

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 438**

51 Int. Cl.:

A61K 36/738 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A23L 33/18 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2010 PCT/EP2010/058674**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010 WO10149596**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010 E 10725744 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2445510**

54 Título: **Composición para el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones**

30 Prioridad:
22.06.2009 DE 102009030351

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:
**GELITA AG (100.0%)
Uferstrasse 7
69412 Eberbach, DE**

72 Inventor/es:
OESSER, STEFFEN

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 656 438 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

Composición para el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones

La presente invención se refiere a una composición, en particular en forma de un medicamento o de un suplemento dietético para el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones.

5 Enfermedades degenerativas de las articulaciones, que se caracterizan por un desgaste o deterioro del cartílago de la articulación, se reúnen la mayoría de las veces bajo el término artrosis. En parte, se utiliza de manera sinónima también el término osteoartritis, tomado de la bibliografía de lengua inglesa. Enfermedades degenerativas de las articulaciones están ampliamente difundidas en toda la población, aumentando fuertemente la frecuencia de la manifestación con la edad. Las articulaciones afectadas más frecuentemente son las articulaciones de la rodilla y la cadera.

10 Las causas del desgaste de la articulación son diversas y pueden encontrarse tanto en la inferioridad biológica del tejido cartilaginoso (artrosis primaria) como en factores de influencia tales como una sobrecarga mecánica (p. ej., por una posición viciada de la articulación), inflamaciones o trastornos metabólicos (artrosis secundaria). En cualquier caso, en el caso de una enfermedad progresiva puede producirse una pérdida completa del cartílago de la articulación, de modo que las superficies subcondriales del hueso quedan al descubierto y rozan una con otra, lo cual conduce a trastornos considerables en el caso de los pacientes afectados.

15 El tejido cartilaginoso se compone en su mayor parte de una matriz extracelular, cuyos componentes son sintetizados por condrocitos (células del cartílago) distribuidos en la matriz. En el caso del cartílago de la articulación (cartílago de hialina), la masa seca de la matriz extracelular comprende aprox. 60% en peso de colágeno (predominantemente del tipo II), aprox. 25 a 35% en peso de proteoglicanos, así como 15 a 20% en peso de proteínas no colagenosas. La constitución y degradación de la matriz extracelular sigue un mecanismo de regulación complejo, en donde en tejido cartilaginoso sano, los condrocitos reaccionan a una composición modificada de la matriz, regulándose la biosíntesis de los componentes de la matriz de manera correspondiente. El abastecimiento del tejido cartilaginoso con sustancias nutritivas tiene lugar en este caso sólo mediante las variaciones periódicas de la presión dentro de la articulación, dado que en el cartílago no están presentes vasos sanguíneos ni linfáticos.

20 Desde hace tiempo se conoce tratar las enfermedades degenerativas de las articulaciones mediante la administración oral de un hidrolizado de colágeno. Para la eficacia de este tratamiento en relación con un alivio de los trastornos se llevaron a cabo mientras tanto una serie de ensayos clínicos (véase A. Bello y S. Oesser (2006), *Current Medical Research and Opinion* (22) 2221-2232). A pesar de que todavía no está claro el modo de acción exacto del hidrolizado de colágeno, se parte del hecho de que los fragmentos de colágeno son resorbidos en el torrente sanguíneo y en el tejido cartilaginoso estimulan la síntesis de la matriz extracelular al intervenir en el mecanismo de regulación arriba descrito. Mediante ensayos *in vitro* con condrocitos pudo detectarse que la biosíntesis y secreción de colágeno está incrementada en ausencia de hidrolizado de colágeno (véase S. Oesser y J. Seifert (2003), *Cell Tissue Research* (311) 393-399).

25 La solicitud de patente internacional WO 2009/080778 A2, publicada posteriormente, da a conocer una composición que contiene un extracto vegetal antiinflamatorio a base de escaramujo junto con una sustancia protectora del cartílago la cual se elige, entre otras, de hidrolizados de colágeno, así como un procedimiento para la producción del extracto de escaramujo.

30 La invención tiene por misión proporcionar una composición para el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones con una eficacia mejorada.

Este problema se resuelve conforme a la invención mediante una composición que comprende hidrolizado de colágeno y polvo y/o extracto de escaramujo, encontrándose la relación ponderal de hidrolizado de colágeno a polvo y/o extracto de escaramujo, en cada caso referido a la masa seca, en el intervalo de aprox. 10:1 a aprox. 20:1.

35 Sorprendentemente, se encontró que el efecto estimulante de hidrolizado de colágeno sobre la biosíntesis de colágeno y proteoglicanos en los condrocitos puede ser potenciado mediante una combinación de polvo o extracto de escaramujo. Este efecto se basa en un efecto sinérgico, dado que una estimulación de este tipo no se observa mediante el polvo o extracto de escaramujo solo.

40 La aplicación médica de escaramujos, también en relación con la artrosis, es en sí conocida. Esta aplicación se basa, sin embargo, en un efecto antiinflamatorio de un galactolípido (GOPO) contenido en particular en el polvo de escaramujo. Las inflamaciones pueden ser la causa y/o un efecto secundario de enfermedades degenerativas de las articulaciones, y existen estudios que muestran un alivio del dolor mediante la ingesta de polvo de escaramujo (véase, D. Warholm et al. (2003), *Current Therapeutic Research* (64) 21-31). Hasta ahora no se describió una influencia de polvo o extracto de escaramujo sobre la biosíntesis de componentes del cartílago.

45 En el caso de la composición conforme a la invención, la relación ponderal de hidrolizado de colágeno a polvo y/o extracto de escaramujo, en cada caso referido a la masa seca, se encuentra en el intervalo de aprox. 10:1 hasta aprox. 20:1. En el caso de relaciones ponderales por encima de aprox. 100:1, es decir, en el caso de utilizar menos

de aprox. 1% en peso de polvo y/o extracto de escaramujo, referido al hidrolizado de colágeno, el efecto sinérgico arriba descrito no puede detectarse por norma general. Por otra parte, mediante el uso de más de aprox. 50% en peso de polvo y/o extracto de escaramujo, referido al hidrolizado de colágeno (es decir, en el caso de una relación por debajo de aprox. 2:1), ya sólo se puede alcanzar un aumento irrelevante o incluso ningún aumento de este efecto. El efecto descrito puede alcanzarse, por lo tanto, con un defecto de polvo y/o extracto de escaramujo.

Por hidrolizado de colágeno se entiende en el marco de la presente invención todo producto de la hidrólisis de colágeno que, en virtud de un peso molecular suficientemente bajo ya no gelifique bajo las condiciones del ensayo estándar de Bloom (eflorescencia), es decir, presenta un poder de gelificación de 0 g Bloom. Preferiblemente, el hidrolizado de colágeno se obtiene mediante hidrólisis enzimática de colágeno del tipo I y/o del tipo II. Se ha demostrado que el efecto estimulante sobre la biosíntesis de la matriz extracelular del tejido cartilaginoso (que se compone predominantemente de colágeno del tipo II) es esencialmente independiente del tipo del hidrolizado de colágeno, lo que apunta a que los fragmentos de péptido en el hidrolizado de colágeno del tipo I y del tipo II presentan la misma estructura o una estructura similar.

Como material de partida para la producción de hidrolizado de colágeno se adecuan, en particular, huesos, piel, tejido conjuntivo (en cada caso del tipo I) o cartílago (tipo II) de diferentes animales. Materiales de partida típicos son, p. ej., huesos de vacuno, serraje de vacuno y corteza de cerdo, pero también hidrolizado de colágeno puede obtenerse, p. ej., a partir de colágeno de aves de corral o peces. El procedimiento de preparación para el hidrolizado de colágeno puede partir en este caso tanto de colágeno nativo como de gelatina, es decir, colágeno extraído y desnaturalizado.

El hidrolizado de colágeno en la composición de acuerdo con la invención presenta preferiblemente un peso molecular medio de aprox. 0,3 kDa hasta aprox. 30 kDa, en particular de aprox. 2 kDa hasta aprox. 10 kDa. La distribución del peso molecular del hidrolizado de colágeno puede controlarse mediante la elección de enzimas proteolíticas adecuadas (la mayoría de las veces proteasas bacterianas). Adicionalmente, fracciones de peso molecular individuales del hidrolizado pueden separarse eventualmente por ultrafiltración o procedimientos cromatográficos.

En el caso del polvo y/o extracto de escaramujo en la composición de acuerdo con la invención puede tratarse, en el sentido más amplio, de todos los productos que se obtienen a partir del escaramujo. Escaramujos son los frutos falsos de diferentes especies de rosa, utilizándose preferiblemente los escaramujos de rosal silvestre (*Rosa canina*). Se componen esencialmente de la pulpa o bien de la piel (*Fructus cynosbati*) y de las semillas (*Semen cynosbati*), de las que en un sentido botánico se trata de nueces. La pulpa sin las nueces se denomina también *Cynosbati sine semine*.

De acuerdo con una forma de realización de la invención, la composición comprende un polvo de escaramujo de *Fructus cynosbati* y/o *Semen cynosbati*. Por un polvo se ha de entender en este caso en el marco de la invención cualquier producto esencialmente homogéneo que contenga todos los componentes de los escaramujos o de las partes utilizadas de los escaramujos, independientemente del tamaño de las partículas. Sin embargo, se prefiere un polvo lo más finamente dividido posible, ya que con ello se puede obtener más fácilmente una mezcla homogénea con el hidrolizado de colágeno y eventualmente otros componentes de la composición de acuerdo con la invención, y los componentes eficaces del escaramujo pueden pasar a disolución más rápidamente. Un polvo de escaramujo puede obtenerse, en particular, mediante secado y molienda de *Fructus cynosbati* tal como se describe, por ejemplo, en el documento EP 1 071 439 B1.

De acuerdo con otra forma de realización de la invención, la composición comprende un extracto de escaramujo de *Fructus cynosbati* y/o *Semen cynosbati*. Por un extracto se ha de entender en este caso en el marco de la invención todo producto que se obtiene mediante extracción de los escaramujos o de las partes de los escaramujos utilizadas con un agente de extracción fluido. La relación ponderal arriba definida del extracto de escaramujo al hidrolizado de colágeno se refiere en este caso a la masa seca de los componentes extraídos sin el agente de extracción. El uso de un extracto se prefiere frente al uso de un polvo, dado que la composición de un extracto es, por norma general, mejor reproducible. Además de ello, un extracto de escaramujo puede también utilizarse directamente en forma líquida como componente de una composición líquida de acuerdo con la invención, lo cual no es posible en el caso de un polvo de escaramujo. Si se utiliza un extracto seco, éste puede dispersarse o bien disolverse mejor que un polvo de escaramujo.

Es particularmente favorable que el extracto de escaramujo se obtenga mediante extracción de *Fructus cynosbati* con un agente de extracción acuoso que contenga hasta 50% en vol. de etanol. En particular, se puede emplear también un agente de extracción puramente acuoso sin etanol, de modo que el extracto de escaramujo obtenido sea soluble por completo y bien en agua. De manera interesante, se ha demostrado que extractos de escaramujo acuosos o acuosos/alcohólicos de este tipo, que en el marco de la presente invención son extremadamente eficaces, no contienen a menudo cantidades detectables del galactolípido GOPO, al que se hace responsable del efecto antiinflamatorio de preparados de escaramujo conocidos. Esto apunta a que el efecto sinérgico encontrado, es decir, el aumento del efecto del hidrolizado de colágeno sobre la biosíntesis de componentes de la matriz se haya de atribuir a otros componentes o bien a sustancias constitutivas del escaramujo hasta ahora no identificadas.

- 5 El extracto de escaramujo puede ser sometido a diferentes tratamientos posteriores antes del uso en la composición de acuerdo con la invención. Un tratamiento posterior de este tipo comprende preferiblemente un tratamiento enzimático y/o una filtración en membrana. Mediante estos procedimientos pueden degradarse o bien separarse componentes indeseados del extracto, con lo cual se puede aumentar la eficacia del extracto bajo determinadas circunstancias.
- 10 El tratamiento enzimático comprende preferiblemente un tratamiento del extracto de escaramujo con una o varias enzimas que se eligen de glicosidasas, celulasas y pectinasas. Mezclas enzimáticas de este tipo se emplean, entre otros, también para la clarificación del vino y se pueden obtener, p. ej., bajo el nombre de marca Ultrazym®.
- 15 La filtración en membrana comprende preferiblemente una filtración del extracto de escaramujo con un tamaño de exclusión de aprox. 1 kDa hasta aprox. 500 kDa, en particular de aprox. de 10 kDa hasta aprox. 300 kDa. En este caso, se separan sustancias con un peso molecular por encima del tamaño de exclusión respectivo y el material permeado se continúa utilizando para la composición de acuerdo con la invención.
- 20 Objeto de la presente invención es, además, un medicamento o suplemento dietético que comprende la composición precedentemente descrita, que comprende hidrolizado de colágeno y polvo o extracto de escaramujo. En particular, la invención se refiere a un medicamento o suplemento dietético de este tipo para el tratamiento o la prevención de enfermedades degenerativas de las articulaciones.
- 25 Dado que los componentes esenciales de la composición de acuerdo con la invención son de origen animal o bien vegetal, no se requiere una autorización como medicamento y, por lo tanto, la composición puede declararse y ofrecerse también como suplemento dietético, como es habitual desde hace tiempo en el caso del hidrolizado de colágeno. No se ha de partir de efectos secundarios nocivos de la composición de acuerdo con la invención según el estado actual de conocimiento.
- 30 Las enfermedades degenerativas de las articulaciones que pueden ser tratadas con el medicamento o suplemento dietético de acuerdo con la invención comprenden, en particular, artrosis en todas las formas de manifestación y, en general, todas las enfermedades que van acompañadas de un deterioro o bien de un desgaste del tejido cartilaginoso, en particular artritis reumatoide, enfermedades del círculo de formas reumáticas, espondilitis y fibromialgia.
- 35 En virtud de su modo de acción, el medicamento o suplemento dietético de acuerdo con la invención se adecua no sólo para el tratamiento de enfermedades agudas, sino también para su prevención, en particular en el caso de personas que, en virtud de un trastorno metabólico o de una sollicitación superior a la media de las articulaciones (p. ej., deportistas) están particularmente amenazadas. Bajo este aspecto, la invención se refiere también a un medicamento o suplemento dietético del tipo arriba descrito para la estimulación de la formación de tejido cartilaginoso.
- 40 El medicamento o suplemento dietético puede presentarse en forma de una solución, de un jarabe, de un polvo o de un granulado. En el caso de utilizar un polvo de escaramujo en la composición de acuerdo con la invención, ésta se presenta en conjunto en forma sólida, mientras que en el caso de utilizar un extracto de escaramujo se puede formular tanto una composición líquida como también una composición sólida como medicamento o suplemento dietético. Las formas de administración mencionadas posibilitan una dosificación individual por parte del usuario, alternativamente también se puede ofrecer, p. ej., una solución previamente dosificada en ampollas.
- 45 Alternativamente, el medicamento o suplemento dietético puede presentarse también en forma sólida, pre-dosificada, es decir, en particular en forma de comprimidos, comprimidos con película, cápsulas, pastillas o grageas. De manera favorable una dosis del medicamento o del suplemento dietético abarca aprox. 0,1 g hasta aprox. 20 g de hidrolizado de colágeno, en particular, aprox. 1 g a 10 g, lo cual corresponde a una dosis diaria preferida. Por ejemplo, una dosis puede abarcar 10 g de hidrolizado de colágeno y, de manera correspondiente, de aprox. 0,1 g a aprox. 5 g de polvo y/o extracto de escaramujo.
- Estas y otras ventajas de la invención se explican con mayor detalle con ayuda de los siguientes Ejemplos haciendo referencia a las Figuras. En particular, muestran:
- La Figura 1: diagrama para la biosíntesis de colágeno (extracto de escaramujo);
- la Figura 2: diagrama para la biosíntesis de proteoglicanos (extracto de escaramujo);
- la Figura 3: diagrama para la expresión de ARN de colágeno (extracto de escaramujo);
- 50 la Figura 4: diagrama para la expresión de ARN de agrecano (extracto de escaramujo);
- la Figura 5: diagrama para la biosíntesis de colágeno (extracto de escaramujo);
- la Figura 6: diagrama para la biosíntesis de proteoglicanos (extracto de escaramujo);

- la Figura 7: diagrama para la biosíntesis de colágeno (polvo de escaramujo);
 la Figura 8: diagrama para la biosíntesis de proteoglicanos (polvo de escaramujo);
 la Figura 9: diagrama para la expresión de ARN de colágeno (polvo de escaramujo);
 la Figura 10: diagrama para la expresión de ARN de agrecano (polvo de escaramujo);
 5 la Figura 11: diagrama para la biosíntesis de colágeno (polvo de escaramujo); y
 la Figura 12: diagrama para la biosíntesis de proteoglicanos (polvo de escaramujo).

El efecto sinérgico de la composición de acuerdo con la invención sobre la biosíntesis de los componentes esenciales de la matriz del tejido cartilaginoso se detectó con ayuda de un modelo *in vitro* con condrocitos porcinos y humanos.

10 Hidrolizado de colágeno

El hidrolizado de colágeno utilizado para los ensayos presenta un peso molecular medio de aprox. 3 kDa y se prepara mediante hidrólisis de colágeno animal del tipo I con ayuda de proteasas bacterianas. Este hidrolizado de colágeno es comercializado por la solicitante bajo el nombre Fortigel® como suplemento dietético para la estimulación de la formación de tejido cartilaginoso.

15 Extracto de escaramujo

Se utilizó un extracto acuoso a base de cáscaras del escaramujo (*Fructus cynosbati*) del rosal silvestre. Un extracto de escaramujo de este tipo puede producirse extrayendo, p. ej., 1 kg de cáscaras de escaramujo dos veces con en cada caso 6 l de agua a 50°C durante un tiempo de 6 h. Después de dejar reposar, las soluciones de extracto se reúnen y se filtran con clarificación. Después de la centrifugación del agente de extracción, el extracto se puede
 20 secar en vacío a 50°C.

La masa seca del extracto de escaramujo obtenida de este modo corresponde a un rendimiento en el intervalo de aprox. 35 a 45%. El extracto no contiene cantidades detectables del galactolípido GOPO.

Polvo de escaramujo

Se utilizó un polvo de escaramujo producido según un procedimiento estandarizado que es comercializado bajo el nombre LITIZIN® por Queisser Pharma GmbH & Co. KG (Flensburg). Este polvo de escaramujo contiene
 25 cantidades relativamente grandes del galactolípido GOPO.

Cultivo de condrocitos *in vitro*

Para los cultivos celulares, condrocitos porcinos o bien humanos se aislaron de manera conocida a partir de tejido cartilaginoso y se sembraron con una densidad de aprox. 350.000 células/cm² en placas de cultivo. Como medio de cultivo se utilizó medio de Ham F12 con suero de ternero fetal al 10%, 10 µg/ml de gentamicina y 5 µg/ml de anfotericina B. El cultivo tuvo lugar a 37°C en una atmósfera reducida en oxígeno (5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂)
 30

En función de la tanda (véase más abajo) se añadieron al medio de cultivo hidrolizado de colágeno y/o extracto de escaramujo

35 Determinación de la biosíntesis de colágeno

La cuantificación del colágeno sintetizado por los condrocitos (esencialmente del tipo II) tiene lugar mediante marcaje radioactivo con ¹⁴C-prolina, el cual es incorporado en el colágeno.

Al medio de cultivo se añade primeramente ¹⁴C-prolina radiactiva, y los condrocitos se cultivan bajo estas condiciones hasta el instante de la determinación. Con el fin de poder diferenciar en la detección la ¹⁴C-prolina incorporada de la no incorporada, el medio de cultivo con contenido en isótopos es reemplazado entonces durante un espacio de tiempo de 3 días por medio de cultivo puro. A continuación, se desecha el medio de cultivo, y el césped de células adherente se mezcla con agua destilada con el fin de destruir mediante estrés osmótico las membranas celulares y liberar ¹⁴C-prolina citosólica no unida. Mediante centrifugación, los desechos celulares se sedimentan con la matriz extracelular sintetizada. El sedimento se resuspende en agua recién destilada y se mezcla
 40 con un cóctel de centelleo con xileno. Mediante detección de la ¹⁴C-prolina con un contador beta puede cuantificarse
 45 entonces la cantidad del colágeno sintetizado.

Determinación de la biosíntesis de proteoglicano

La cuantificación de los proteoglicanos sintetizados por los condrocitos tiene lugar mediante una tinción con azul alcian y determinación fotométrica de los glicosaminoglicanos (GAG), que son componentes de los proteoglicanos.

5 Con el fin de determinar el contenido en GAG en el cultivo celular, primeramente se desecha el medio de cultivo y el césped celular adherente se aclara con tampón PBS (pH 7). A continuación, las células se fijan a 4°C durante 2 horas en una solución de formaldehído al 10% en PBS. Después de separar el formaldehído, el reactivo de tinción azul alcian (5% de azul alcian en ácido acético al 3%) se añade al césped de células y se incuba durante una noche a 4°C. El azul alcian no unido se desecha y se separa por lavado mediante aclarado cuidadoso durante tres a cuatro veces con PBS. Mediante la adición de solución ácida de guanidina (8 mol/l) se desprenden por disolución del 10 césped de células los complejos de GAG. La cantidad de glicosaminoglicanos puede cuantificarse entonces fotométricamente a una longitud de onda de 620 nm.

Determinación de la expresión de ARN de colágeno y agrecano

Como indicador indirecto para la biosíntesis de colágeno y proteoglicanos sirve también la cantidad del ARN expresado que codifica colágeno del tipo II o bien agrecano, un importante proteoglicano. La determinación tiene lugar de forma semi-cuantitativa en relación con el ARN de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH).

15 Primeramente, se separa el medio de cultivo y el césped de células se disuelve mediante la adición de Trizol[®]. El ARN se aísla de manera conocida con cloroformo e isopropanol. La cantidad de ARN aislado se determina fotométricamente a 260 nm y, a continuación, 1 µg de ARN se transforma mediante transcripción inversa en ADNc. Las secuencias específicas se amplifican en cada caso con los siguientes pares de cebadores (para condrocitos porcinos):

20 Colágeno tipo II:

5'-CCACTGCTCTCTGCCATACA-3' (SEQ ID N° 1)

5'-GTCCAGGTAGGCAATGCTGT-3' (SEQ ID N° 2)

Agrecano:

5'-GGAGAAGAGATGCCAACAGC-3' (SEQ ID N° 3)

25 5'-ATGCTGCTCAGGTGTGACTG-3' (SEQ ID N° 4)

GAPDH:

5'-GGGCATGAACCATGAGAAGT-3' (SEQ ID N° 5)

5'-AAGCAGGGATGATGTTCTGG-3' (SEQ ID N° 6)

30 La amplificación se lleva a cabo por cada muestra con 1 µl de ADNc, 19,65 µl de agua dest., 3 µl de tampón de oro 10x, 2,4 µl de MgCl₂ 25 mM, dNTP 0,6 mM, en cada caso 0,6 µl del cebador específico y 0,15 µl de AmpliTaq[®]-polimerasa. El programa de termociclador abarca una iniciación a 95°C durante 10 min, una desnaturalización a 94°C durante 1 min, la reacción por adición de los cebadores a 69°C (agrecano), 64°C (colágeno tipo II) o bien 58°C (GAPDH) durante 30 s y una elongación a 72°C durante 30 s. En cada caso se llevan a cabo 35 ciclos antes de 35 inactivar la polimerasa a 70°C durante 10 min. Los productos de ADNc se separan entonces electroforéticamente sobre un gel de agarosa-bromuro de etidio al 5%, y su cantidad se determina densitométricamente con un procedimiento emisor de imágenes. La expresión del ARN de colágeno y agrecano se evalúa de forma semicuantitativa en relación con el ARN de GAPDH.

Resultados con extracto de escaramujo

40 La biosíntesis de colágeno y de proteoliglicanos, así como la expresión de ARN de colágeno y ARN de agrecano se determinó para las siguientes tandas de cultivos celulares y en cada caso se comparó entre sí:

Tanda A: control (medio de cultivo sin hidrolizado de colágeno o extracto de escaramujo)

Tanda B: medio de cultivo con 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno

Tanda C: medio de cultivo con 0,035 mg/ml de extracto de escaramujo (sustancia seca)

45 Tanda D: medio de cultivo con 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno y 0,035 mg/ml de extracto de escaramujo (sustancia seca)

Para la determinación de la biosíntesis de colágeno y proteoglicanos, las células se cultivaron en cada caso durante 3 días bajo las condiciones correspondientes, para la determinación de la expresión de ARN, en cada caso durante 1 día. Se obtuvieron en cada caso resultados equiparables con condrocitos porcinos o bien humanos.

En la Figura 1 se representan gráficamente los resultados para la biosíntesis de colágeno, a saber, para las tandas B, C y D en cada caso en relación con la tanda A (control = 1). Los resultados representan los valores medios de en cada caso al menos siete determinaciones independientes.

- 5 Mientras que la biosíntesis de colágeno mediante la adición de hidrolizado de colágeno aumenta en aprox. 20%, la adición de extracto de escaramujo solo no conduce a efecto relevante alguno. En el caso de la adición simultánea de hidrolizado de colágeno y extracto de escaramujo (en una relación ponderal de aprox. 14:1) se observa, sin embargo, un aumento de la biosíntesis de colágeno en aprox. 50% con respecto al control. Este resultado pone de manifiesto que el extracto de escaramujo en forma de un efecto sinérgico potencia el efecto estimulante del hidrolizado de colágeno sobre la biosíntesis de colágeno.
- 10 En la Figura 2 se representan los valores correspondientes para la biosíntesis de proteoglicanos, tratándose de valores medios de en cada caso al menos seis determinaciones independientes. Mientras que aquí en el caso de la tanda C (extracto de escaramujo solo) se observa incluso una biosíntesis de proteoglicano algo menor que en el caso del control, las tasas de incremento en el caso de las tandas B (hidrolizado de colágeno) y D (hidrolizado de colágeno con extracto de escaramujo) son equiparables a las de la biosíntesis de colágeno.
- 15 También en el plano de la expresión de ARN se pudo confirmar este efecto. La Figura 3 muestra los resultados para la expresión de ARN de colágeno (valores medios de en cada caso 16 determinaciones) y la Figura 4 muestra los resultados para la expresión de ARN de agregano (valores medios de en cada caso diez determinaciones). En ambos casos, la cantidad de ARN aumentó mediante la adición de hidrolizado de colágeno en aprox. 20% con respecto al control y mediante la adición de hidrolizado de colágeno y extracto de escaramujo en la relación ponderal de aprox. 14:1, en aprox. 40%.
- 20

Se llevaron a cabo otros ensayos con el fin de determinar la influencia de la cantidad del extracto de escaramujo empleado. Para ello se compararon entre si las siguientes tandas de cultivos celulares:

- Tanda E: control (sin hidrolizado de colágeno o extracto de escaramujo)
- Tanda F: 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno
- 25 Tanda G: 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno y 0,0035 mg/ml de extracto de escaramujo
- Tanda H: 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno y 0,035 mg/ml de extracto de escaramujo
- Tanda I: 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno y 0,35 mg/ml de extracto de escaramujo

- 30 La Figura 5 muestra los resultados en relación con la biosíntesis de colágeno, y la Figura 6 en relación con la biosíntesis de proteoglicanos (valores medios de en cada caso al menos seis determinaciones independientes). En ambos casos, en el caso de la tanda G (relación ponderal de hidrolizado de colágeno a extracto de escaramujo de aprox. 140:1) se manifiesta únicamente el mismo efecto estimulante de aprox. 20% que en el caso de la tanda F (sólo hidrolizado de colágeno). La tanda H (relación ponderal, aprox. 14:1) muestra los aumentos correspondientes a la tanda D anterior de aprox. 50% o bien aprox. 40%. Si se decuplica de nuevo la cantidad de extracto de escaramujo (tanda I, relación ponderal, aprox. 1,4:1), entonces en el caso de la biosíntesis de colágeno (Figura 5) resulta ya sólo un aumento sub-proporcional hasta escasamente 60% con respecto al control, en el caso de la biosíntesis de proteoglicanos, el resultado es incluso algo peor que en el caso de la tanda H.
- 35

Resultados con polvo de escaramujo

La biosíntesis de colágeno y de proteoglicanos, así como la expresión de ARN de colágeno y ARN de agregano se determinaron para las siguientes tandas de cultivos celulares y se compararon en cada caso entre sí:

- 40 Tanda K: control (medio de cultivo sin hidrolizado de colágeno o polvo de escaramujo)
- Tanda L: medio de cultivo con 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno
- Tanda M: medio de cultivo con 0,05 mg/ml de polvo de escaramujo
- Tanda N: medio de cultivo con 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno y 0,5 mg/ml de polvo de escaramujo

- 45 El cultivo de las células y la subsiguiente determinación de la biosíntesis de colágeno y proteoglicanos así como la expresión de ARN tuvieron lugar en cada caso como en el caso de utilizar extracto de escaramujo (véase arriba).

También los resultados descritos en lo que sigue para condrocitos porcinos son esencialmente equiparables con aquellos que se observaron al utilizar extracto de escaramujo. Con condrocitos humanos se alcanzaron resultados similares.

- 50 En la Figura 7 se representan los resultados para la biosíntesis de colágeno, a saber, para las tandas L, M y N en cada caso en relación con la tanda K (control = 1). Los resultados representan los valores medios de en cada caso al

menos siete determinaciones independientes. La biosíntesis de colágeno se aumenta en aprox. 25% mediante la adición de hidrolizado de colágeno, mediante la adición de polvo de escaramujo únicamente en aprox. 5%. En el caso de la adición simultánea de hidrolizado de colágeno y polvo de escaramujo (en una relación ponderal de 10:1) se observa, sin embargo, un aumento de aprox. 50%.

- 5 En el caso de los valores representados en la Figura 8 para la biosíntesis de proteoglicanos se muestra todavía más claramente la presencia de un efecto sinérgico. La adición de polvo de escaramujo solo (tanda M) conduce a una biosíntesis de proteoglicanos algo menor que en el caso del control (tanda K), mientras que mediante la combinación de polvo de escaramujo con hidrolizado de colágeno (tanda N) se alcanza un aumento aproximadamente dos veces y medio tan alto que mediante el hidrolizado de colágeno solo (tanda L).
- 10 La expresión de ARN de colágeno (Figura 9) y ARN de agregano (Figura 10) muestra una imagen similar. El aumento de la expresión con respecto al control es en el caso de la tanda N aproximadamente tres veces tan alto (ARN de colágeno) o bien aproximadamente dos veces tan alto (ARN de agregano) como en el caso de la tanda L.

Con el fin de determinar la influencia de la cantidad del polvo de escaramujo empleado se llevó a cabo una serie de ensayos con las siguientes tandas de cultivos celulares:

- 15 Tanda O: control (sin hidrolizado de colágeno o polvo de escaramujo)
 Tanda P: 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno
 Tanda Q: 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno y 0,005 mg/ml de polvo de escaramujo
 Tanda R: 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno y 0,05 mg/ml de polvo de escaramujo
 Tanda S: 0,5 mg/ml de hidrolizado de colágeno y 0,5 mg/ml de polvo de escaramujo.

- 20 La Figura 11 muestra los resultados en relación con la biosíntesis de colágeno y la Figura 12 en relación con la biosíntesis de proteoglicanos. En el caso de la tanda Q (relación ponderal de hidrolizado de colágeno a polvo de escaramujo de 100:1) se manifiesta un efecto sólo ligeramente mayor o bien menor que en el caso de la tanda P (sólo hidrolizado de colágeno), es decir, un aumento de la biosíntesis en el intervalo de aprox. 20%. En el caso de la tanda R (relación ponderal de 10:1) se observa de nuevo en cada caso un aumento significativo de la biosíntesis en aprox. 50%, correspondiente a la tanda N anterior. Un aumento ulterior de la proporción de polvo de escaramujo a una relación ponderal de 1:1 (tanda S) conduce tanto en la biosíntesis del colágeno como en la biosíntesis de proteoglicanos a un aumento algo menor que en el caso de la tanda R.
- 25

- Los resultados precedentemente descritos confirman que mediante la adición de extracto de escaramujo o polvo de escaramujo se puede potenciar de manera significativa el efecto estimulante de hidrolizado de colágeno sobre la biosíntesis de los componentes principales de la matriz extracelular del tejido cartilaginoso. Una composición que contiene hidrolizado de colágeno y polvo y/o extracto de escaramujo en la relación ponderal de aprox. 2:1 hasta aprox. 100:1 puede emplearse entonces como un medicamento o suplemento dietético eficaz para el tratamiento o la prevención de enfermedades degenerativas de las articulaciones.
- 30

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> GELITA AG
- 5 <120> Composición para el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones
- <130> A 6 467 g
- <160> 6
- 10 <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> porcino
- 15 <400> CCACTGCTCT CTGCCATACA
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> porcino
- 20 <400> GTCCAGGTAG GCAATGCTGT
- 25 <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> porcino
- 30 <400> GGAGAAGAGA TGCCAACAGC
- <210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> porcino
- 35 <400> ATGCTGCTCA GGTGTGACTG
- <210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> porcino
- 40 <400> GGGCATGAAC CATGAGAAGT
- 45 <210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> porcino
- 50 <400> AAGCAGGGAT GATGTTCTGG

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende hidrolizado de colágeno y polvo y/o extracto de escaramujo, en donde la relación ponderal de hidrolizado de colágeno a polvo y/o extracto de escaramujo, en cada caso referido a la masa seca, se encuentra en el intervalo de aprox. 10:1 a aprox. 20:1.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, en donde el hidrolizado de colágeno se obtiene por hidrólisis enzimática de colágeno del tipo I y/o del tipo II.
3. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el hidrolizado de colágeno presenta un peso molecular medio de aprox. 0,3 kDa hasta aprox. 30 kDa, en particular de aprox. 2 kDa hasta aprox. 10 kDa.
- 10 4. Composición según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende un polvo de escaramujo de *Fructus cynosbati* y/o *Semen cynosbati*.
5. Composición según la reivindicación 4, en donde el polvo de escaramujo se obtiene mediante secado y molienda de *Fructus cynosbati*.
6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un extracto de escaramujo de *Fructus cynosbati* y/o *Semen cynosbati*.
- 15 7. Composición según la reivindicación 6, en donde el extracto de escaramujo se obtiene mediante extracción de *Fructus cynosbati* con un agente de extracción acuoso que contiene hasta 50% en vol. de etanol.
8. Composición según la reivindicación 7, en donde el extracto de escaramujo se obtiene mediante subsiguiente tratamiento enzimático y/o filtración en membrana.
- 20 9. Composición según la reivindicación 8, en donde el tratamiento enzimático comprende un tratamiento del extracto de escaramujo con una o varias enzimas que se eligen de glicosidasas, celulasas y pectinasas.
10. Composición según la reivindicación 8 o 9, en donde la filtración en membrana comprende una filtración del extracto de escaramujo con un tamaño de exclusión de aprox. 1 kDa hasta aprox. 500 kDa, en particular de aprox. de 10 kDa hasta aprox. 300 kDa.
- 25 11. Medicamento o suplemento dietético que comprende una composición según una de las reivindicaciones precedentes, en particular para el tratamiento o la prevención de enfermedades degenerativas de las articulaciones.
12. Medicamento o suplemento dietético según la reivindicación 11, en donde la enfermedad de las articulaciones se elige de artrosis, artritis reumatoide, enfermedades del círculo de formas reumáticas, espondilitis y fibromialgia.
13. Medicamento o suplemento dietético según la reivindicación 11 o 12, para la estimulación de la formación de tejido cartilaginoso.
- 30 14. Medicamento o suplemento dietético según una de las reivindicaciones 11 a 13, en forma de una solución, un jarabe, un polvo o un granulado, o en forma de comprimidos, comprimidos con película, cápsulas, pastillas o grageas.
- 35 15. Medicamento o suplemento dietético según la reivindicación 14, en donde una dosis del medicamento o del suplemento dietético abarca aprox. 0,1 g hasta aprox. 20 g de hidrolizado de colágeno, en particular, aprox. 1 g a aprox. 10 g.

Fig. 1

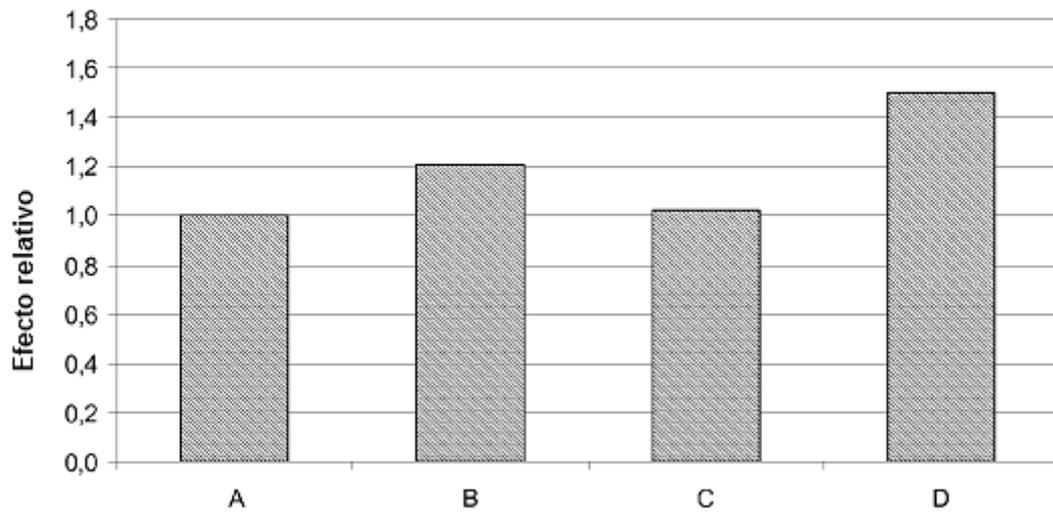


Fig. 2

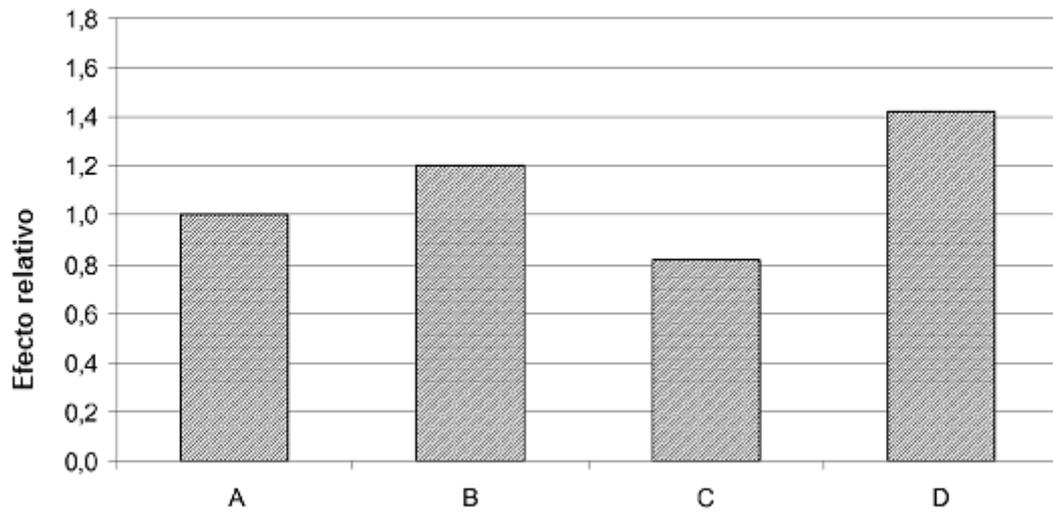


Fig. 3

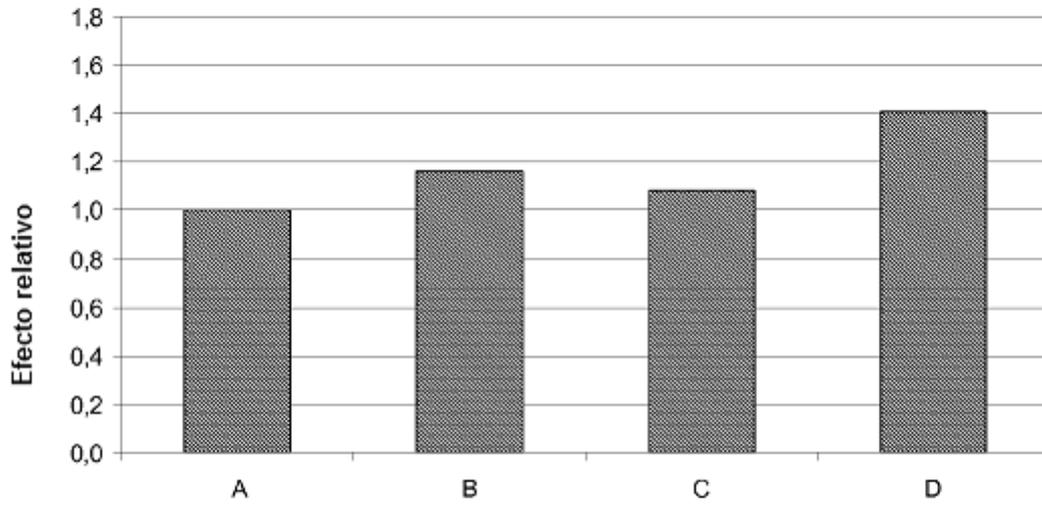


Fig. 4

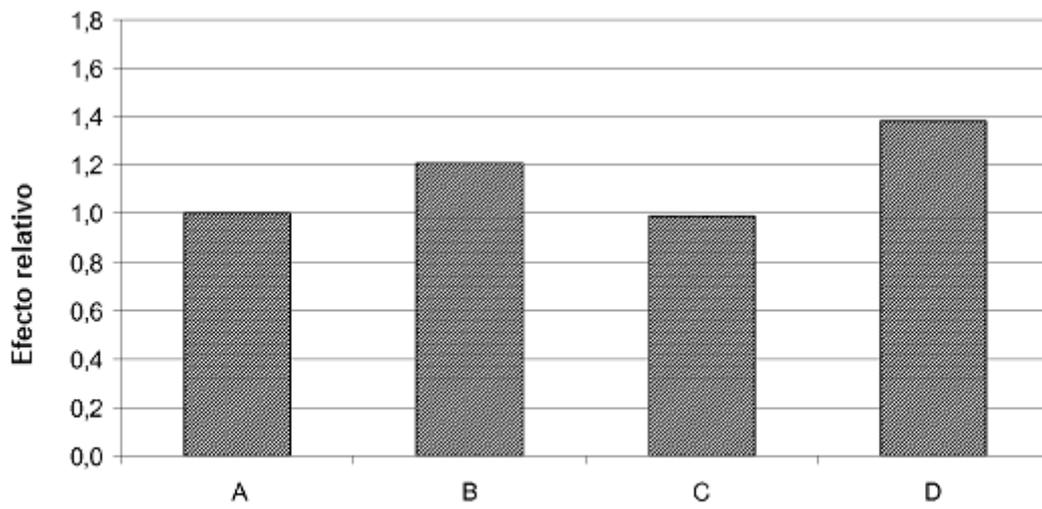


Fig. 5

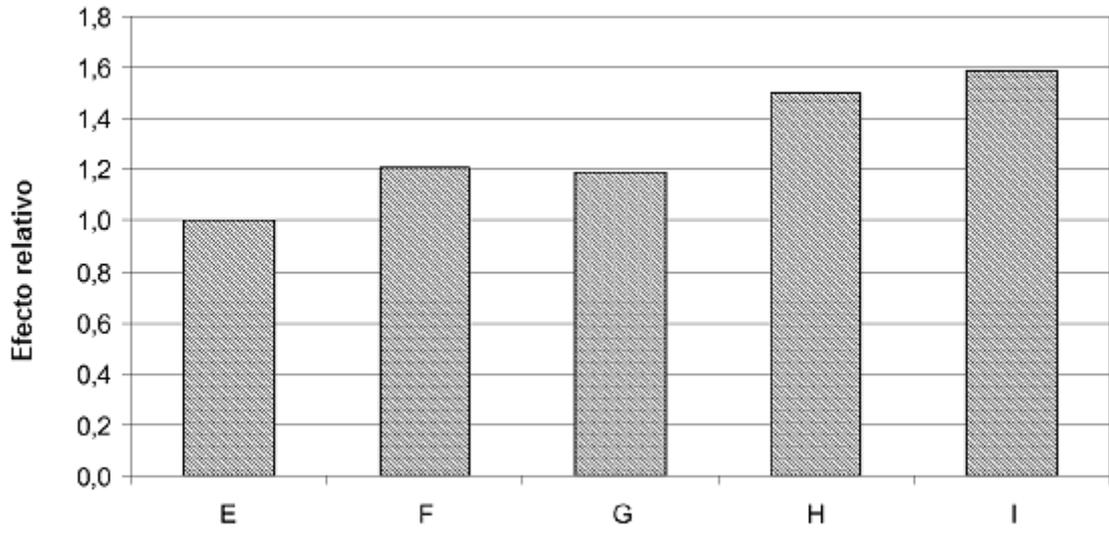


Fig. 6

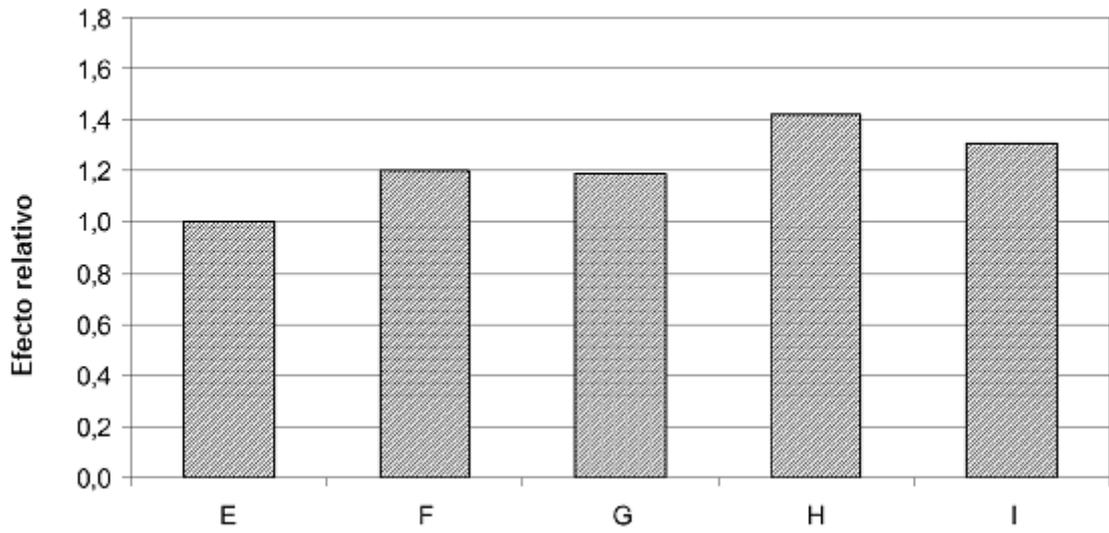


Fig. 7

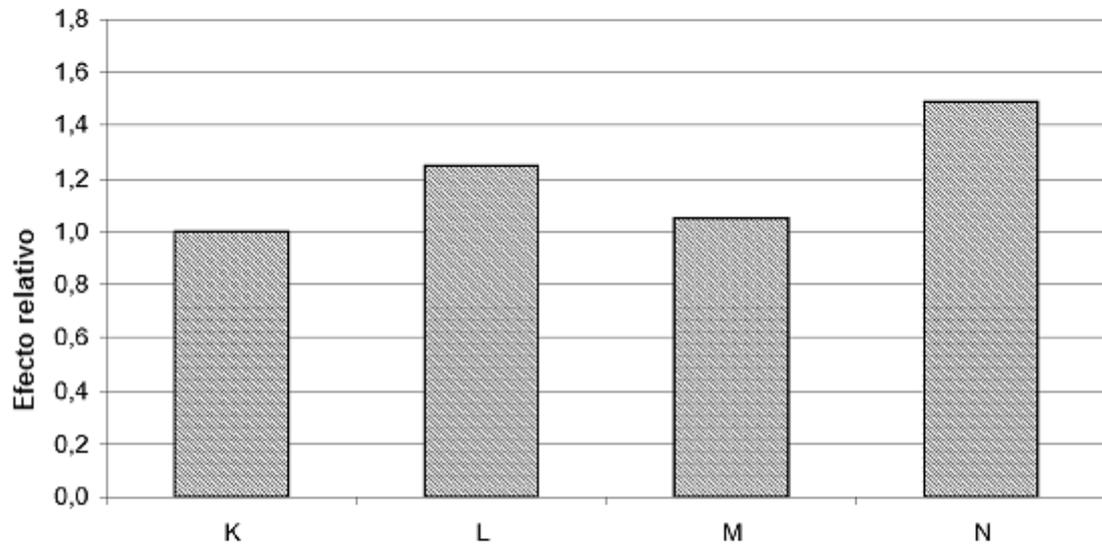


Fig. 8

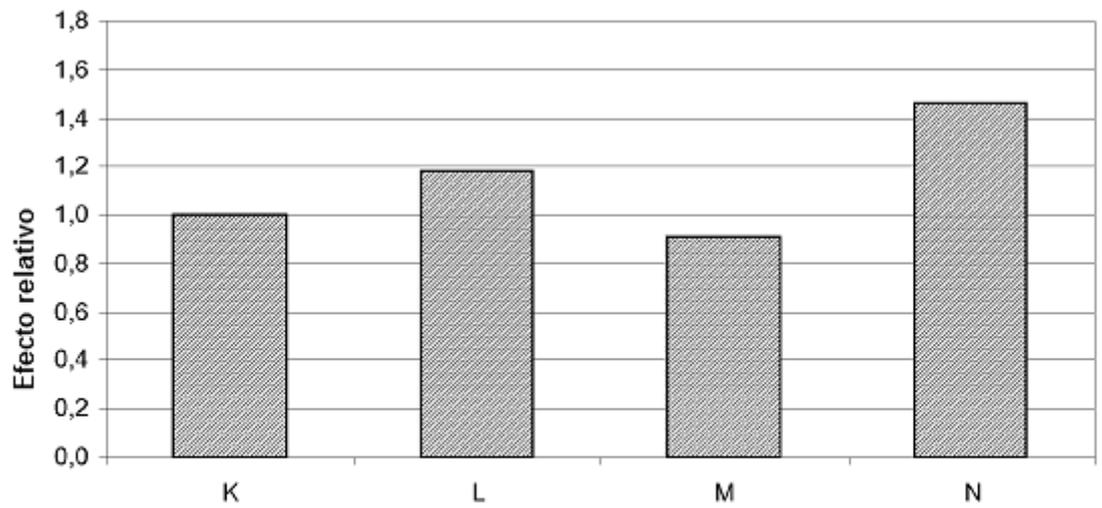


Fig. 9

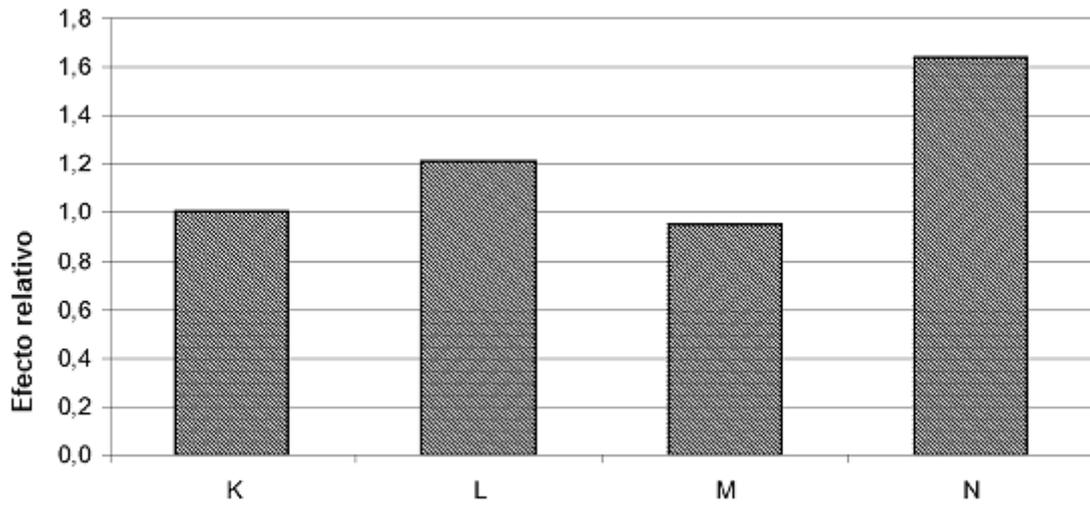


Fig. 10

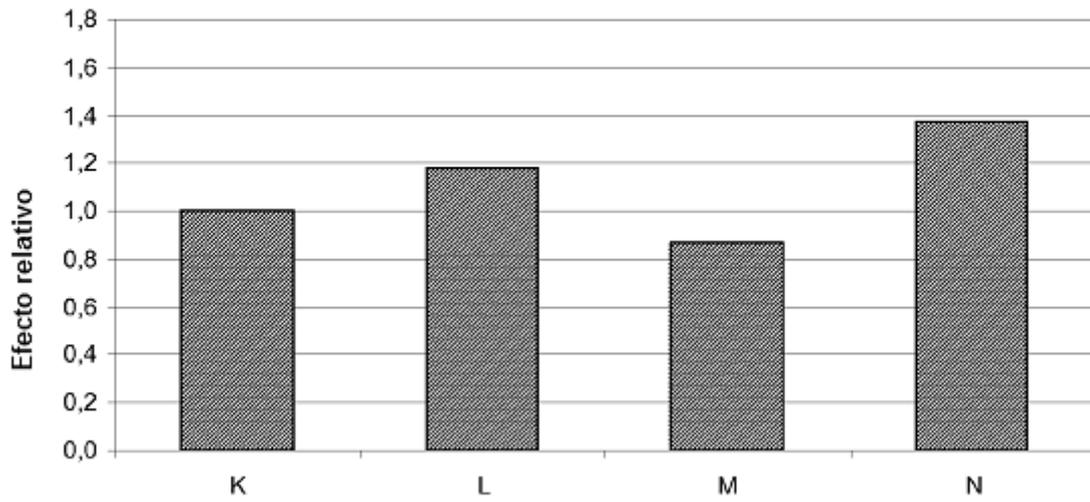


Fig. 11

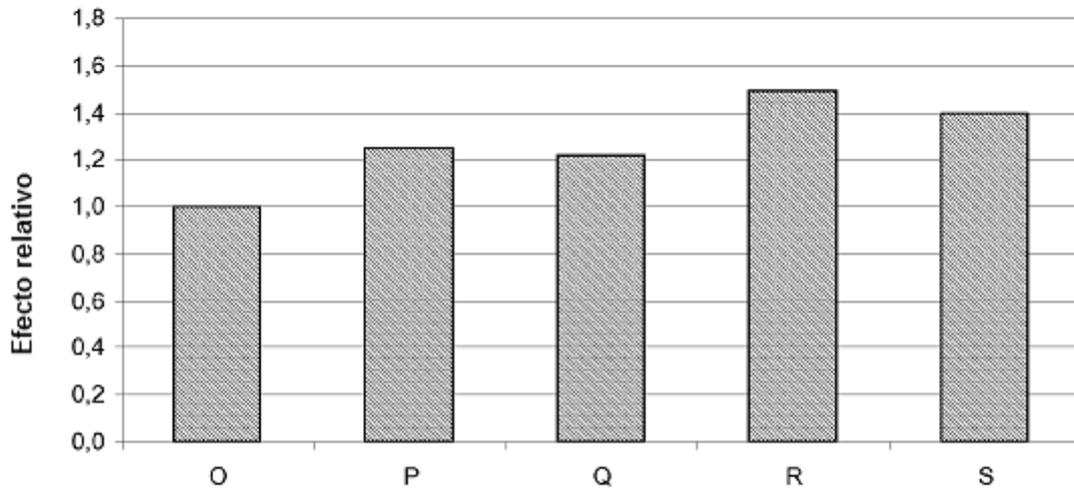


Fig. 12

