

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 099**

51 Int. Cl.:

A61K 8/00 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2013 PCT/EP2013/065384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14016233**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2013 E 13739437 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2884956**

54 Título: **Composiciones que comprenden ácido hialurónico y sulfato de dermatano para el tratamiento del sobrepeso y de la obesidad**

30 Prioridad:
25.07.2012 ES 201231198

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2018

73 Titular/es:
**BIOIBÉRICA, S.A. (100.0%)
Plaza Francesc Macià, 7
08029 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:
**ESCAICH FERRER, JOSEP;
BONET PIÑA, M^a LUISA;
MARTÍNEZ PUIG, DANIEL;
GRANADOS BORBOLLA, NURIA;
REYNES MIRALLES, BÁRBARA;
CHETRIT RUSSI, CARLES y
PALOU OLIVER, ANDREU**

74 Agente/Representante:
SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 673 099 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 comprenden ácido hialurónico y sulfato de dermatano para el tratamiento del sobrepeso y de la obesidad

5

Sector técnico de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento, prevención o reducción del sobrepeso o de la obesidad, así como de enfermedades, afecciones o alteraciones metabólicas relacionadas con el sobrepeso o la obesidad, tales como la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hígado graso o dislipidemia. Las composiciones pueden estar en forma de composiciones farmacéuticas, alimentos, alimentos funcionales, alimentos médicos o complementos alimenticios.

10

Estado de la técnica anterior

15

La obesidad, definida como un exceso de peso corporal en forma de grasa, es un importante factor de riesgo de desórdenes clínicos graves, entre ellos la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular, y es un problema de incidencia creciente y difícil tratamiento que acarrea un importante gasto socio-sanitario (véase <http://www.iaso.org/iotf/obesity/>). Es conocido que muchas personas con sobrepeso u obesidad desarrollan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, e hipertensión, características que, en conjunto, conforman el llamado síndrome metabólico (P.L. Huang, *Dis. Model. Mech.* 2(5-6), 231-237 (2009)). También es conocido que la mayoría de personas obesas presentan un estado de hiperleptinemia y resistencia a la leptina. Los resultados de diversas investigaciones sugieren que la leptina es un factor importante, asociando la obesidad, el síndrome metabólico la hipertensión y las alteraciones cardiovasculares (S.B. Patel *et al.*, *Curr. Hypertens. Rep.* 10, 131-137 (2008)). La presencia de resistencia a la acción de la leptina en la obesidad se reconoció hace ya tiempo (P.S. Widdowson *et al.*, *Diabetes* 46, 1782-1785 (1997)). Los resultados de numerosos estudios han demostrado que el mantenimiento de niveles elevados de leptina en el sistema nervioso central reduce la expresión de los receptores de leptina y deteriora la vía de señalización de la leptina, lo que se asocia con resistencia a la leptina que, a su vez, confiere mayor susceptibilidad a la obesidad y a sus complicaciones (Y. Zhang & P.J. Scarpace, *Physiol. Behav.* 88, 249-256 (2006)). En esencia, los niveles circulantes de leptina, si se mantienen elevados, contribuyen a la resistencia a la leptina y promueven sobrepeso y obesidad, reforzando el círculo vicioso de las múltiples alteraciones metabólicas que acompañan a la obesidad y que definen el síndrome metabólico, especialmente en las condiciones de nuestras sociedades desarrolladas en las que hay una sobreabundancia de comida rica en energía (P.J. Scarpace & Y. Zhang, *Front Biosci.* 12, 3531-3544 (2007)).

20

25

30

35

Una de las complicaciones metabólicas más frecuentes en la obesidad es la resistencia a la insulina (A. Astrup & N. Finer, *Obes. Rev.* 1, 57-59 (2000)). La conexión entre ambas condiciones ha sido ampliamente estudiada y parece deberse a que, en los individuos obesos, el tejido adiposo libera cantidades incrementadas o anormales de ácidos grasos no esterificados, hormonas (adipoquinas) y citoquinas pro-inflamatorias, entre otros factores, que favorecen la pérdida de sensibilidad a la insulina en diferentes tejidos (S.E. Kahn *et al.*, *Nature* 444, 840-846 (2006)). La resistina, en particular, es una proteína secretada por adipocitos y/o macrófagos infiltrados en el tejido adiposo obeso que actúa como un factor pro-inflamatorio y de resistencia a la insulina, y cuyos niveles circulantes están elevados en individuos obesos (D.R. Schwartz & M.A. Lazar, *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 259-265 (2011)). La

40

reducción de la resistencia se correlaciona con incrementos de la sensibilidad a la insulina (C.M. Stepan *et al.*, *Nature* 409, 307-312 (2001); F. Felipe *et al.*, *Diabetes* 53, 882-889 (2004)).

5 La resistencia a la insulina es clínicamente relevante porque está estrechamente asociada a la diabetes de tipo 2 y otros problemas como hipertensión, dislipidemia, y defectos en la coagulación sanguínea y la fibrinólisis, todos los cuales se relacionan a su vez con la enfermedad cardiovascular (G. Boden, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18, 139-143 (2011)). En general, se acepta que el defecto primario en el desarrollo de diabetes de tipo 2 es el deterioro de la sensibilidad a la insulina, al que sigue una hiperinsulinemia compensatoria, e hiperglucemia cuando los mecanismos de compensación fallan. Por tanto, la mejora de la homeostasis de la glucosa-insulina es un objetivo
10 de salud de interés específico en sí mismo.

Las estrategias para la reducción de peso basadas únicamente en la restricción calórica y el aumento de la actividad física son difíciles de seguir, y se han mostrado ineficaces frente a la actual pandemia de obesidad. Paralelamente, hay evidencia de que nutrientes específicos y otros ingredientes alimentarios influyen en procesos bioquímicos que
15 impactan sobre el balance energético y la acumulación de grasa de manera tal que pueden favorecer un fenotipo más magro (K. H. Kim & Y. Park, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 237-257 (2011); C. Pico *et al.*, *Rev. Esp. Obes.* 4, 156-174 (2006); E. M. Kovacs & D. J. Mela, *Obes. Rev.* 7, 59-78 (2006)). Esta evidencia es la base para el desarrollo de complementos alimenticios o alimentos funcionales para el control de la obesidad.

20 Se han definido las siguientes estrategias principales en alimentación funcional para el control de la obesidad: (i) reducción de la ingesta, vía modulación de las sensaciones de hambre y/o saciedad, o limitando la biodisponibilidad de nutrientes; (ii) reducción de la densidad calórica en alimentos *light*; (iii) estimulación del gasto energético mediante activación de la termogénesis adaptativa; y (iv) redireccionamiento de nutrientes hacia tejidos y vías metabólicas que los consumen, desfavoreciendo así la deposición de grasa (C. Pico *et al.*, *Rev. Esp. Obes.* 4, 156-
25 174 (2006)). Se considera de especial interés el uso de nutrientes o combinaciones de nutrientes capaces de afectar simultáneamente a varios de estos procesos (C Pico *et al.*, *Rev. Esp. Obes.* 4, 156-174 (2006)).

La inhibición de la adipogénesis es otra posible estrategia anti-obesidad (K. H. Kim & Y. Park, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 237-257 (2011)). La adipogénesis es el proceso de diferenciación de los adipocitos a partir de células precursoras, y ha sido muy estudiada principalmente en modelos celulares (B. Feve, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19, 483-499B (2005)). En humanos, un porcentaje considerable de los adipocitos, en torno al 10%, es renovado anualmente durante toda la vida adulta mediante la coordinación de adipogénesis *de novo* y muerte de adipocitos preexistentes (K. L. Spalding *et al.*, *Nature* 453, 783-787 (2008)). Muchos individuos obesos presentan un número excesivo de adipocitos (hiperplasia) en sus depósitos adiposos, y estos individuos son
35 especialmente refractarios a la pérdida de peso a largo plazo y propensos al conocido efecto yo-yo. El control farmacológico o nutricional de la adipogénesis emerge en este contexto como una nueva diana terapéutica en el control de la obesidad, como coadyuvante en estrategias convencionales de control del balance energético: la inhibición de la adipogénesis puede ayudar a normalizar (reducir) el número de adipocitos, y con ello al mantenimiento del peso tras la pérdida de peso (P. Arner & K. L. Spalding, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396,
40 101-104 (2010)).

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son biomoléculas poliméricas de elevado peso molecular formados por repeticiones de una unidad disacáridica. Se encuentran fundamentalmente en los organismos vivos, donde desarrollan diferentes funciones fisiológicas.

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfatado, con una estructura polimérica caracterizada por un disacárido que se repite, constituido por los monosacáridos *N*-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico. Es uno de los principales componentes del cartílago, de la membrana sinovial y del líquido sinovial. En particular, es importante su uso en el tratamiento de disfunciones articulares como la artrosis, generalmente por vía intraarticular. También se ha descrito su uso en oftalmología, en la cicatrización de heridas, así como en cosmética.

El sulfato de dermatano es un glicosaminoglicano sulfatado con una estructura polimérica constituida mayoritariamente por disacáridos de *N*-acetil-D-galactosamina sulfatada en posición 4 y ácido L-idurónico, a menudo sulfatado en posición 2. Se ha descrito que participa en la reparación de heridas y en la regulación de la coagulación de la sangre. Esta sustancia se usa en gran medida en cosmética.

El hidrolizado de colágeno está constituido por 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.

La solicitud de patente US 2005084518 describe un alimento para la salud (health food) que contiene ácido hialurónico y sulfato de dermatano. Dicho alimento es útil para el embellecimiento de la piel.

En la patente US 7,763,594 se describe el uso de una composición de ácido hialurónico y sulfato de dermatano para tratar la artrosis.

A la vista de lo anterior, el proporcionar composiciones para el tratamiento, prevención o control del sobrepeso y/o de la obesidad, así como de algunas de sus complicaciones metabólicas, es un tema de enorme interés tanto en el campo terapéutico como en el nutricional.

Explicación de la invención

Los presentes inventores han encontrado que, sorprendentemente, las composiciones de la presente invención, definidas más abajo, ejercen un efecto sinérgico anti-adipogénico, incluso en presencia de un cóctel hormonal pro-adipogénico; inhiben la expresión de resistina (adipoquina relacionada con la resistencia a la insulina); reducen la ganancia de peso y la ingesta energética en ratones alimentados *ad libitum*; reducen la insulinemia y la trigliceridemia en ratones alimentados *ad libitum*; favorecen la pérdida de peso y de grasa en ratones obesos; reducen la leptinemia y la insulinemia en ratones obesos; y regulan la leptinemia, colesterolemia y trigliceridemia en humanos obesos. Por ello, las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas en el tratamiento o prevención de la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hígado graso o dislipidemia, y pueden ser en la forma de una composición farmacéutica o de un alimento médico. Las composiciones también pueden ser utilizadas en forma de alimento, alimento funcional o complemento alimenticio para reducir el sobrepeso, reducir la ingesta de alimento, inducir la sensación de saciedad, reducir el apetito, reducir el peso corporal, prevenir el aumento de peso, reducir la grasa corporal o reducir la formación de grasa en un mamífero.

Todas las enfermedades, afecciones o alteraciones mencionadas en la presente invención están interrelacionadas, ya que en conjunto definen el llamado síndrome metabólico, compartiendo mediadores y mecanismos

patofisiológicos comunes. Tienen en común que para tratarlas o paliarlas es necesario actuar sobre la adipogénesis y/o sobre los niveles de leptina, hormona secretada por los adipocitos.

5 Por consiguiente, según un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hígado graso o dislipidemia en un mamífero.

10 En una realización preferida de la composición para uso, la resistencia a la insulina está asociada al sobrepeso o a la obesidad, la diabetes tipo 2 está asociada al sobrepeso o a la obesidad, el hígado graso está asociado al sobrepeso o a la obesidad o la dislipidemia está asociada al sobrepeso o a la obesidad.

Preferentemente, la dislipidemia es hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia.

15 En otra realización preferida de la composición para uso, el tratamiento o prevención de la dislipidemia resulta en la reducción del colesterol en sangre, el mantenimiento de los niveles normales de colesterol en sangre, la reducción de los triglicéridos en sangre o el mantenimiento de los niveles normales de triglicéridos en sangre.

20 De acuerdo con otra realización preferida de la composición para uso, el tratamiento o prevención de la resistencia a la insulina o la diabetes tipo 2 resulta en el aumento de la sensibilidad a la insulina.

En otra realización preferida de la composición para uso, la composición es en forma de una composición farmacéutica o de un alimento médico.

25 De acuerdo con otra realización preferida de la composición para uso, el mamífero es obeso o tiene sobrepeso.

En más realizaciones de la composición para uso, el mamífero presenta un síndrome metabólico o presenta hiperleptinemia, respectivamente.

30 En otra realización también preferida, el mamífero es un humano.

35 En otra realización preferida de la composición para uso, el ácido hialurónico y el sulfato de dermatano están presentes en una relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano comprendida entre 1:0,06 y 1:0,80, preferentemente entre 1:0,10 y 1:0,50. La relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano especialmente preferida es 1:0,25.

40 En otra realización igualmente preferida de la composición para uso, la composición además comprende hidrolizado de colágeno. Preferentemente, el ácido hialurónico, el sulfato de dermatano y el hidrolizado de colágeno están presentes en una relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano a hidrolizado de colágeno comprendida entre 1:0,06:0,03 y 1:0,80:0,40, preferentemente entre 1:0,10:0,05 y 1:0,50:0,20. La relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano a hidrolizado de colágeno especialmente preferida es 1:0,20:0,10. Otra relación en peso especialmente preferida es 1:0,25:0,10.

La composición para uso está preferentemente adaptada para administración oral o parenteral. La administración oral es la más preferida.

Otro aspecto de la invención es un uso no terapéutico de una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano como un alimento, un alimento funcional o un complemento alimenticio para reducir el sobrepeso, reducir la ingesta de alimento, inducir la sensación de saciedad, reducir el apetito, reducir el peso corporal, prevenir el aumento de peso, reducir la grasa corporal o reducir la formación de grasa en un mamífero. Preferiblemente el mamífero presenta sobrepeso. El uso es preferiblemente para reducir la ingesta de alimento. Otro aspecto de la invención es el uso de una composición previamente definida como un alimento, un alimento funcional o un complemento alimenticio para reducir la acumulación de grasa visceral y/o subcutánea.

En otra realización también preferida, el mamífero es un humano.

Otro aspecto de la invención es otro uso no terapéutico de una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano como un producto adelgazante. Dicha composición es preferiblemente en forma de un alimento, un alimento funcional o un complemento alimenticio. El alimento puede ser un alimento dietético.

En otra realización preferida de dichos usos no terapéuticos, el ácido hialurónico y el sulfato de dermatano están presentes en una relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano comprendida entre 1:0,06 y 1:0,80, preferentemente entre 1:0,10 y 1:0,50. La relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano especialmente preferida es 1:0,25.

En otra realización preferida de dichos usos no terapéuticos, la composición además comprende hidrolizado de colágeno. Preferentemente, el ácido hialurónico, el sulfato de dermatano y el hidrolizado de colágeno están presentes en una relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano a hidrolizado de colágeno comprendida entre 1:0,06:0,03 y 1:0,80:0,40, preferentemente entre 1:0,10:0,05 y 1:0,50:0,20. La relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano a hidrolizado de colágeno especialmente preferida es 1:0,20:0,10. Otra relación en peso especialmente preferida es 1:0,25:0,10.

En la presente invención, el término “comprende” debe interpretarse de forma que también incluye el caso de “consiste únicamente en” y el de “consiste esencialmente en”.

En la presente invención, cuando se habla de ácido hialurónico y de sulfato de dermatano se incluye cualquier sal de los mismos, por ejemplo la sal de sodio, de potasio o de calcio.

Preferentemente, el ácido hialurónico y el sulfato de dermatano de las composiciones de la presente invención están en forma de sal de sodio.

En la presente invención, los pesos moleculares medios de ácido hialurónico, sulfato de dermatano y sulfato de condroitina se han determinado por cromatografía de permeación de gel (GPC).

En la presente invención, la abreviatura HA significa Hyaluronic Acid, la abreviatura DS significa Dermatan Sulphate, la abreviatura CH significa Collagen Hydrolysate y la abreviatura CS significa Chondroitin Sulphate.

En la presente invención los siguientes términos tienen el significado indicado:

“Alimento funcional” se refiere a un alimento que, aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, es capaz de proporcionar un beneficio para la salud por contener uno o más componentes biológicamente activos o una combinación de componentes biológicamente activa (por ejemplo, una composición de la invención). El alimento funcional forma parte de la dieta de un individuo.

5
“Complemento alimenticio” se refiere a un suplemento de la dieta que contiene en forma concentrada uno o más nutrientes u otros componentes biológicamente activos (por ejemplo, una composición de la invención) con efecto nutritivo o fisiológico beneficioso para la salud. Se administra en forma de comprimidos, cápsulas o en cualquier otra forma dosificada.

10
“Alimento médico” se refiere a un alimento administrado a un paciente bajo las instrucciones y la supervisión de un médico. Dicho alimento es específico para los requerimientos nutricionales de un paciente que tiene una determinada enfermedad, malestar o trastorno. Se utiliza en Estados Unidos y suele presentarse en forma de alimento, aunque también puede encontrarse en forma dosificada. En Europa el equivalente a “alimento médico” es
15 “alimento dietético para usos médicos especiales”, que es un alimento destinado a una alimentación especial, que ha sido elaborado o formulado especialmente para satisfacer total o parcialmente las necesidades alimenticias de los pacientes cuya capacidad para ingerir, digerir, absorber, metabolizar o excretar alimentos normales o determinados nutrientes de los mismos o metabolitos sea limitada o deficiente, o esté alterada, o bien que necesiten otros nutrientes determinados clínicamente, cuyo tratamiento dietético no pueda efectuarse únicamente modificando
20 la dieta normal, con otros alimentos destinados a una alimentación especial, o mediante ambas cosas. Puede estar en forma dosificada o no.

“Alimento dietético” se refiere a un alimento que por su composición está indicado para un objetivo nutricional específico.

25
“Síndrome metabólico” se refiere a la concurrencia de sobrepeso u obesidad y varios factores de riesgo cardiovascular adicionales, tales como la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, e hipertensión.

30
“Inducir la sensación de saciedad” se refiere a inducir a que el cuerpo (el individuo) se sienta satisfecho y no tenga hambre, entendida como necesidad de ingesta inmediata de alimentos.

“Mantener los niveles normales de colesterol en sangre” se refiere a mantener los niveles circulantes de colesterol total por debajo de 200 mg/dL, mantener los niveles circulantes de colesterol LDL por debajo de 100 mg/dL y
35 mantener los niveles circulantes de colesterol HDL por encima de 40 mg/dL.

“Colesterol LDL” se refiere al colesterol ligado a las lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoproteins), conocido también como “colesterol malo”.

40
“Colesterol HDL” se refiere al colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (High Density Lipoproteins), conocido también como “colesterol bueno”.

“Hipercolesterolemia” se refiere a cuando los niveles de colesterol total y/o colesterol LDL en sangre son elevados (niveles de colesterol total en sangre por encima de 200 mg/dL; niveles de colesterol LDL en sangre por encima de 100 mg/dL).

5 “Mantener los niveles normales de triglicéridos en sangre” se refiere a mantener los niveles de triglicéridos por debajo de 150 mg/dL.

“Hiperleptinemia” se refiere a cuando los niveles de leptina en sangre o en líquido sinovial son elevados.

10 “Vía parenteral” se refiere a cuando los medicamentos o los nutrientes son introducidos en el cuerpo sin ser absorbidos por el tracto gastro-intestinal. Las vías parentelares de uso más frecuente son la intravenosa, subcutánea e intramuscular.

15 “Producto anticelulítico” se refiere a un producto reductor de la grasa subcutánea que, en forma de nódulos, se acumula en determinadas zonas del cuerpo.

El ácido hialurónico y el sulfato de dermatano de las composiciones de la presente invención se pueden obtener por procedimientos extractivos a partir de tejidos de aves o de mamíferos o bien por biotecnología.

20 Los pesos moleculares medios del ácido hialurónico y del sulfato de dermatano de las composiciones de 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 800.000 y 1.000.000 daltons y el peso molecular medio del sulfato de dermatano está comprendido entre 10.000 y 50.000 daltons.

25 El ácido hialurónico de las composiciones de la presente invención se puede obtener, mediante extracción a partir de tejidos de aves o de mamíferos, por ejemplo a partir de humor vítreo, piel de mamífero, cordón umbilical o crestas de aves o bien por fermentación de microorganismos (por ejemplo *Streptococcus*), siguiendo procedimientos descritos en la literatura (D.A. Swann, *Biochim. Biophys. Acta* 156, 17-30 (1968); patente US 4,780,414).

30 Preferentemente, el ácido hialurónico de las composiciones de la presente invención es un producto comercial disponible en www.bioiberica.com. Se obtiene a partir de crestas de gallo, las cuales una vez picadas se digieren con un enzima proteolítico. Posteriormente se desactiva el enzima mediante calentamiento, se filtra, se elimina el sulfato de dermatano y se precipita el ácido hialurónico, el cual se anhidrifica, se seca y se moltura. Dicho ácido hialurónico en forma de sal de sodio presenta una riqueza mínima del 90%, determinada por contenido en ácido glucurónico, y un peso molecular medio comprendido entre 800.000 y 1.000.000 daltons.

35 El sulfato de dermatano de las composiciones de la presente invención se puede obtener a partir de tejidos de aves o de mamíferos, por ejemplo a partir de mucosa porcina o bovina, crestas de aves o piel de mamífero, siguiendo procedimientos descritos en la literatura (N. Volpi, *Anal. Biochem.* 218, 382-391 (1994); patente EP 238994).

40 Preferentemente, el sulfato de dermatano de las composiciones de la presente invención se obtiene a partir de crestas de gallo, en el procedimiento de obtención del ácido hialurónico. Una vez separado el sulfato de dermatano en forma de complejo, se rompe el complejo mediante fuerza iónica, se precipita, se anhidrifica, se seca y se

moltura. También se puede emplear el sulfato de dermatano de mucosa porcina comercializado por la empresa Sigma-Aldrich Química (Referencia: C3788). El sulfato de dermatano en forma de sal de sodio que proviene de crestas de gallo presenta una riqueza mínima del 90%, determinada por valoración fotométrica, y un peso molecular medio comprendido entre 10.000 y 50.000 daltons.

5

El hidrolizado de colágeno de las composiciones de la presente invención se puede obtener 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)).

10

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar mezclando sus componentes en las proporciones deseadas. Así, se pueden preparar 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).

15

Las composiciones de la presente invención también se pueden obtener directamente a partir de tejidos de aves o de mamíferos mediante un procedimiento extractivo. Así, por ejemplo, se puede partir 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 solventes. A continuación se filtra, se lava y se seca. Finalmente se puede proceder al molturado. El producto obtenido comprende ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno (en forma de aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular). Modificando ligeramente éste procedimiento se pueden obtener composiciones que comprendan ácido hialurónico y sulfato de dermatano, pero no hidrolizado de colágeno. La presencia de los tres componentes (HA, DS y CH) o de sólo dos (HA y DS) y la proporción entre ellos dependerá del procedimiento de obtención (tipo de enzima, temperatura, tiempo de reacción y proceso de purificación).

25

La composición de la invención que comprende ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno más preferida es la que comprende 65% de ácido hialurónico (HA), 13,40% de sulfato de dermatano (DS) y 6,56% de hidrolizado de colágeno (CH) (relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10).

30

En la presente invención, el glicosaminoglicano sulfato de condroitina se ha empleado únicamente con fines comparativos. El sulfato de condroitina presenta una estructura polimérica caracterizada por un disacárido que se repite, constituido por *N*-acetil-D-galactosamina y ácido D-glucurónico. La mayoría de los residuos de *N*-acetil-D-galactosamina están sulfatados. Se puede obtener mediante digestión enzimática proteolítica de tejidos cartilagosos de animales, por ejemplo tráqueas de ganado bovino o porcino o esqueletos cartilagosos de peces.

35

El sulfato de condroitina que procede del tejido cartilaginoso se encuentra principalmente en dos formas isoméricas, el 4-sulfato de condroitina y el 6-sulfato de condroitina. El peso molecular medio del sulfato de condroitina puede variar dependiendo de su origen y/o del procedimiento de obtención empleado. Generalmente, tiene un peso molecular medio comprendido entre 10.000 y 70.000 daltons.

40

El sulfato de condroitina en forma de sal de sodio utilizado con fines comparativos en el Ejemplo 1 de la presente invención es un producto comercial disponible en www.bioiberica.com con una riqueza mínima del 98%, determinada por valoración fotométrica, y un peso molecular medio comprendido entre 14.000 y 18.000 daltons. Se obtiene a partir de cartílago de origen bovino.

Para utilizar las composiciones de la presente invención en el tratamiento o prevención del sobrepeso, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hígado graso o dislipidemia en un mamífero, se formulan en composiciones farmacéuticas adecuadas, recurriendo a técnicas y excipientes o vehículos convencionales, como los descritos en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2000, edited by Lippincott Williams and Wilkins, 20th edition, Philadelphia*. Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la presente invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para la administración al paciente. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente en dosis requeridas. La administración de las composiciones farmacéuticas puede efectuarse por diferentes vías, por ejemplo, oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, sublingual, intradérmica, nasal o tópica. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la presente invención, dependiendo dicha cantidad de muchos factores, como por ejemplo, el estado físico del paciente, edad, sexo, vía de administración, frecuencia de administración o gravedad de la enfermedad. Además, se entenderá que dicha dosificación de la composición de la invención 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 preparaciones farmacéuticas en forma sólida que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención se incluyen polvos, minigránulos (pellets), comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, sellos, tabletas, liofilizados y supositorios. Entre las preparaciones en forma líquida se incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires, viales bebibles y tisanas. Se contemplan también las preparaciones de formas sólidas que se desean convertir, inmediatamente antes de ser utilizadas, en preparaciones en forma líquida. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

Las composiciones para uso en donde el tratamiento o la prevención de la dislipidemia resultan en la reducción del colesterol en sangre, el mantenimiento de los niveles normales de colesterol en sangre, la reducción de los triglicéridos en sangre o el mantenimiento de los niveles normales de triglicéridos en sangre, así como las composiciones para uso en donde el tratamiento o prevención de la resistencia a la insulina o de la diabetes tipo 2 resultan en el aumento de la sensibilidad a la insulina, se preparan en formas dosificadas que contienen una composición de la invención; los alimentos dietéticos para usos médicos especiales se preparan en formas dosificadas que contienen una composición de la invención y aditivos empleados en nutrición; y los alimentos médicos o alimentos dietéticos para usos médicos especiales se preparan en formas no dosificadas que contienen una composición de la invención y nutrientes o alimentos. El alimento dietético para usos médicos especiales puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones o sobres o también como alimento para la alimentación especial de pacientes. El alimento médico suele presentarse en forma de alimento para la alimentación de pacientes, aunque también puede encontrarse en forma dosificada.

Para utilizar una composición de la presente invención para reducir la ingesta de alimento, inducir la sensación de saciedad, reducir el apetito, reducir el peso corporal, prevenir el aumento de peso, reducir la grasa corporal, reducir la formación de grasa, en un mamífero, o como un producto adelgazante o complementos alimenticios, se preparan en formas dosificadas conteniendo una composición de la invención y aditivos empleados en nutrición, o alimentos o alimentos funcionales son preparados adicionando las composiciones de la invención a los alimentos que forman parte de la dieta. El complemento alimenticio puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones o sobres. El alimento funcional puede estar en forma de yogures, leche, leche fermentada, jugos de frutas, jugos de vegetales, sopas, alimentos deshidratados, galletas o alimentos infantiles.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra las imágenes, al microscopio de contraste de fase, de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) cultivados durante 8 días en medio de crecimiento conteniendo: vehículo (agua, Control); ácido hialurónico (HA) a concentración final (c.f.) 80 µg/mL; sulfato de dermatano (DS) a c.f. 20 µg/mL; o composición de la invención HA80+DS20 a c.f. 100 µg/mL. Se aprecian gotas de grasa intracelulares refringentes al microscopio de contraste de fase en todos los cultivos, excepto el tratado con HA80+DS20. (Magnificación x200).

La Figura 2 muestra los niveles de expresión de los ARN mensajeros (mRNA) para los factores de transcripción adipogénicos PPARgamma (A) y C/EBPalfa (B) y para la enzima lipogénica ácido graso sintasa (FAS) (C) en MEFs cultivados durante 8 días en medio de crecimiento suplementado con: vehículo (agua); HA a c.f. 80 µg/mL; DS a c.f. 20 µg/mL; CS a c.f. 20 µg/mL o composición de la invención HA80+DS20 a c.f. 100 µg/mL. Los niveles de mRNA para beta-actina se emplearon como control interno. Los resultados se expresan en tanto por uno del nivel de expresión en las células control tratadas con vehículo, y son la media ± SEM de al menos seis muestras para cada condición ensayada, distribuidas en dos experimentos independientes. ***; P= 0,001 vs vehículo, t-test.

La Figura 3 muestra los niveles de expresión de los ARN mensajeros (mRNA) para los factores de transcripción adipogénicos PPARgamma (A) y C/EBPalfa (B) y para la proteína lipogénica FAS (C) en MEFs tras 8 días de diferenciación en medio conteniendo un cóctel hormonal adipogénico suplementado con: vehículo (agua); HA a c.f. 80 µg/mL; DS a c.f. 20 µg/mL; o composición de la invención HA80+DS20 a c.f. 100 µg/mL. Los niveles de mRNA para beta-actina se emplearon como control interno. Los resultados se expresan en tanto por uno del nivel de expresión en las células control tratadas con vehículo, y son la media ± SEM de triplicados para cada tratamiento. *; P<0,05 vs vehículo, t-test.

La Figura 4 muestra los niveles de expresión de resistina en MEFs tras 8 días de diferenciación en medio adipogénico en presencia de diferentes concentraciones finales de HA+DS en una relación en peso HA a DS de 1:0,25. Los niveles de mRNA para la beta-actina se emplearon como control interno. Los resultados se expresan en tanto por uno del nivel de expresión en las células control tratadas con vehículo, y son la media ± SEM de cuatro experimentos realizados en triplicados. Las letras diferentes (a, b) implican cambios significativos según ANOVA de un factor (P<0,05).

La Figura 5 muestra la ingesta energética acumulada de ratones tras 143 días de tratamiento, por vía oral, con vehículo (agua, grupo Control), o con una composición de la invención, a dosis 0,45 mg/ratón/día (grupo HA+DS+CH). Los datos representados corresponden a la media ± SEM de 8 animales por grupo, distribuidos en 2 jaulas de 4 animales cada una. **; P<0,01 HA+DS+CH vs Control, t-test.

La Figura 6 muestra los niveles circulantes de glucosa (A), niveles circulantes de insulina (B) e índice HOMA-IR (C) en ratones tratados por vía oral con vehículo (agua, grupo Control) o con una composición de la invención, a dosis 0,45 mg/ratón/día (grupo HA+DS+CH). Los análisis se efectuaron tras 88 días de tratamiento, después de sometidos los animales a un ayuno de 6 h. Los datos corresponden a la media ± SEM de 7-8 animales por grupo. *; P<0,05 HA+DS+CH vs Control, t-test.

La Figura 7 muestra los niveles circulantes de triacilgliceroles en el estado alimentado en ratones tras 143 días de tratamiento con vehículo (grupo Control) o con una composición de la invención, a dosis 0,45 mg/ratón/día (grupo HA+DS+CH). Los datos corresponden a la media \pm SEM de 7-8 animales por grupo. *; $P < 0,05$ HA+DS+CH vs Control, t-test.

5 La Figura 8 muestra la evolución de la pérdida de masa grasa corporal (A) y la ganancia relativa de masa magra corporal (B) en ratones con obesidad dietética en fase de adelgazamiento, tratados diariamente por vía oral con vehículo (grupo Control) o con una composición de la invención, a dosis 3 mg/ratón/día (grupo HA+DS+CH). Los resultados son la media \pm SEM de 7-8 animales por grupo. *; $P < 0,05$ HA+DS+CH vs Control a tiempo respectivo, t-test.

10 La Figura 9 muestra el peso (A) del depósito de tejido adiposo blanco inguinal (TABi), del depósito de tejido adiposo blanco retroperitoneal (TABr) y del depósito de tejido adiposo blanco epididimal (TABe), el índice de adiposidad corporal (B) y la concentración de leptina circulante (C) en ratones obesos expuestos durante 32 días a condiciones de adelgazamiento y tratamiento con vehículo (grupo Control) o con una composición de la invención, a dosis 3 mg/ratón/día (grupo HA+DS+CH). El índice de adiposidad se definió, para cada animal, como la suma del peso de sus depósitos de TAB expresada como porcentaje del peso corporal. Los resultados son la media \pm SEM de 7 animales por grupo. *; $P < 0,05$ HA+DS+CH vs Control, t-test.

20 La Figura 10 muestra los niveles circulantes en el estado alimentado de glucosa (A) e insulina (B) en ratones obesos expuestos durante 32 días a condiciones de adelgazamiento y tratamiento con vehículo (grupo Control) o con una composición de la invención, a dosis 3 mg/ratón/día (grupo HA+DS+CH). Los resultados son la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo. *; $P < 0,05$ HA+DS+CH vs Control, t-test.

25 La Figura 11 muestra la concentración de leptina circulante en suero y en líquido sinovial en personas obesas tratadas con excipientes (Control) o con una composición de la invención (HA+DS+CH), a dosis 80 mg/persona/día.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas:

30 Los siguientes ejemplos son a título ilustrativo, y no representan una limitación del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Estudio de eficacia y de sinergia de una composición de la presente invención en la inhibición de la adipogénesis espontánea de fibroblastos embrionarios de ratón. Comparación con ácido hialurónico, sulfato de dermatano y sulfato de condroitina

35 La adipogénesis es el proceso de diferenciación de células almacenadoras de grasa (adipocitos) a partir de células precursoras. La obesidad se correlaciona a menudo con la presencia de un excesivo número de adipocitos en los depósitos grasos. El objetivo del estudio fue determinar si existía un efecto sinérgico entre los componentes de una composición de la presente invención para reprimir la adipogénesis. Para ello, se determinó el potencial de una combinación de ácido hialurónico y sulfato de dermatano, en una relación en peso HA a DS de 1:0,25 (HA80+DS20), y el de sus componentes individuales de inhibir la acumulación intracelular de lípidos y la expresión de genes marcadores de adipocitos en cultivos de fibroblastos primarios embrionarios de ratón (MEFs) mantenidos en medio de crecimiento. También se llevó a cabo una comparación con el glicosaminoglicano sulfato de condroitina. Los MEFs son células multipotentes, cultivables, capaces de diferenciarse en diferentes tipos celulares mesenquimales

40

(adipocitos, condrocitos, osteoblastos) dependiendo de la estimulación hormonal que reciban. Algunos estudios han reportado que el suero del medio de cultivo puede inducir la adipogénesis espontánea en células mesenquimales multipotentes como los MEFs (L. Wu *et al.*, *J. Cell Mol. Med.* 14, 922-932 (2010)).

5 Materiales y métodos

MEFs obtenidos a partir de embriones de 13 días de edad gestacional fueron cultivados en monocapa hasta llegar a la confluencia, en medio de crecimiento consistente en medio basal AmnioMAX™-C100 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con suplemento AmnioMAX™-C100 (7,5%), suero bovino fetal (7,5%) y antibióticos, en placas de cultivo de 12 pocillos de 1 mL de capacidad/pocillo, siguiendo un protocolo previamente descrito (J.B. Hansen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4112-4117 (2004)). Dos días después de alcanzada la confluencia, que se considera el día 0 de cultivo, las células fueron expuestas a: vehículo (agua); ácido hialurónico (HA) a concentración final (c.f.) 80 µg/mL; sulfato de dermatano (DS) a c.f. 20 µg/mL; sulfato de condroitina (CS) a c.f. 20 µg/mL; o composición de la presente invención HA80+DS20 a c.f. 100 µg/mL, que contenía por mL 80 µg de HA y 20 µg de DS. El medio de cultivo en contacto con las células se cambió cada dos días (días 2, 4 y 6 de cultivo) por medio fresco, siempre con los suplementos arriba indicados. Las células fueron recogidas a día 8 de cultivo, tras ser examinadas y fotografiadas al microscopio de contraste de fase para visualizar su forma y la eventual acumulación de lípidos. Los niveles de mRNAs de los genes relacionados con la diferenciación adipocitaria PPAR γ , C/EBP α y ácido graso sintasa (FAS) se determinaron por PCR a tiempo real, a partir de RNA total extraído de las células con reactivo Trizol y retrotranscrito con transcriptasa inversa, y utilizando el mRNA de beta-actina como control interno. Las parejas de primers específicas de cada gen se determinaron usando el software Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA), y su especificidad se contrastó mediante las bases de datos ENTREZ y BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA). Los primers fueron producidos por Sigma (Madrid, Spain). La significancia estadística de diferencias respecto del tratamiento con vehículo fue analizada mediante *t* de Student. El umbral de significancia se estableció en $P < 0,05$.

Resultados

La observación de las células a día 8 de cultivo reveló la presencia de numerosas islas de células diferenciadas espontáneamente en adipocitos llenos de gotas de grasa, refringentes al microscopio de contraste de fase, en los cultivos tratados con vehículo, HA80 y DS20, pero no en los tratados con la composición de la invención HA80+DS20 (Figura 1).

De acuerdo con lo anterior, al nivel molecular, la expresión de los genes marcadores adipocitarios PPAR γ , C/EBP α y FAS resultó drástica y significativamente reducida en las células tratadas con la composición de la invención HA80+DS20, pero no en las tratadas con los componentes de la composición por separado o con CS (Figura 2).

Estos resultados indican que la combinación de ácido hialurónico y sulfato de condroitina inhibe la adipogénesis espontánea en MEFs en cultivo en un efecto sinérgico, que excede a la suma de los efectos de los componentes individuales de la combinación por separado. Por lo tanto, la composición de la invención puede ser de gran utilidad en reducir la formación de grasa y en el tratamiento o prevención del sobrepeso, de la obesidad y de sus complicaciones metabólicas asociadas.

Ejemplo 2: Estudio de eficacia y de sinergia de una composición de la presente invención en la inhibición de la expresión de marcadores adipocitarios durante la adipogénesis de fibroblastos embrionarios de ratón inducida hormonalmente. Comparación con ácido hialurónico y sulfato de dermatano

5 El objetivo del estudio era comparar el potencial de una combinación de ácido hialurónico y sulfato de dermatano, en una relación en peso HA a DS de 1:0,25 (HA80+DS20), y de sus componentes individuales de afectar la adipogénesis en cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) estimulados hormonalmente a diferenciarse en adipocitos, y determinar si existía un efecto sinérgico entre el ácido hialurónico y el sulfato de dermatano a este respecto.

10 Materiales y métodos

MEFs obtenidos a partir de embriones de 13 días de edad gestacional fueron cultivados en monocapa hasta llegar a la confluencia en placas de cultivo de 12 pocillos de 1 mL de capacidad/pocillo, tal y como se ha descrito para el

15 Ejemplo 1. Dos días después de alcanzada la confluencia (día 0), las células fueron estimuladas exponiéndolas durante 48 horas a un cóctel hormonal adipogénico estándar conteniendo dexametasona, metilisobutilxantina, insulina y rosiglitazona. Subsecuentemente, las células recibieron cada dos días (días 2, 4 y 6) medio de crecimiento fresco suplementado con insulina y rosiglitazona. El proceso de diferenciación se llevó a cabo en células expuestas desde día 0 a: vehículo (agua); HA a concentración final (c.f.) 80 µg/mL; DS a c.f. 20 µg/mL; o composición de la

20 presente invención HA80+DS20 a c.f. 100 µg/mL, que contenía por mL 80 µg de HA y 20 µg de DS. Las células fueron recogidas a día 8 de cultivo. Los niveles de mRNAs de genes seleccionados se determinaron por PCR a tiempo real, como se ha descrito para el Ejemplo 1.

25 Resultados

La expresión de los genes marcadores adipocitarios PPARgamma, C/EBPalpha y FAS se vio reducida en las células expuestas a la composición de la invención HA80+DS20 durante el proceso adipogénico, pero no en las expuestas a los componentes individuales de la composición, HA o DS, por separado (Figura 3).

30 Estos resultados indican que la combinación de HA y DS ejerce un efecto sinérgico anti-adipogénico incluso bajo condiciones ambientales (presencia de un cóctel hormonal pro-adipogénico) que promueven este proceso. En consecuencia, la composición de la invención puede ser utilizada en el tratamiento o prevención del sobrepeso, de la obesidad y de sus complicaciones metabólicas asociadas, así como en reducir la formación de grasa.

35 **Ejemplo 3: Estudio de eficacia de una composición de la presente invención en la inhibición de la expresión de resistina, una adipoquina relacionada con la resistencia a la insulina, en adipocitos derivados de MEFs**

Una de las complicaciones metabólicas más frecuentes en la obesidad es la resistencia a la insulina, la cual está estrechamente asociada a la diabetes de tipo 2. El objetivo era estudiar el efecto de una combinación de ácido

40 hialurónico y sulfato de dermatano, a diferentes concentraciones, en una relación en peso HA a DS de 1:0,25 (HA+DS), sobre la expresión de proteínas de secreción de los adipocitos que han sido previamente implicadas como factores que potencian la resistencia a la insulina, en particular la resistina, en células adiposas en cultivo. En el mismo estudio también se determinó el efecto del ácido hialurónico y del sulfato de dermatano por separado.

Materiales y métodos

MEFs obtenidos a partir de embriones de 13 días de edad gestacional fueron cultivados en monocapa hasta llegar a la confluencia y expuestos a un cóctel hormonal adipogénico estándar tal y como se ha descrito para el Ejemplo 2, en presencia de: vehículo (agua); HA a c.f. 80 µg/mL; DS a c.f. 20 µg/mL; composición de la invención HA16+DS4 a c.f. 20 µg/mL, que contenía por mL 16 µg de HA y 4 µg de DS; composición de la invención HA80+DS20 a c.f. 100 µg/mL, que contenía por mL 80 µg de HA y 20 µg de DS; o composición de la invención HA160+DS40 a c.f. 200 µg/mL, que contenía por mL 160 µg de HA y 40 µg de DS. Las células fueron recogidas a día 8 de cultivo. Los niveles de expresión del gen de la resistina se determinaron por PCR a tiempo real, como se ha descrito para el Ejemplo 1.

Resultados

La exposición a las composiciones de la invención HA16+DS4 a concentración final 20 µg/mL, HA80+DS20 a concentración final 100 µg/mL ó HA160+DS40 a concentración final 200 µg/mL, redujo la expresión de resistina tras 8 días de diferenciación adipocitaria de MEFs, de manera dosis-dependiente (Figura 4). El efecto de las composiciones de la invención sobre la expresión génica de resistina no fue reproducido por los componentes individuales HA80 y DS20 cuando fueron ensayados por separado. La reducción de la expresión de resistina se correlaciona con una menor resistencia a la insulina y, por tanto, con una mayor sensibilidad a la insulina.

Ejemplo 4: Efecto de la suplementación con una composición de la presente invención sobre la reducción de la ganancia de peso y de la ingesta energética en ratones

El objetivo era estudiar el efecto de la suplementación por vía oral con una composición de la presente invención (HA+DS+CH) sobre la evolución de parámetros biométricos *in vivo* en ratones.

Se empleó una composición que contenía 65% de ácido hialurónico (HA), 13,40% de sulfato de dermatano (DS) y 6,56% de hidrolizado de colágeno (CH) (relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10).

Materiales y métodos

Ratones C57BL6/J machos (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) de 6 semanas de edad al inicio del experimento fueron estabulados a 22°C con un periodo de luz/oscuridad de 12 horas, bajo condiciones de alimentación *ad libitum* con una dieta estándar definida (fabricada por Research Diets, Inc, New Brunswick, NJ, USA) que contenía 3,85 Kcal/g de dieta. Al inicio del experimento se establecieron dos grupos experimentales (n=8 animales por grupo), que recibieron diariamente por vía oral, durante 143 días, vehículo (agua, grupo Control), o una composición de la presente invención (HA+DS+CH), a dosis 0,45 mg/ratón/día (grupo HA+DS+CH; relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10). Se hizo un seguimiento del peso corporal y la ingesta energética de los animales durante los 143 días de tratamiento. La significancia estadística de los efectos observados fue analizada mediante test de la t de Student. El umbral de significancia se estableció a P<0,05.

Resultados

Los animales tratados con la composición de la invención HA+DS+CH tendieron a ganar menos peso y, al final del experimento, su peso corporal fue un 5% menor que el de los controles (media±SEM: pesos iniciales: grupo Control, 22,5±0,8 g; grupo HA+DS+CH, 22,5±0,7 g; pesos finales: grupo Control, 29,0±1.0 g; grupo HA+DS+CH, 27,5±1.0 g).

- 5 La ingesta energética acumulada durante los 143 días del experimento fue un 11% menor en los animales tratados con HA+DS+CH que en los animales del grupo Control a los que se administró el vehículo (P<0,05) (Figura 5).

Los resultados *in vivo* obtenidos permiten afirmar que las composiciones de la presente invención muestran eficacia en el tratamiento o prevención del sobrepeso y de la obesidad, en reducir el peso corporal, en reducir la ganancia de peso, en reducir la ingesta de alimento y el apetito, en prevenir el aumento de peso y en inducir la sensación de saciedad.

Ejemplo 5: Efecto de la suplementación por vía oral con una composición de la presente invención sobre parámetros relacionados con la sensibilidad a la insulina en ratones

15 Existe una conexión entre obesidad y pérdida de sensibilidad a la insulina.

El objetivo era estudiar el efecto de la suplementación por vía oral con una composición de la presente invención (HA+DS+CH) sobre la sensibilidad a la insulina *in vivo*, en ratones

20 Se empleó una composición que contenía 65% de ácido hialurónico (HA), 13,40% de sulfato de dermatano (DS) y 6,56% de hidrolizado de colágeno (CH) (relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10).

Materiales y métodos

25 Se utilizaron los mismos grupos experimentales del Ejemplo 4. Tras 88 días de tratamiento, los animales de ambos grupos, Control y HA+DS+CH, fueron sometidos a un ayuno de 6 h tras el cual se les extrajo sangre, para la determinación de los niveles circulantes de glucosa (por sistema Accu-Check, de Roche) e insulina (mediante un kit de ELISA, distribuido por DGR Instruments GnbH). Para cada animal se calculó el índice HOMA-IR (*homeostatic model assessment for insulin resistance*), que es un índice bien aceptado indicativo de la sensibilidad relativa a la insulina, utilizando la fórmula de Matthews *et al.* (D.R. Matthews *et al.*, *Diabetologia* 28, 412-419 (1985)): HOMA-IR= glucosa en ayunas (mM) x insulina en ayunas (mU/L)/22,5. Cuanto menor el índice HOMA-IR, menor es la resistencia a la insulina y por tanto mayor la sensibilidad a esta hormona. Este índice se ha validado en humanos y ratones (S. Lee *et al.* *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E261-70 (2008)).

35 **Resultados**

Los animales suplementados con HA+DS+CH a igual nivel de glucosa en sangre presentaron una menor insulinemia que los animales controles, y por tanto un índice HOMA-IR también menor (Figura 6). Estos resultados indican que la sensibilidad a la insulina es mayor en el grupo suplementado con la composición de la invención que comprende ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno (HA+DS+CH) que en el grupo control. El deterioro de la sensibilidad a la insulina es considerado uno de los principales detonantes del desarrollo de diabetes de tipo 2, junto con la disfunción de las células beta pancreáticas (D. LeRoith, *Am. J. Med.* 113 (Suppl 6A), 3S-11S (2002)).

Ejemplo 6: Efecto de la suplementación por vía oral con una composición de la presente invención sobre los niveles de triacilgliceroles en ratones

5 La hipertrigliceridemia es una dislipidemia que está presente en muchas personas con sobrepeso u obesidad.

El objetivo del estudio era determinar el efecto de la suplementación por vía oral con una composición de la presente invención (HA+DS+CH) sobre los niveles circulantes de triacilgliceroles *in vivo*, en ratones alimentados con una dieta hiperlipídica que induce obesidad.

10 Se empleó una composición que contenía 65% de ácido hialurónico (HA), 13,40% de sulfato de dermatano (DS) y 6,56% de hidrolizado de colágeno (CH) (relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10).

Materiales y métodos

15 Se utilizaron los mismos grupos experimentales del Ejemplo 4. Tras 143 días de tratamiento, los animales de ambos grupos, Control y HA+DS+CH, fueron sacrificados por decapitación. Se determinaron los niveles de triglicéridos circulantes en suero preparado a partir de sangre del cuello, mediante un ensayo enzimático colorimétrico comercial (Sigma).

20 **Resultados**

Tras 143 días de suplementación, los animales suplementados con la composición de la invención que comprende ácido hialurónico, sulfato de dermatano e hidrolizado de colágeno (HA+DS+CH) presentaron menor trigliceridemia que los controles a los que se había administrado el vehículo (Figura 7). En consecuencia, las composiciones de la presente invención pueden ser de gran utilidad en el tratamiento o prevención de la dislipidemia y en reducir los triglicéridos en sangre.

30 **Ejemplo 7: Efecto de la suplementación por vía oral con una composición de la presente invención sobre la reversión de la obesidad, la concentración de leptina y la concentración de insulina en ratones obesos**

Tanto la leptina como la resistencia a la insulina están fuertemente relacionadas con la obesidad. El objetivo era estudiar la pérdida de peso y de grasa y la disminución de leptina y de insulina circulantes en ratones obesos al ser tratados por vía oral con una composición de la presente invención (HA+DS+CH).

35 Se empleó una composición que contenía 65% de ácido hialurónico (HA), 13,40% de sulfato de dermatano (DS) y 6,56% de hidrolizado de colágeno (CH) (relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10).

Materiales y métodos

40 Se emplearon ratones C57BL6/J machos de 25 semanas de edad a los que previamente se les había inducido obesidad dietética por alimentación con dieta hiperlipídica desde las 6 semanas de vida. Los ratones presentaban, en el momento del inicio del experimento, un 22% de exceso de peso respecto de animales de la misma edad mantenidos bajo dieta estándar. Al inicio del experimento, los ratones obesos pasaron a ser alimentados con una

dieta normolipídica, y fueron distribuidos en dos grupos, que recibieron diariamente, por vía oral, vehículo (agua, 60 µl, grupo Control) o una composición de la presente invención (HA+DS+CH), a una dosis de 3 mg/ratón/día (n=7-8 animales/grupo) (grupo HA+DS+CH; relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10). En ambos grupos, Control y HA+DS+CH, se monitorizó regularmente el peso corporal, así como la composición corporal mediante un sistema no invasivo de resonancia magnética (ECHO-MRI). Los animales fueron sacrificados por decapitación, 32 días después del inicio de la reversión a dieta estándar, procediéndose a la recogida de sangre y tejidos, y al peso de los tejidos adiposos. La significancia estadística de los efectos observados fue analizada mediante el test de la *t* de Student. El umbral de significancia se estableció a $P < 0,05$.

10 Resultados

Los animales tratados con HA+DS+CH tendieron a perder más porcentaje de peso y más rápidamente que los del grupo Control; esta tendencia alcanzó significación estadística tras 11 días de reversión a la dieta normolipídica, punto en que los animales del grupo Control habían perdido un 9,5% de su peso corporal inicial, y los animales tratados con HA+DS+CH, un 12,8%. Además, los animales tratados con HA+DS+CH presentaron una mayor y más rápida pérdida porcentual de masa grasa que los animales del grupo Control (Figura 8A), lo que se correlacionó con un mayor incremento relativo de su masa magra (Figura 8B).

A punto final del experimento, la adiposidad corporal (suma de los pesos de los depósitos de tejido adiposo como porcentaje del peso corporal) de los animales tratados con HA+DS+CH fue un 30% menor que la de los animales del grupo Control (Figura 9B). Todos los depósitos adiposos diseccionados (inguinal (TABi), retroperitoneal (TABr) y epididimal (TABe)) fueron significativamente más pequeños en los animales tratados con HA+DS+CH (Figura 9A). En buena correspondencia con esta menor adiposidad, a punto final del experimento la concentración de leptina circulante fue un 40% menor en los los animales tratados con HA+DS+CH (Figura 9C).

A punto final del experimento, los animales tratados con HA+DS+CH, pese a no presentar variaciones en la glucemia, presentaron una menor insulinemia que los animales Control, indicativo de una mayor sensibilidad a la insulina (Figura 10).

En el presente estudio, por un lado, se confirma que en un animal obeso los niveles de leptina y de insulina son elevados (ver Controles en Figura 9C y Figura 10B), y, por otro lado, se pone de manifiesto que las composiciones de la invención son capaces de revertir la obesidad y de actuar, al mismo tiempo, sobre la leptinemia y la insulinemia.

Estos resultados *in vivo* de reversión de la obesidad y de disminución de leptinemia e insulinemia permiten afirmar que las composiciones de la presente invención pueden ser de gran utilidad en el tratamiento o prevención del sobrepeso, y de la obesidad, así como también en el tratamiento y prevención de las alteraciones metabólicas que acompañan a la obesidad y que definen el síndrome metabólico.

40 **Ejemplo 8: Efecto de la suplementación por vía oral con una composición de la presente invención sobre la leptinemia en pacientes obesos**

La leptina, una hormona sintetizada y secretada por el tejido adiposo (específicamente por el adipocito), controla el mecanismo energético a nivel del hipotálamo, inhibiendo la ingesta de alimento y estimulando el gasto de energía. Si

hay un exceso de ingesta de alimento, hay un exceso de energía disponible, la cual se acumula en forma de grasa (hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos), apareciendo la obesidad. Los niveles de leptina son elevados en personas obesas, indicando la resistencia a los efectos de leptina de estos individuos.

- 5 El objetivo era, por un lado, estudiar la leptinemia en personas obesas tratadas por vía oral con una composición de la presente invención (HA+DS+CH), y, por otro lado, estudiar cómo afectaría dicho tratamiento a los niveles de colesterol y triglicéridos.

10 Se empleó una composición que contenía 65% de ácido hialurónico (HA), 13,40% de sulfato de dermatano (DS) y 6,56% de hidrolizado de colágeno (CH) (relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10).

Materiales y métodos

15 Se reclutaron 49 personas obesas, con un índice de masa corporal medio de $34,6 \pm 0,87$ kg/m². Los participantes se dividieron aleatoriamente en 2 grupos. Un grupo recibió diariamente, por vía oral, 2 cápsulas conteniendo una composición de la presente invención (HA+DS+CH), a una dosis de 80 mg/persona/día (grupo HA+DS+CH; relación en peso HA:DS:CH 1:0,20:0,10). El otro grupo recibió un tratamiento placebo consistente en la administración diaria, por vía oral, de 2 capsulas conteniendo solamente los excipientes utilizados en la composición anterior. Los participantes recibieron los productos del estudio durante un periodo de 90 días. Al inicio (día 0) y final del estudio (día 90) se obtuvieron muestras de sangre de todos los participantes para analizar la concentración de leptina, 20 colesterol total y triglicéridos, y de líquido sinovial con el fin de analizar la concentración de leptina. De los 49 participantes que iniciaron el estudio, 40 completaron el tratamiento. La significancia estadística de los efectos observados fue analizada mediante un análisis de covarianza. El umbral de significancia se estableció a $P < 0.05$.

Resultados

25 Al inicio del estudio la concentración de leptina en suero y en líquido sinovial era similar en los 2 grupos de tratamiento. Después de administrar los productos experimentales durante 90 días, los participantes que fueron tratados con la composición de la invención (HA+DS+CH) experimentaron una reducción significativa ($p < 0.05$) en la concentración de leptina tanto en suero (4%) como en líquido sinovial (19%). Sin embargo, en las personas tratadas con el producto placebo, la concentración de leptina se mantuvo estable entre el principio y el final del estudio, tanto 30 en suero como en líquido sinovial. En consecuencia, al final del estudio se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los pacientes tratados con HA+DS+CH y los pacientes tratados con placebo, en la concentración de leptina en suero y en líquido sinovial (Figura 11).

35 En relación a la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos, no se detectaron diferencias al inicio del estudio entre los 2 grupos de tratamiento. Después de administrar los productos experimentales durante 90 días, los participantes que fueron tratados con la composición de la invención (HA+DS+CH) experimentaron una reducción significativa en la concentración plasmática de colesterol (8,8%; $p = 0,0056$) y de triglicéridos (19,4%; $p = 0,0175$). Sin embargo, en las personas tratadas con el producto placebo no se detectaron diferencias significativas en la 40 concentración plasmática de colesterol y triglicéridos entre el principio y el final del estudio.

Estos resultados obtenidos *in vivo* en personas obesas permiten afirmar que las composiciones de la presente invención son eficaces para regular la hiperleptinemia asociada al exceso de grasa corporal, y en consecuencia para el tratamiento de la obesidad y de sus complicaciones asociadas, que definen el síndrome metabólico.

REIVINDICACIONES

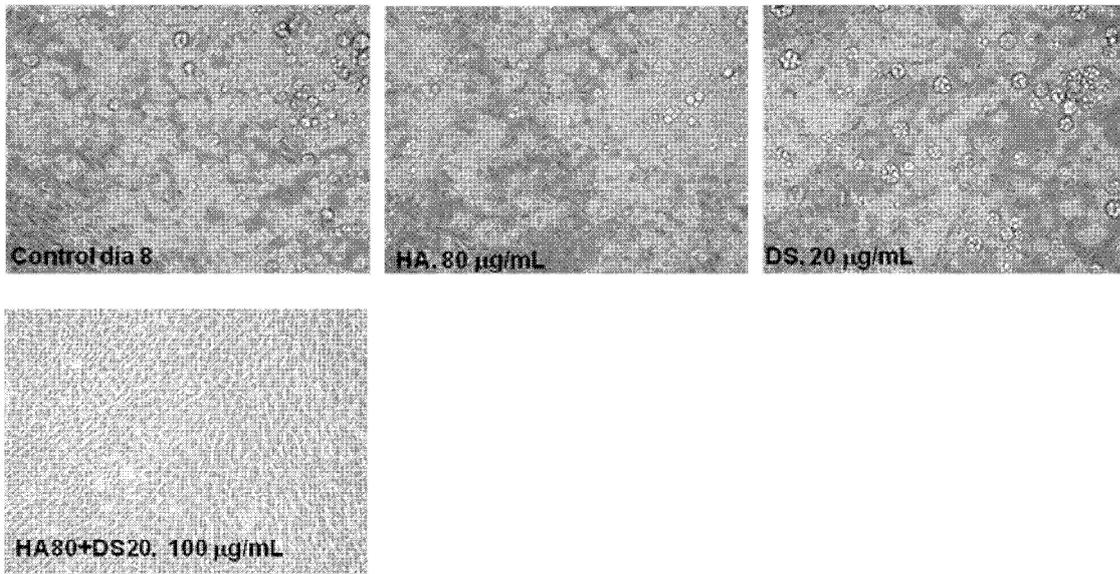
- 1.- Una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hígado graso o dislipidemia en un mamífero.
- 5
- 2.- La composición para uso según la reivindicación 1, en la que la resistencia a la insulina está asociada al sobrepeso o a la obesidad, la diabetes tipo 2 está asociada al sobrepeso o a la obesidad, el hígado graso está asociado al sobrepeso o a la obesidad o la dislipidemia está asociada al sobrepeso o a la obesidad.
- 10
- 3.- La composición para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la dislipidemia es hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia.
- 4.- La composición para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el tratamiento o la prevención de la dislipidemia resulta en la reducción del colesterol en sangre, el mantenimiento de los niveles normales de colesterol en sangre, la reducción de los triglicéridos en sangre, o el mantenimiento de los niveles normales de triglicéridos en sangre.
- 15
- 5.- La composición para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el tratamiento o la prevención de la resistencia a la insulina o la diabetes tipo 2 resulta en el aumento de la sensibilidad a la insulina.
- 20
- 6.- La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición está en la forma de una composición farmacéutica o un alimento médico.
- 7.- La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la que el mamífero es obeso o tiene sobrepeso.
- 25
- 8.- Uso no terapéutico de una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano como un alimento, alimento funcional o complemento alimenticio, para reducir el sobrepeso, reducir la ingesta de alimento, inducir la sensación de saciedad, reducir el apetito, reducir el peso corporal, prevenir el aumento de peso, reducir la grasa corporal o reducir la formación de grasa en un mamífero.
- 30
- 9.- El uso no terapéutico de una composición según la reivindicación 8, en el que el mamífero tiene sobrepeso.
- 10.- Uso no terapéutico de una composición que comprende ácido hialurónico y sulfato de dermatano como un producto adelgazante.
- 35
- 11.- El uso no terapéutico de una composición según la reivindicación 10, en el que la composición está en la forma de un alimento, de un alimento funcional o de un complemento alimenticio.
- 40
- 12.- La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el uso no terapéutico de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde el ácido hialurónico y el sulfato de dermatano están presentes en una relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano comprendida entre 1:0,06 y 1:0,80, preferentemente entre 1:0,10 y 1:0,50.

13.- La composición para uso según la reivindicación 12, o el uso no terapéutico de una composición según la reivindicación 12, donde la relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano es 1:0,25.

5 14.- La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, reivindicación 12 o reivindicación 13, o el uso no terapéutico de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que además comprende hidrolizado de colágeno.

10 15.- La composición para uso o el uso no terapéutico de una composición según la reivindicación 14, donde el ácido hialurónico, el sulfato de dermatano y el hidrolizado de colágeno están presentes en una relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano a hidrolizado de colágeno comprendida entre 1:0,06:0,03 y 1:0,80:0,40, preferentemente entre 1:0,10:0,05 y 1:0,50:0,20.

16.- La composición para uso o el uso no terapéutico de una composición según la reivindicación 15, donde la relación en peso ácido hialurónico a sulfato de dermatano a hidrolizado de colágeno es 1:0,20:0,10.



X200

FIGURA 1

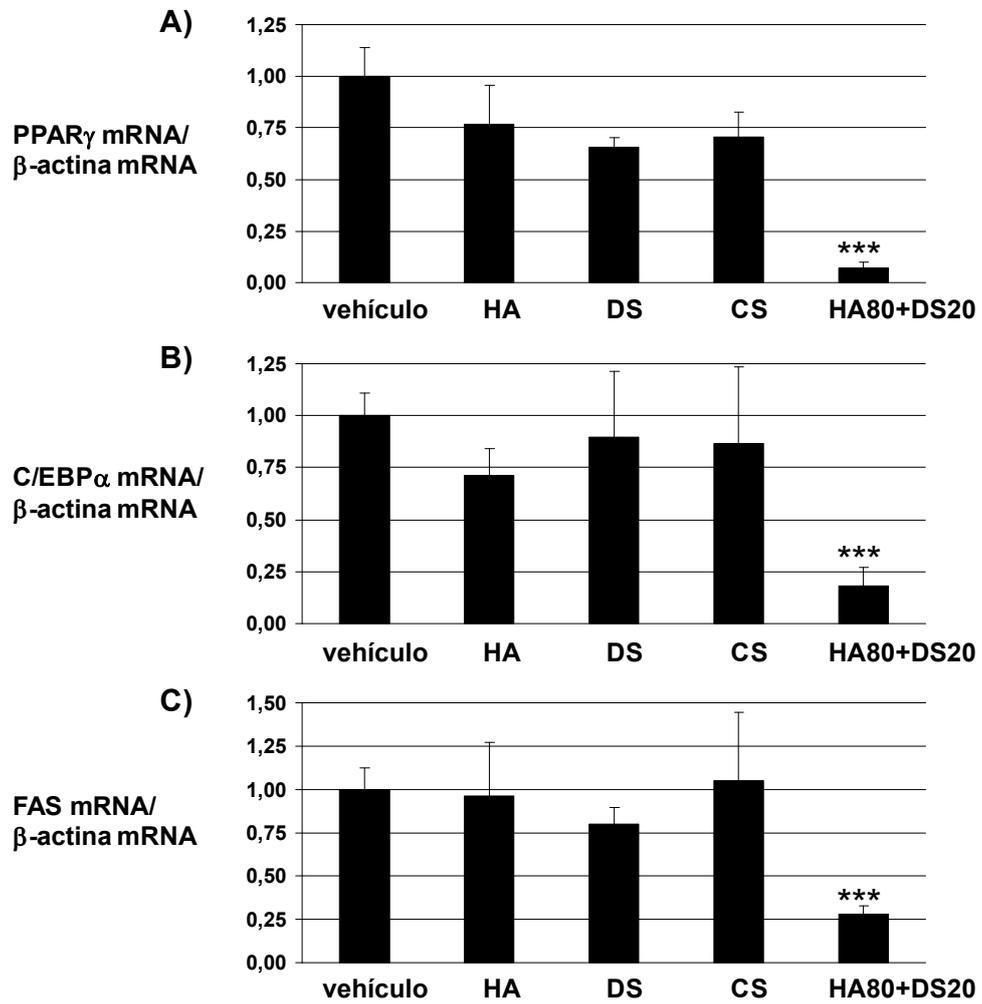


FIGURA 2

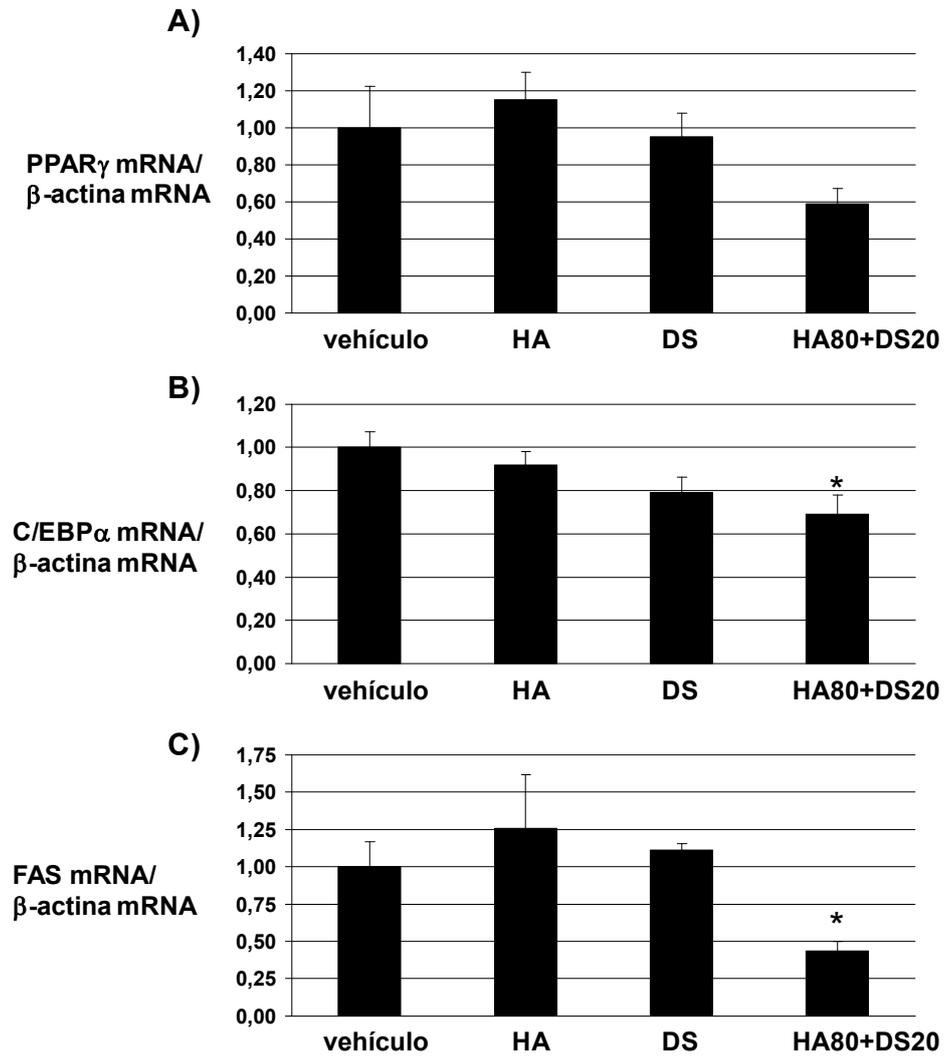


FIGURA 3

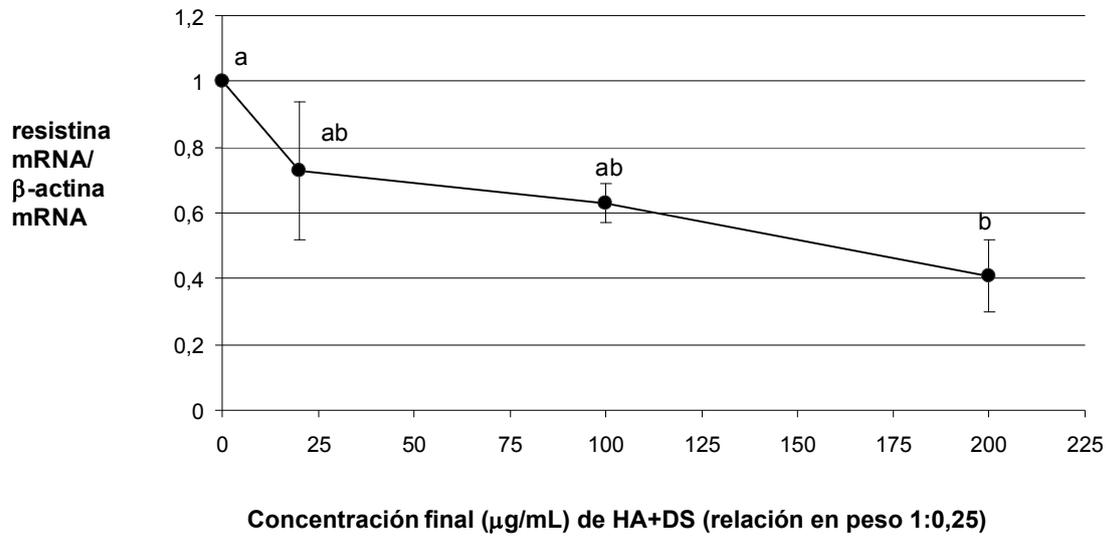


FIGURA 4

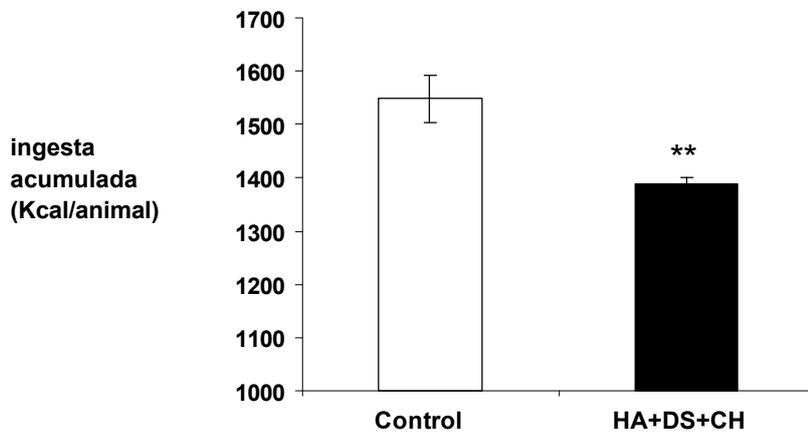


FIGURA 5

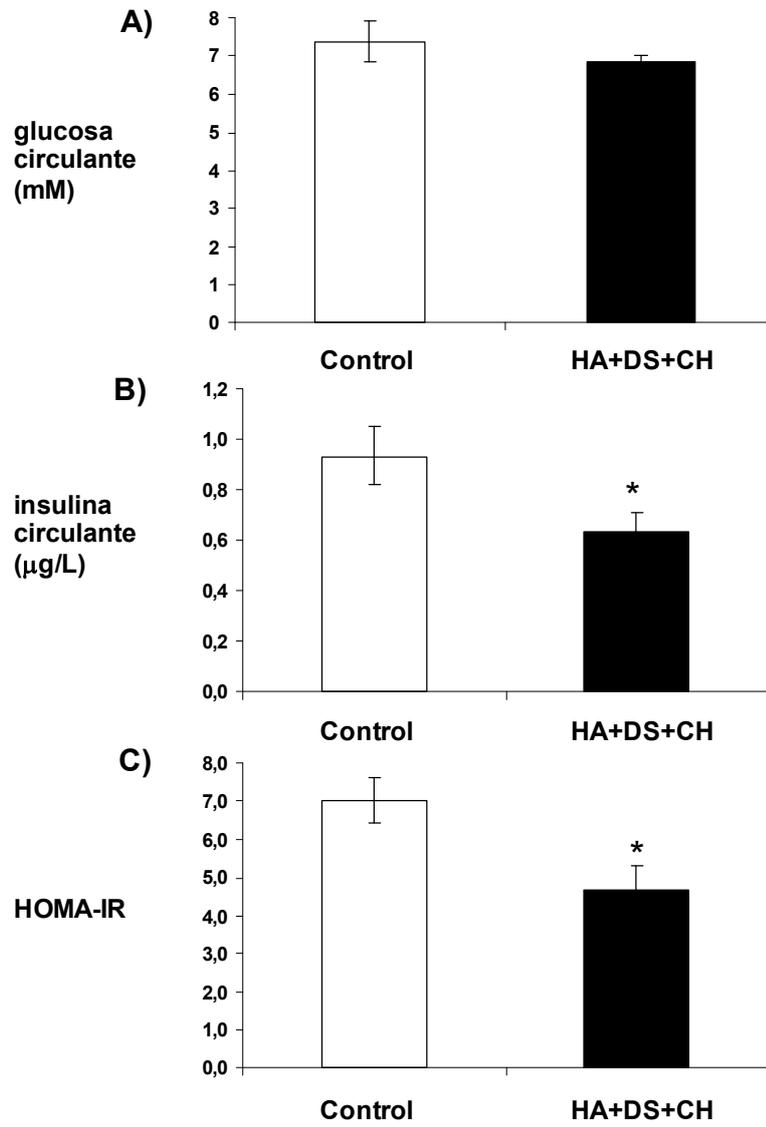


FIGURA 6

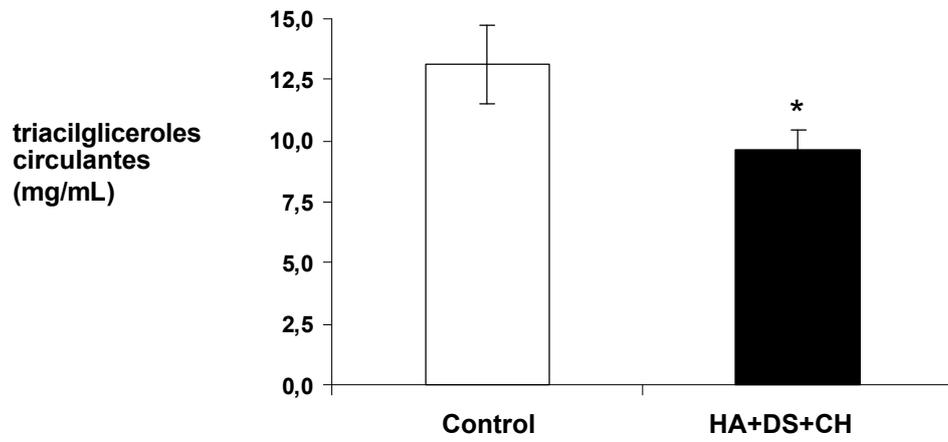


FIGURA 7

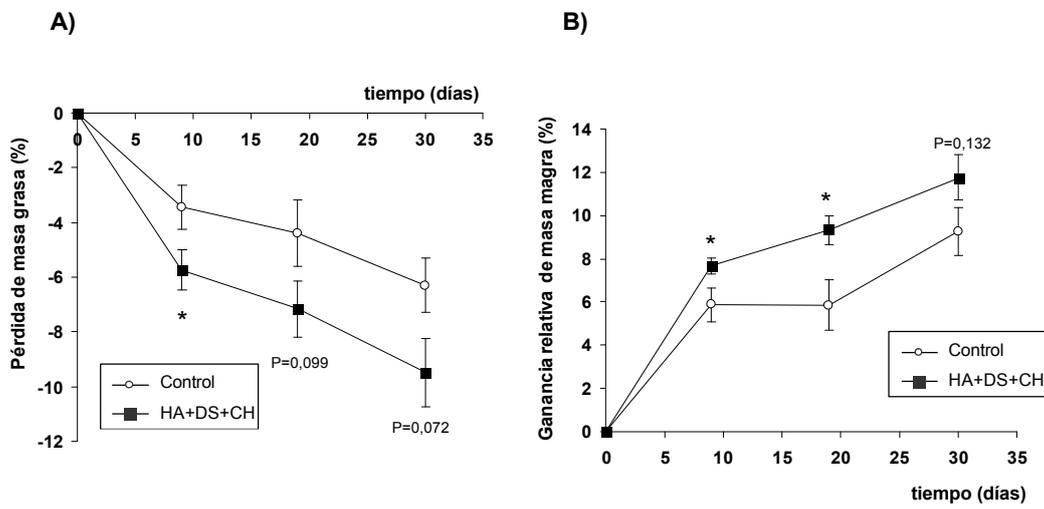
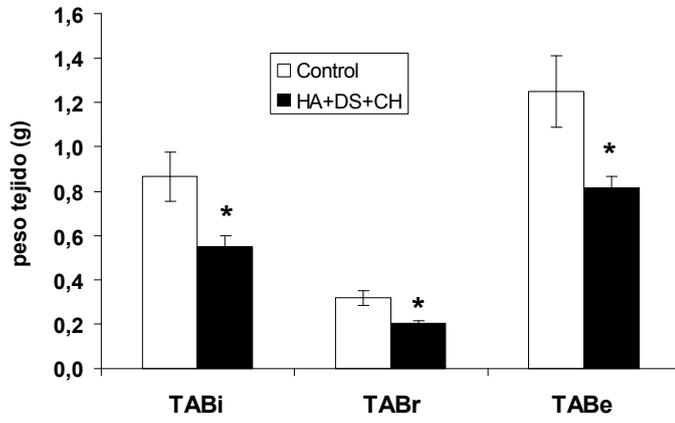
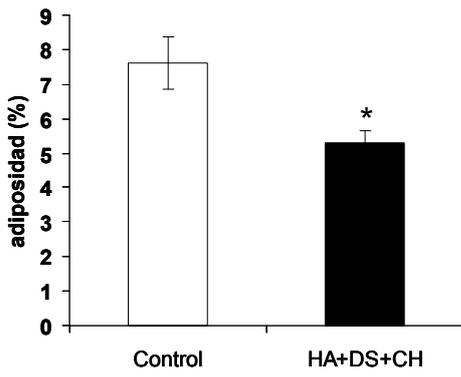


FIGURA 8

A)



B)



C)

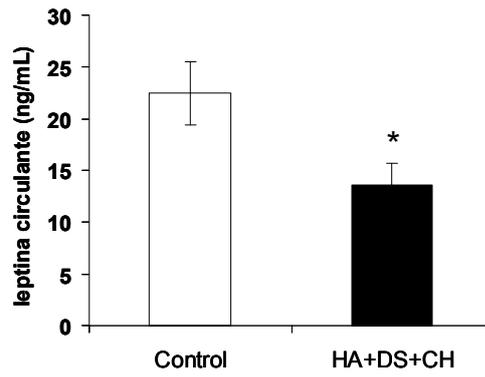
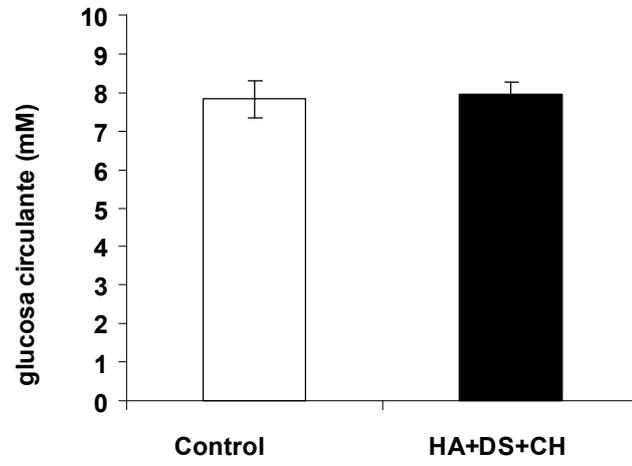


FIGURA 9

A)



B)

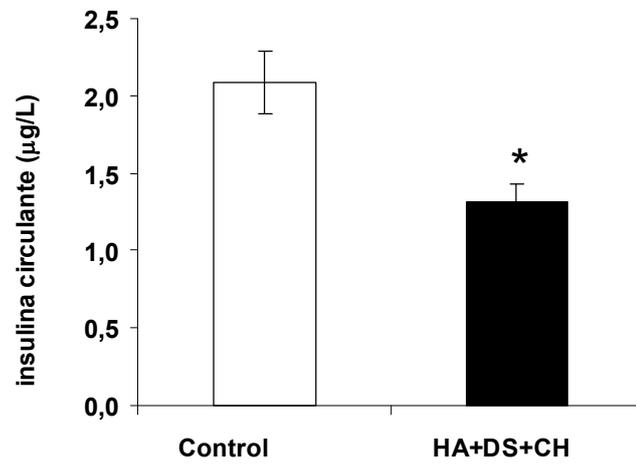


FIGURA 10

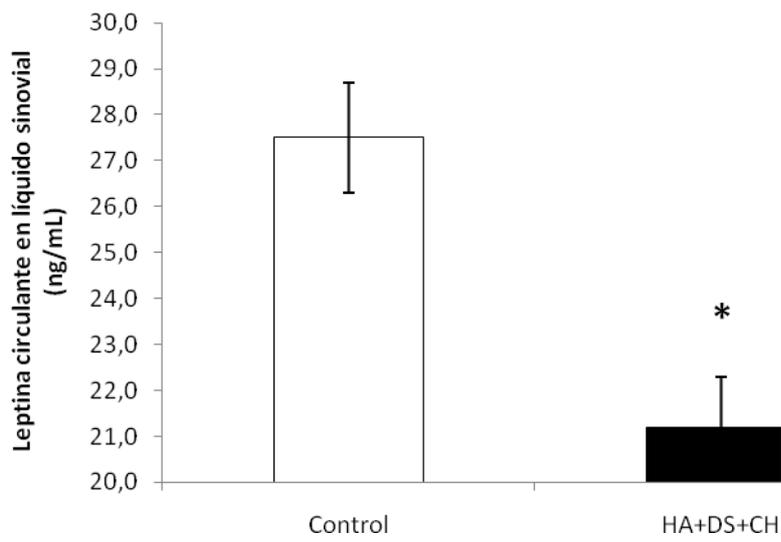
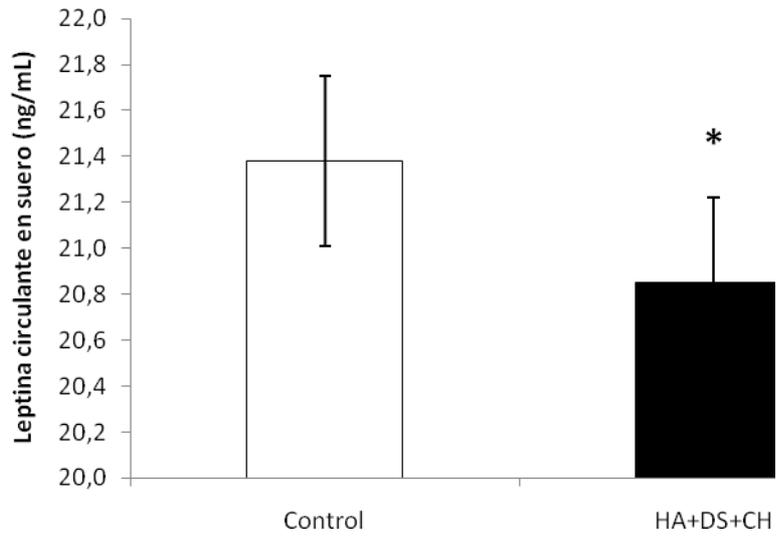


FIGURA 11