 1:0,5:0,5.

En una realización igualmente preferida las composiciones contienen además hidrolizado de colágeno y ácidos nucleicos.

65 En una realización las composiciones contienen además hidrolizado de colágeno. La relación en peso preferida entre el ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno está comprendida entre 1:0,1:0,1 y

1:0,5:0,5.

En una realización las composiciones contienen además hidrolizado de colágeno y ácidos nucleicos.

- 5 Cuando se habla de tratamiento de la osteoartritis se incluye al mismo tiempo el tratamiento sintomático de la osteoartritis (dolor e incapacidad funcional).

Todos los usos reivindicados en la presente invención están vinculados entre sí, formando un único concepto inventivo.

- 10 El ácido hialurónico y el sulfato de dermatano para su uso en la presente invención pueden ser de origen natural obtenidos a partir de aves y mamíferos, productos semisintéticos o bien productos obtenidos por biotecnología, los cuales, cuando sea necesario, pueden ser transformados mediante métodos químicos.

- 15 La frase "producto semisintético" se refiere al que se obtiene llevando a cabo modificaciones estructurales mediante reacciones químicas a partir del extracto natural.

- 20 El ácido hialurónico de origen natural puede obtenerse, mediante extracción, a partir de tejidos de aves o de mamíferos, por ejemplo a partir de humor vítreo, piel de mamífero, cordón umbilical, crestas de aves y por fermentación de microorganismos, por ejemplo *Streptococcus*, siguiendo procedimientos descritos en la literatura (D.A. Swann, *Biochim. Biophys. Acta* 156, 17-30 (1968); H. Akasaka *et al.* Preprints of the XIVth I.F.S.C.C. Congress, Barcelona, 1, 265-281 (1986); US 4780414).

- 25 El sulfato de dermatano puede obtenerse a partir de tejidos de aves o de mamíferos, por ejemplo a partir de mucosa porcina o bovina y crestas de aves, siguiendo procedimientos descritos en la literatura (N. Volpi, *Anal. Biochem.* 218, 382-391 (1994); R. Del Bono *et al.* US 5.116.963)).

- 30 El hidrolizado de colágeno puede obtenerse de piel de mamífero o de crestas de gallo, siguiendo procedimientos descritos en la literatura ("Final Report on the Safety Assessment of Hydrolyzed Collagen", *Journal of the American College of Toxicology* 4, nº5, 199-221, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, (1985)).

El hidrolizado de colágeno de la presente invención presenta un contenido en prolina mayor del 9 %.

- 35 Los pesos moleculares medios del ácido hialurónico y del sulfato de dermatano utilizados en la presente invención pueden variar dependiendo del procedimiento de obtención. Preferentemente el peso molecular medio del ácido hialurónico está comprendido entre 300.000 y 2.000.000 daltons, más preferentemente entre 500.000 y 1.000.000 daltons y el del sulfato de dermatano entre 10.000 y 35.000 daltons, más preferentemente entre 15.000 y 25.000 daltons.

- 40 Las composiciones de la presente invención pueden obtenerse directamente como extractos naturales a partir de tejidos de aves o de mamíferos. Así, por ejemplo, puede partirse de crestas de gallo congeladas, las cuales una vez picadas se digieren con un enzima proteolítico. Posteriormente se desactiva el enzima mediante calentamiento, se filtra y se precipita con disolventes. A continuación se filtra, se lava y se seca. Finalmente puede procederse al molturado. El producto obtenido contiene ácido hialurónico, sulfato de dermatano, hidrolizado de colágeno (en forma de aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular) y ácidos nucleicos, o bien una parte de esos componentes. La presencia de todos o de parte de los componentes y la proporción entre ellos dependerá del procedimiento de obtención (tipo de enzima, temperatura, tiempo de reacción y proceso de purificación).

- 50 Si se desea, pueden prepararse las composiciones de la presente invención mezclando los diversos componentes, obtenidos por separado, en las proporciones deseadas. Así, pueden prepararse composiciones que contengan ácido hialurónico y sulfato de dermatano, o bien ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno (aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular), o bien ácido hialurónico, sulfato de dermatano, hidrolizado de colágeno y ácidos nucleicos.

- 55 Para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de la osteoartritis y en el tratamiento, prevención o profilaxis del dolor asociado a la osteoartritis, las composiciones de la invención se formulan en composiciones farmacéuticas adecuadas (medicamentos) recurriendo a técnicas y excipientes o vehículos convencionales, como los descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences Handboock*, Mack Pub. Co., N.Y., EE.UU.

- 60 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por vía oral al paciente en dosis requeridas. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención, dependiendo dicha cantidad de muchos factores, como por ejemplo, el estado físico del paciente, edad, sexo, composición particular y de otros factores bien conocidos en la técnica. Además, se entenderá que dicha dosificación de la composición activa puede administrarse en unidades de dosis única o múltiple para proporcionar los efectos terapéuticos deseados.

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

Para preparar los alimentos o los complementos alimenticios (también denominados alimentos funcionales o nutraceuticos) para ser utilizados según la invención, las composiciones de la invención se formulan con componentes y excipientes adecuados empleados en nutrición. Los alimentos pueden estar, por ejemplo, en forma sólida o líquida. Se contemplan también las preparaciones en forma sólida que se puedan convertir, antes de ser utilizadas, en bebidas, sopas o cremas. Los complementos alimenticios pueden estar, por ejemplo, en forma sólida, líquida, emulsión, suspensión o como gel. En este caso también se contemplan las preparaciones en forma sólida que se puedan convertir, antes de ser utilizadas, en preparaciones en forma líquida o en suspensiones.

Breve descripción de las figuras

En la Figura 1 se representa el efecto a las 12 horas de una composición de la invención (55 % de ácido hialurónico, 15 % de sulfato de dermatano, 15 % de hidrolizado de colágeno y 4 % de ácidos nucleicos), de ácido hialurónico obtenido a partir de tejidos de aves (AH extracción) y de ácido hialurónico obtenido por fermentación de un microorganismo (AH fermentación) sobre los niveles extracelulares de ácido hialurónico endógeno sintetizado por los sinoviocitos osteoartíticos humanos.

En la Figura 2 se representa el efecto a las 24 horas de una composición de la invención (55% de ácido hialurónico, 15% de sulfato de dermatano, 15% de hidrolizado de colágeno y 4% de ácidos nucleicos), de ácido hialurónico obtenido a partir de tejidos de aves (AH extracción) y de ácido hialurónico obtenido por fermentación de un microorganismo (AH fermentación) sobre los niveles extracelulares de ácido hialurónico endógeno sintetizado por los sinoviocitos osteoartíticos humanos.

La Figura 3 representa la inhibición de la actividad metaloproteasa debido a una composición de la invención (800 µg/ml AH + 200 µg/ml DS), ácido hialurónico (AH, 800 µg/ml), sulfato de dermatano (DS, 200 µg/ml) y llostatat (LL).

La Figura 4 representa la inhibición de la actividad metaloproteasa debido a una composición de acuerdo con la invención (160 µg/ml AH + 40 µg/ml DS), ácido hialurónico (AH, 160 µg/ml), sulfato de dermatano (DS, 40 µg/ml) y llostatat (LL).

La Figura 5 muestra el cambio promedio de la línea de base en la puntuación de dolor corporal SF-36 para ambos grupos (composición de la invención y placebo) durante la prueba.

La Figura 6 muestra el cambio promedio de la línea de base en la puntuación de papel físico SF-36 para ambos grupos (composición de la invención y placebo) durante la prueba.

La Figura 7 muestra el cambio promedio de la línea de base en la puntuación de WOMAC para ambos grupos (composición de la invención y placebo) durante la prueba.

La Figura 8 muestra el cambio promedio de la línea de base en la puntuación de WOMAC ADL para ambos grupos (composición de la invención y placebo) durante la prueba.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

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

Ejemplo 1: Determinación de la capacidad de una composición de la invención para estimular la producción de ácido hialurónico endógeno por los sinoviocitos humanos. Estudio comparativo entre ácidos hialurónicos y una composición de la invención

El siguiente procedimiento puede aplicarse a la evaluación de la eficacia de cualquiera de las composiciones de la presente invención.

El objetivo era estudiar el efecto de una composición de la invención y también el de dos ácidos hialurónicos sobre la síntesis de ácido hialurónico endógeno por los sinoviocitos, determinando si existían diferencias entre ellos.

Se utilizó una composición que contenía 55 % de ácido hialurónico, 15 % de sulfato de dermatano, 15 % de hidrolizado de colágeno y 4 % de ácidos nucleicos (relación en peso: 1:0,27:0,27:0,07).

Uno de los ácidos hialurónicos utilizados se obtuvo a partir de tejidos de aves (AH extracción), y tenía un peso molecular medio de 1.000.000 daltons (producto comercial disponible en Bioiberica, S.A., www.bioiberica.com).

El otro ácido hialurónico utilizado provenía de la fermentación de un microorganismo (AH fermentación) y tenía un peso molecular medio de 1.000.000 daltons (producto comercial disponible en IBC como hialuronato sódico en

polvo).

Materiales y métodos

- 5 Se incubaron por separado la composición de la invención, el AH extracción y el AH fermentación con los sinoviocitos durante 12 y 24 horas. Se utilizaron las siguientes concentraciones tanto de la composición de la invención como de los ácidos hialurónicos: 10 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml.

Los tejidos sinoviales se obtuvieron de los recambios de tres articulaciones artrósicas.

- 10 Se introdujo el tejido sinovial en un vial (estéril) con DMEM (Modificación de Dulbecco del Medio de Eagle) (2 %), penicilina (150 U/ml), estreptomycin (50 mg/ml) y anfotericina B (2 µg/ml) y se introdujeron en una nevera (temperatura 0-4°C) para su transporte hasta zona de cultivos celulares. Se troceó el tejido sinovial en fragmentos de aproximadamente 2x2x2 mm³. Se lavaron tres veces los fragmentos con medio de cultivo (RPMI 2 % P/S/A). Se añadieron 20 ml de medio de cultivo con 10 % de tripsina y se incubó en baño de agua a 37°C durante 10-15 minutos. Posteriormente se digirió el sinovium añadiendo 25 ml de solución de colagenasa [colagenasa tipo II 2mg/ml; suero bovino fetal 5 % (FCS); P/S/A 2 %; L-glutamina 1 % y deoxiribonucleasa I 0.1 mg/ml o 150 U/l en RPMI]. El vial se introdujo en un agitador giratorio a 37°C durante apropiadamente 2-4 horas. Las células fueron filtradas a través de un filtro de nylon con poros de 25 µm de diámetro. Se hizo recuento celular y se cultivaron las células a una densidad de 5.000 a 10.000 células/cm² en botellas de cultivo de 25 o 75 cm² de superficie. El medio de cultivo empleado fue RPMI suplementado con FCS 10 %, P/S 1 % y L-glutamina 1 %. Los sinoviocitos que se utilizaron en los experimentos fueron todos del pase 2-3.

- 25 Después de 24 horas en cultivo, los sinoviocitos (100.000 células por pocillo en una placa de 24-pocillos con 250 µl de medio) fueron estimulados con la composición de la invención, AH extracción y AH fermentación durante 12 y 24 horas. Después de este tiempo, el sobrenadante de los diferentes pocillos fue recogido. El contenido de ácido hialurónico endógeno fue medido por ELISA (Corgenix Inc, EE.UU.).

- 30 Los resultados se muestran como la media de 9 experimentos individuales realizados en cultivos. Los resultados se expresan como promedios ± SD y SE. El análisis estadístico se realizó con el test de la "T" de Student de dos colas para datos no apareados. Se considera una diferencia estadísticamente significativa cuando la p < 0,05.

Resultados

- 35 Tanto la composición de la invención como los ácidos hialurónicos provocaron un aumento dependiente de la dosis en los niveles de ácido hialurónico endógeno medidos en los sobrenadantes de los cultivos de sinoviocitos. Se encontraron diferencias significativas entre la composición de la invención y los ácidos hialurónicos a la concentración de 100 y 200 µg/ml a las 12 y 24 horas (Figuras 1 y 2).

- 40 Después del periodo de 12 horas, y a la concentración de 200 µg/ml, los niveles más altos medidos se obtuvieron en las células cultivadas con la composición de la invención (89.185 ng/ml) y los niveles más bajos en las células cultivadas con el AH fermentación (62.618 ng/ml). Este patrón de respuesta también se observó con la dosis de 100 µg/ml (composición de la invención=40.814 ng/ml; AH extracción=25.762 ng/ml; AH fermentación=9.724 ng/ml) (Figura 1).

- 45 Después del periodo de 24 horas, la diferencia entre la composición de la invención y los ácidos hialurónicos fue más acusada. A 200 µg/ml el nivel medido en las células cultivadas con la composición de la invención fue 131.660 ng/ml, con el AH extracción 91.538 ng/ml y con el AH fermentación 72.594 ng/ml. Este patrón de respuesta también se produjo a la dosis de 100 µg/ml (composición de la invención=81.550 ng/ml; AH extracción=27.634 ng/ml; AH fermentación=15.706 ng/ml) (Figura 2).

Conclusiones

- 55 Con respecto al efecto de la composición de la invención sobre la medición de niveles de ácido hialurónico endógeno en los sobrenadantes de sinoviocitos en cultivo podemos destacar que muestra un patrón dependiente de la dosis y del tiempo.

- 60 Tanto después del periodo de 12 como el de 24 horas y a las dosis de 100 y 200 µg/ml, la composición de la invención estimuló la producción de ácido hialurónico endógeno por los sinoviocitos humanos. Después del periodo de incubación de 24 horas ambas dosis muestran un mayor efecto.

Como puede observarse tanto en la Figura 1 como en la Figura 2, la composición de la invención ensayada es significativamente más eficaz que cualquiera de los dos ácidos hialurónicos.

- 65 Debido a que la composición de la invención ensayada a una determinada concentración contiene un 55 % de ácido hialurónico, y es más eficaz que el ácido hialurónico ensayado a la misma concentración, puede afirmarse que los

otros componentes que acompañan al ácido hialurónico en la composición de la invención potencian la acción del ácido hialurónico.

Debido a que la composición de la invención estimula la producción de ácido hialurónico endógeno por los sinoviocitos articulares, y teniendo en cuenta la relación entre la disminución del contenido de ácido hialurónico endógeno en el líquido sinovial y la presencia de la patología de la osteoartritis, puede afirmarse que la composición de la invención es útil en el tratamiento de la osteoartritis, así como también para nutrir la articulación y para mejorar el movimiento articular.

Ejemplo 2: Determinación de la absorción intestinal

Los ensayos se realizaron utilizando ratas machos de la raza OFA. Se estudiaron las siguientes partes del intestino delgado: duodeno, yeyuno e íleon.

El duodeno es la primera parte del intestino delgado y se localiza entre el estómago y el yeyuno. Después de que los alimentos se combinan con el ácido estomacal, estos descienden al duodeno en donde se mezclan con la bilis proveniente de la vesícula biliar y los jugos digestivos del páncreas.

El yeyuno es la porción del intestino delgado de más o menos 2,2 metros de longitud que se extiende desde el duodeno al íleon.

El íleon es la última parte del intestino delgado y se localiza entre el yeyuno y el ciego, que es la primera porción del intestino grueso.

Se utilizó una composición que contenía 55 % de ácido hialurónico, 15 % de sulfato de dermatano, 15 % de hidrolizado de colágeno y 4 % de ácidos nucleicos (relación en peso: 1:0,27:0,27:0,07).

Para evaluar el grado de absorción se utilizó la técnica del saco intestinal invertido de rata.

Para analizar la cantidad de composición absorbida se siguió la técnica descrita por Farndale *et al.* (*Connective Tissue Research*, 9, 247-248, (1982)) para la determinación de glucosaminogucanos.

Resultados

Se obtuvieron los siguientes valores absolutos para cada porción del intestino delgado: 40 % para el duodeno, 19 % para el yeyuno y 7 % para el íleon.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos puede afirmarse que la composición se absorbe bien en el intestino delgado, principalmente en el duodeno.

Ejemplo 3: Inhibición de la actividad metaloproteasa en condrocitos artrósicos humanos. Estudio comparativo de dos composiciones de la invención, ácido hialurónico y sulfato de dermatano

La destrucción de la matriz del cartílago depende principalmente de la degradación enzimática de sus componentes. Esta estructura depende principalmente de dos tipos de moléculas existentes: fibras de colágeno y proteoglucanos. Mientras que la degradación de las fibras de colágeno da lugar a la inestabilidad de la matriz y el hinchamiento tisular, la degradación de los proteoglucanos da lugar al ablandamiento del cartílago y a la pérdida de cargas fijadas. Ambos procesos son característicos de la osteoartritis. Las enzimas responsables de la degradación de la triple hélice de colágeno se llaman metaloproteasas de la matriz (MMP). En los pacientes con osteoartritis, se han descubierto altos niveles de collagenasas, así como una relación entre aquellos niveles y la liberación de las lesiones osteoartrosícos.

La etiología de la osteoartritis todavía se desconoce. Ahora se reconoce que las alteraciones tempranas se dan en los condrocitos, debido al desequilibrio de la síntesis y la degradación de la matriz extracelular del cartílago de la articulación. El resultado final es una destrucción acelerada de la matriz extracelular, principalmente mediante enzimas proteolíticas de condrocitos y de células sinoviales, seguido de alteraciones en los sistemas de reparación del cartílago.

El objeto fue estudiar el efecto del ácido hialurónico (AH), del sulfato de dermatano (DS) y de las composiciones de la invención, hechas de una mezcla de ácido hialurónico y sulfato de dermatano (AH+DS), en la actividad metaloproteasa en condrocitos humanos.

Se usaron dos composiciones que consisten en ácido hialurónico y sulfato de dermatano en una relación en peso de 1:0,25.

Materiales y métodos

Las soluciones se prepararon con las dos composiciones de la invención. Una de ellas contenía 160 µg/ml de ácido hialurónico y 40 µg/ml de sulfato de dermatano y se comparó con ácido hialurónico a una concentración de 160 µg/ml y con sulfato de dermatano a una concentración de 40 µg/ml. La otra composición contuvo 800 µg/ml de ácido hialurónico y 200 µg/ml.

Los condrocitos se aislaron de piezas de cartílago (de la rodilla o la cadera) de pacientes con osteoartritis avanzada, mediante digestión enzimática secuencial: 1 hora con hialuronidasa (0,1 mg/ml), seguido de 10 horas con colagenasa (tipo IA, 2 mg/ml) a 37 °C en DMEM/medio F12 de Ham más penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) en una atmósfera de CO₂ controlada. El producto de la digestión se filtró (70 µm), se lavó y se centrifugó. Se determinó la viabilidad celular mediante el método de exclusión de azul Tripán, que estuvo en un exceso del 95 %. Los condrocitos aislados se sembraron 2,5 x 10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron en DMEM/medio de Ham F-12 con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) suplementado con suero humano (10 %) en una incubadora humidificadora con CO₂ al 5 % y a 37 °C. Las células se crecieron a confluencia.

Para determinar la actividad metaloproteasa (MMP), los condrocitos se preincubaron con el producto de estudio (composiciones de la invención, ácido hialurónico o sulfato de dermatano) o el inhibidor de referencia (Ilomastat) durante 24 horas y después los condrocitos se estimularon con 100 U/ml de IL-1β (interleucina 1β) durante 24 horas. Los sobrenadantes se centrifugaron y se trataron con APMA (acetato p-aminofenilmercúrico) durante 4-5 horas a 37 °C. Posteriormente, los sobrenadantes se transfirieron a una placa de 96 pocillos para el análisis de fluorescencia y el sustrato FRET (QXLTM 520) se añadió para MMP-1-2-3-12-13. La placa se agitó y se midió la fluorescencia a diferentes tiempos con longitudes de onda de excitación y emisión ajustadas a 490 nm y 520 nm, respectivamente.

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado (de los cuatro pacientes diferentes), con grupos blanco, control y de estudio. El grupo de estudio se hizo con los productos de estudio (composiciones de la invención, ácido hialurónico y sulfato de dermatano) y un inhibidor de referencia. Cada producto de estudio se ensayó a dos concentraciones. Se realizaron cuatro ensayos (un total de n=8 para cada grupo). Se calcularon las medias y los errores estándar y se realizaron análisis de la varianza y tests de la t de Dunnett. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando p < 0,05.

Resultados

Se ensayaron las composiciones de la invención con una preincubación de 24 horas (AH+DS), el ácido hialurónico (AH) y el sulfato de dermatano (DS) provocaron la inhibición de la actividad metaloproteasa. Los condrocitos + IL-1β tratados tanto con la composición de 800 µg/l AH + 200 µg/ml DS (Figura 3) como con la composición de 160 µg/ml AH + 40 µg/ml DS (Figura 4) mostraron una reducción significativa de la actividad metaloproteasa (p<0,5). La reducción fue más marcada con la composición de 800 µg/l AH + 200 µg/ml DS (Figura 3).

Los condrocitos + IL-1β tratados con ácido hialurónico (AH) o con sulfato de dermatano también mostró una reducción de la actividad metaloproteasa, aunque no a un nivel estadísticamente significativo.

Como se muestra en las Figuras 3 y 4, las diferencias significativas se encontraron entre las dos composiciones de la invención ensayadas (ácido hialurónico + sulfato de dermatano) y el ácido hialurónico.

Conclusiones

Las composiciones ensayadas de la invención que consisten en una mezcla de ácido hialurónico y sulfato de dermatano actúan sinérgicamente (véanse las Figuras 3 y 4).

En la Figura 3, la actividad inhibitoria de la composición 800 µg/ml HA + 200 µg/ml DS es más grande que el efecto aditivo de la actividad de los componentes individuales.

El sulfato de dermatano potencia la actividad del ácido hialurónico.

Basado en la relación entre la actividad metaloproteasa aumentada y la osteoartritis, puede indicarse que el sulfato de dermatano potencia la actividad antiartrósica del ácido hialurónico.

Ejemplo 4: Prueba clínica en adultos con osteoartritis de la rodilla

El objeto de la prueba clínica aleatorizada, de doble ciego, controlada por placebo fue determinar las diferencias comparativas entre una composición de la invención y el placebo en el alivio global del dolor y la calidad de vida en una muestra total de 20 pacientes con osteoartritis (OA) diagnosticada de la rodilla.

Otro objeto fue determinar la seguridad y la tolerabilidad de una composición de la invención como se determina por los eventos adversos, la examinación física y los signos vitales.

Métodos

Se enrolaron en el estudio veinte pacientes (9 varones adultos y 11 mujeres adultas), de 40 años y por encima, con un diagnóstico clínico de osteoartritis de la rodilla o la rodillas y dolor de rodilla verificado durante al menos 15 días en el mes anterior al ensayo.

Los pacientes recibieron 80 mg de una composición de la invención que contenía un 55 % de ácido hialurónico, un 15 % de sulfato de dermatano, un 15 % de hidrolizado de colágeno y un 4 % de ácidos nucleicos (relación en peso 1:0,27:0,27:0,07) o un placebo al día durante 2 meses.

Se usaron en el estudio el índice de osteoartritis de las universidades de Ontario oeste y McMaster (WOMAC, por sus siglas en inglés) y las escalas de instrumento de calidad de vida SF-36v2.

El WOMAC es una medición del estado de salud específico de enfermedad, auto-administrado. Prueba síntomas clínicamente importantes en las áreas del dolor, la rigidez y la función física en pacientes con osteoartritis de la cadera y/o la rodilla. El índice consistía en 24 preguntas (5-dolor, 2-rigidez y 17-función física) y puede completarse en menos de 5 minutos. El WOMAC es un instrumento válido, confiable y sensible para la detección de cambios clínicamente importantes en el estado de salud que sigue a una diversidad de intervenciones (farmacológicas, nutricionales, quirúrgicas, fisioterapia, etc.). El cuestionario WOMAC es válido para evaluar los efectos de la intervención en la osteoartritis de cadera o de rodilla.

El instrumento de calidad de vida SF-36v2 es una encuesta de salud multi-fin, de forma corta con 36 preguntas. Produce un perfil de 8 escalas de la salud funcional y puntuaciones de bienestar así como mediciones psicométricamente basadas de sumario de salud física y mental y un índice de utilidad de salud basada en preferencias. Es una medición genérica, en oposición a una que marca como diana una edad, enfermedad o grupo de tratamiento específicos.

En consecuencia, el SF-36v2 ha demostrado ser útil en encuestas de poblaciones generales y específicas, comparando la carga relativa de enfermedades y diferenciando los beneficios de salud producidos por un amplio intervalo de diferentes tratamientos. El SF-36v2 proporciona información de los siguientes aspectos y subconjuntos de la salud; Salud Física (comprendida por funcionamiento físico, papel físico, dolor corporal y salud general) y Salud Mental (comprendida por vitalidad, funcionamiento social, papel emocional y salud mental).

Resultados:Cambio en el dolor corporal

La mejora del dolor corporal SF-36v2 fue estadísticamente significativa en pacientes tratados con la composición de la invención en comparación con el placebo ($p = 0,031$).

Una puntuación más alta es mejor porque significa que el paciente siente menos dolor después de tomar el producto.

Hubo un 33 % de mejora en la puntuación de dolor corporal en el grupo que recibió la composición de la invención frente a una mejora del 6 % en el grupo placebo (véase la Figura 5).

Cambio en la puntuación del papel físico

El efecto superior de la composición de la invención en comparación con el placebo fue estadísticamente significativo en la semana 4 en términos de limitaciones del papel debido a la salud física (papel físico).

Una puntuación más alta es mejor porque significa que el paciente se dio cuenta de una mejora física y una reducción en las limitaciones padecidas en actividades de la vida diaria.

Hubo una mejora del 14 % en la puntuación del papel físico en el grupo que recibió la composición de la invención frente a una mejora de menos del 1 % en el grupo placebo (véase la Figura 6).

Cambio en la puntuación WOMAC total

Hubo una tendencia general en el transcurso del estudio para la puntuación WOMAC total de mejorar significativamente en el grupo tratado con la composición de la invención, en comparación con el grupo placebo (una puntuación menor es mejor, véase la Figura 7).

Cambio en ADL WOMAC

La mejora de las actividades de la vida diaria (medida como una sub-puntuación ADL WOMAC) fue mayor en el

grupo tratado con la composición de la invención que en el grupo placebo.

Hubo un 36 % de mejora en la puntuación de ADL WOMAC en el grupo tratado con la composición de la invención (una puntuación menor es mejor; véase la Figura 8).

5

Análisis de seguridad

No se informaron eventos adversos graves durante el estudio. Se informaron unos pocos eventos adversos suaves por 3 de los 20 pacientes enrolados, pero se consideraron no estar relacionados con el producto de estudio.

10

Conclusiones

Puede concluirse que la prueba muestra la eficiencia de la composición de la invención mejorando la calidad de vida de los pacientes con osteoartritis de la rodilla.

15

Los resultados de la prueba también muestran la seguridad y la tolerancia del producto, dado que no se encontraron efectos adversos graves.

20

También puede determinarse la eficacia de las composiciones de la presente invención llevando a cabo estudios en humanos con la finalidad de observar la disminución del dolor y el incremento de la capacidad funcional, estudios en caballos para valorar el movimiento articular y estudios *in vitro* para determinar la capacidad de las composiciones de la presente invención para inhibir la degradación de agregano inducida con IL-1, realizando el ensayo sobre cultivos de condrocitos.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano para administración oral para su uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de la osteoartritis en un mamífero, en la que la relación en peso de ácido hialurónico a sulfato de dermatano está entre 1:0,05 y 1:0,7.
- 10 2. Una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano para administración oral para su uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis del dolor articular asociado a la osteoartritis en un mamífero, en la que la relación en peso de ácido hialurónico a sulfato de dermatano está entre 1:0,05 y 1:0,7.
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sulfato de dermatano está presente en una cantidad eficiente para potenciar la actividad anti-osteoartrítica del ácido hialurónico.
- 15 4. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la relación en peso de ácido hialurónico a sulfato de dermatano está 1:0,1 y 1:0,5.
5. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición contiene además hidrolizado de colágeno.
- 20 6. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la relación en peso entre el ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno está entre 1:0,05:0,05 y 1:0,7:0,7.
- 25 7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la relación en peso entre el ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno está entre 1:0,1:0,1 y 1:0,5:0,5.
8. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición también contiene hidrolizado de colágeno y ácidos nucleicos.
- 30 9. Uso de una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano para la preparación de un medicamento para administración oral para el tratamiento, la prevención o la profilaxis de la osteoartritis en un mamífero, en el que la relación en peso de ácido hialurónico a sulfato de dermatano está entre 1:0,05 y 1:0,7.
- 35 10. Uso de una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano para la preparación de un medicamento para administración oral para el tratamiento, la prevención o la profilaxis del dolor articular asociado a osteoartritis en un mamífero, en el que la relación en peso de ácido hialurónico a sulfato de dermatano está entre 1:0,05 y 1:0,7.

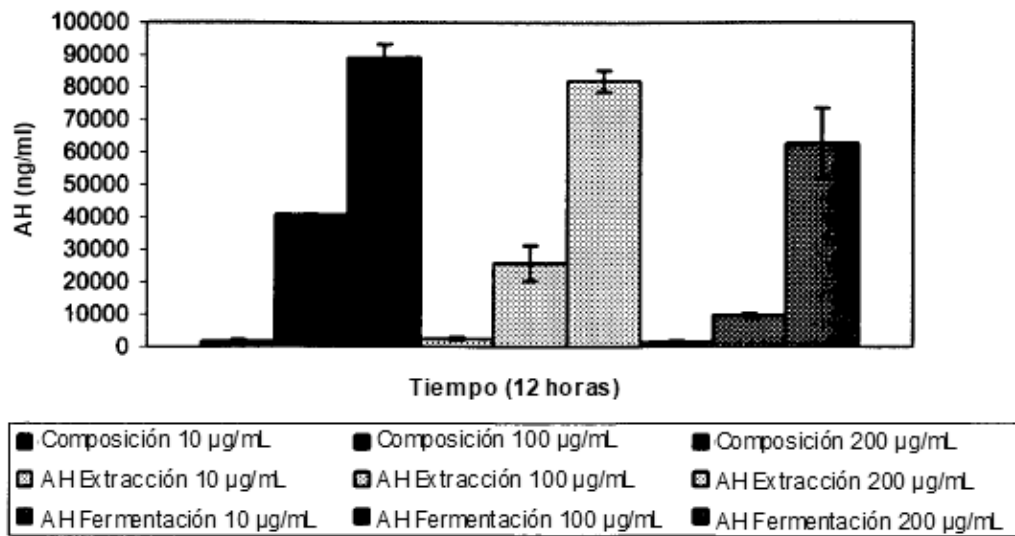


FIGURA 1

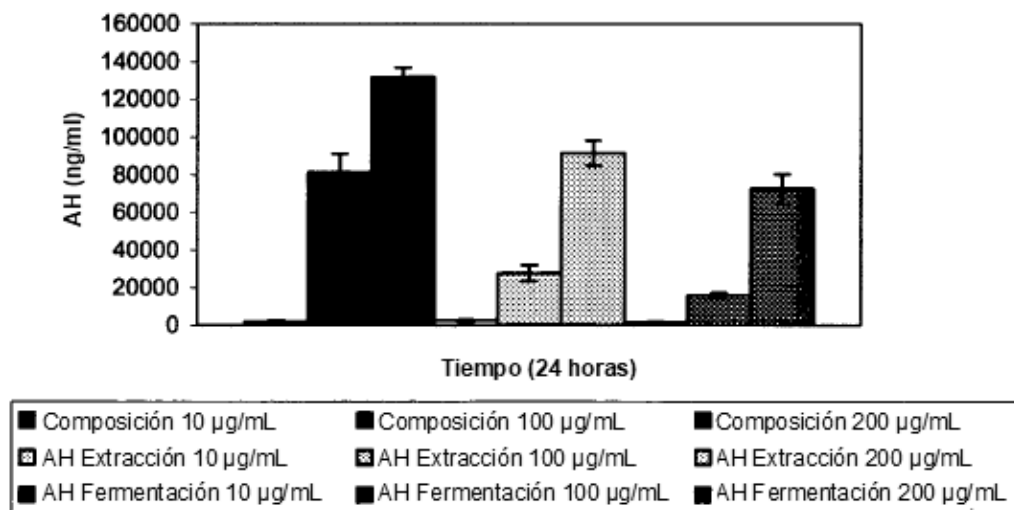


FIGURA 2

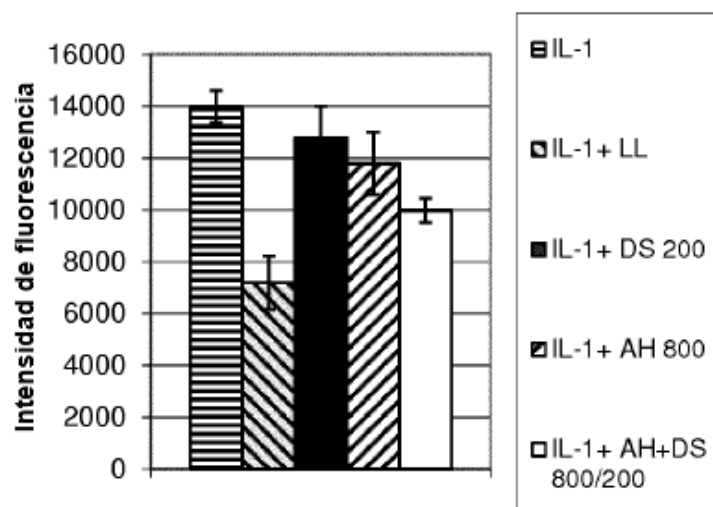


FIGURA 3

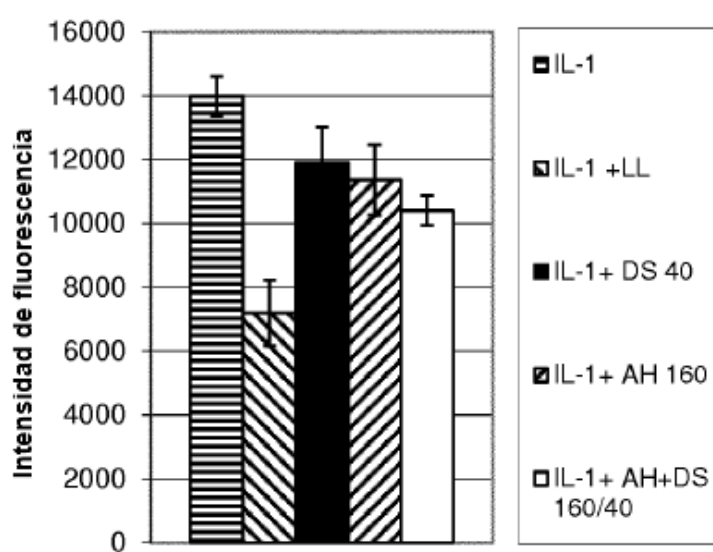


FIGURA 4

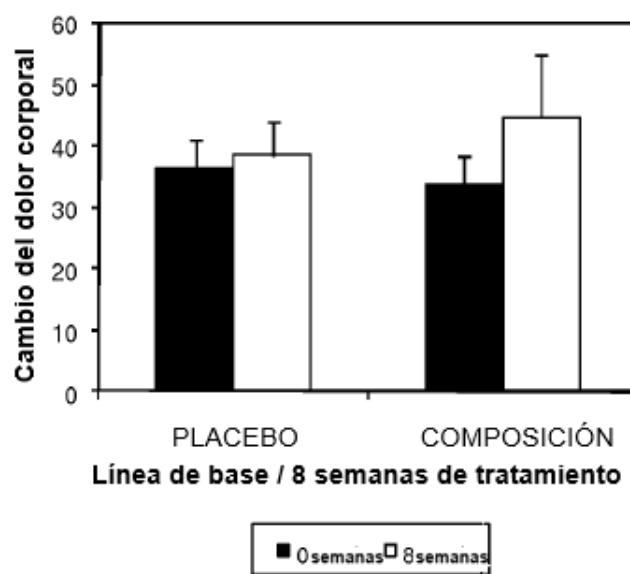


FIGURA 5

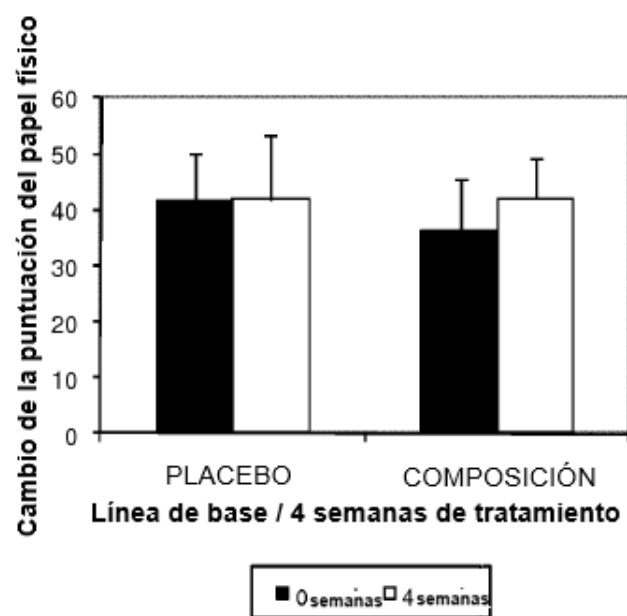


FIGURA 6

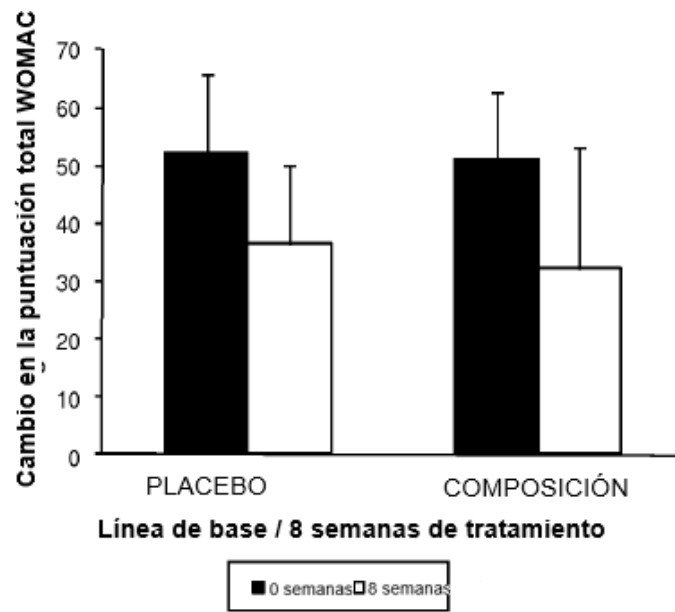


FIGURA 7

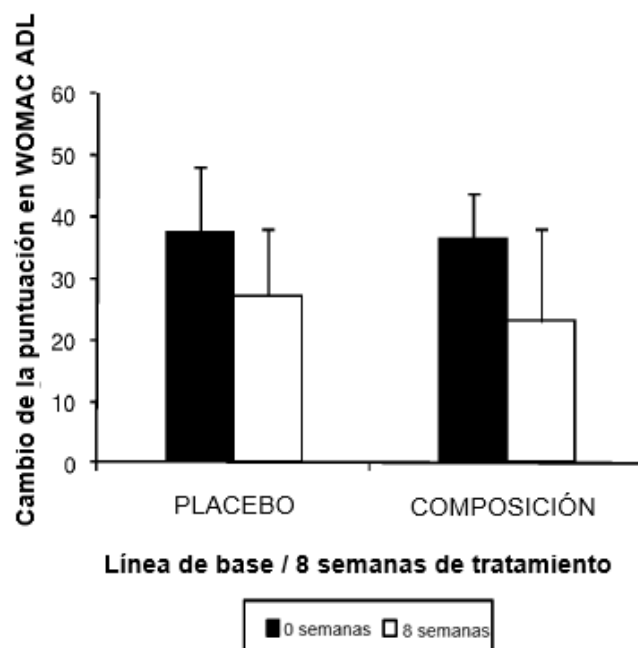


FIGURA 8