

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 495**

51 Int. Cl.:

A61K 31/23 (2006.01)

A61K 31/231 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2014 PCT/KR2014/007631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15026114**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2014 E 14837360 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3037090**

54 Título: **Composiciones que contienen un compuesto monoacetildiglicérido como un componente activo para prevenir o tratar la artritis reumatoide**

30 Prioridad:

19.08.2013 KR 20130098186

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

31.03.2020

73 Titular/es:

**ENZYCHEM LIFESCIENCES CORPORATION
(50.0%)**

**KAIST-ICC F741, 193 Munji-ro, Yuseong-gu
Daejeon 305-732, KR y**

**KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE
AND BIOTECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, JAE WHA;
OH, SEI RYANG;
AHN, KYUNG SEOP;
KANG, HO BUM;
PARK, BEOM SU;
LEE, TAE SUK;
KANG, JONG KOO;
JUNG, YOUNG SIK;
HAN, YONG-HAE y
SOHN, KI-YOUNG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 751 495 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que contienen un compuesto monoacetildiglicérido como un componente activo para prevenir o tratar la artritis reumatoide

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, para prevenir, tratar o mejorar la artritis reumatoide, que comprende un compuesto de monoacetildiacilglicerol como un componente activo.

Antecedentes de la técnica

10 La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune crónica que provoca inflamación por medio del ataque a las articulaciones u otras partes del cuerpo. La artritis reumatoide provoca una inflamación dolorosa de los dedos, las manos, los pies, las muñecas, los tobillos, las rodillas y en ocasiones puede afectar a otros órganos del cuerpo tal como los músculos, la piel, los pulmones y los ojos. La causa subyacente de la artritis reumatoide sigue sin estar clara y se ha investigado de manera continua. A la fecha, los procedimientos conocidos para tratar o prevenir la artritis reumatoide no son eficaces y se requieren mejores tratamientos. Muchos medicamentos hormonales, tal como los esteroides, se han utilizado ampliamente para tratar la artritis. Sin embargo, debido a que el uso de los medicamentos hormonales no es un tratamiento fundamental y puede provocar varios efectos secundarios, el tratamiento es limitado. La artritis, en especial la artritis reumatoide, provoca un dolor severo tal que el paciente debe tomar agentes antiinflamatorios. La aspirina se ha utilizado ampliamente para aliviar el dolor durante mucho tiempo. Sin embargo, el efecto nocivo de la aspirina en el estómago hace que sea difícil tomar una cantidad suficiente de aspirina necesaria para el tratamiento de la artritis de manera continua.

20 Los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de la artritis tienen diversas limitaciones, que incluyen efectos secundarios que impiden su uso a largo plazo, la ausencia de efectos antiinflamatorios y la falta de eficacia para el tratamiento de la artritis que ya ha ocurrido. Como una solución para este problema, el desarrollo de un agente terapéutico eficaz para la artritis ha sido constantemente necesario. La mayoría de los medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento de la artritis tienen un cierto grado de efecto secundario, si bien es variado entre los medicamentos y los pacientes. En especial, dado que es necesario tomar los medicamentos durante un largo período de tiempo para el tratamiento de la artritis reumatoide, es un problema muy importante y urgente desarrollar un agente farmacéutico novedoso con un efecto secundario bajo.

30 EC-18 es un mono acetil diglicérido y se ha separado del asta de ciervo. Se ha informado que EC-18 incrementa la proporción de supervivencia de los animales en el experimento de modelo animal de sepsis por el uso de ligadura y punción cecal, y no muestra toxicidad en una prueba de toxicidad de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP). Sin embargo, el efecto de los compuestos de monoacetildiacilglicerol que incluyen EC-18 sobre la artritis reumatoide no es conocido o no desvelado en la técnica anterior. Por lo tanto, los inventores de la presente se propusieron como objetivo hallar un compuesto derivado de productos naturales o un compuesto novedoso para el tratamiento de la artritis reumatoide y descubrieron que el compuesto de monoacetildiacilglicerol inhibe STAT-3, una diana terapéutica para la artritis reumatoide y que se puede utilizar para prevenir o tratar la artritis reumatoide.

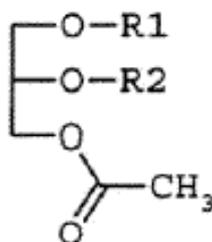
40 El documento KR 2006/0047447 se dirige al uso de derivados de monoacetildiacilglicerol extraídos de asta de ciervo para un agente inmunomodulador. El documento D1 enseña que los derivados de monoacetildiacilglicerol se pueden utilizar para un agente inmunomodulador para prevenir y tratar diversas enfermedades generadas como resultado de un sistema inmunológico deteriorado y del cáncer, pero también para inhibir, prevenir y tratar enfermedades autoinmunes tal como la artritis, atopia, demencia, y sepsis generadas como resultado de las reacciones autoinmunes. Sin embargo, el documento KR 2006/0047447 no ofrece ninguna sugerencia referente a si los derivados de monoacetildiacilglicerol tienen un efecto sobre la artritis reumatoide, en consideración de que la artritis reumatoide es una enfermedad muy diferente al SIDA, cáncer o shock séptico sobre los que se llevan a cabo los ejemplos experimentales en el documento KR 2006/0047447.

45 Descripción

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas, para prevenir, tratar o mejorar la artritis reumatoide, que comprende un monoacetildiacilglicerol de la Fórmula 1 como un componente activo.

[Fórmula 1]

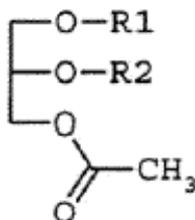


en la que R₁ y R₂ son de manera independiente un residuo de ácido graso de 14 a 20 átomos de carbono.

Solución técnica

- 5 En algunas realizaciones para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para prevenir o tratar la artritis reumatoide, que comprende un monoacetildiacylglicerol de la Fórmula 1 como un componente activo.

[Fórmula 1]



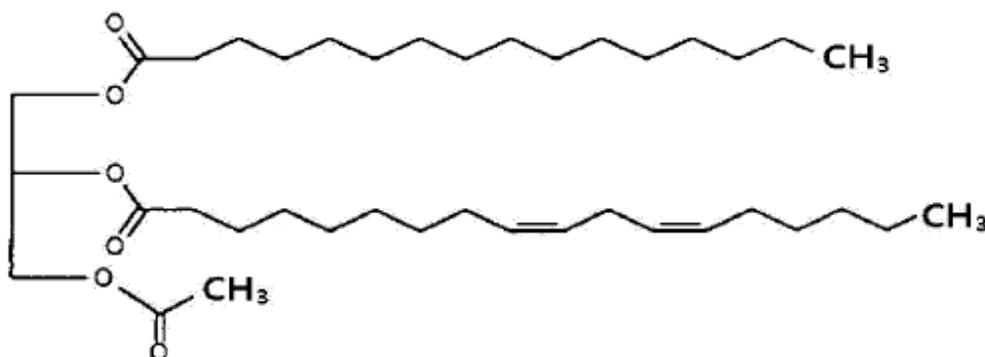
- 10 en la que R₁ y R₂ son de manera independiente un residuo de ácido graso de 14 a 20 átomos de carbono. En la presente divulgación, un residuo de ácido graso se refiere al resto de acilo resultante de la formación de un enlace éster por medio de la reacción de un ácido graso y un alcohol.

- 15 Específicamente, la composición farmacéutica para prevenir o tratar la artritis reumatoide de la presente invención comprende un monoacetildiacylglicerol de la Fórmula 1. En la presente divulgación, el término "compuesto de monoacetildiacylglicerol" significa un derivado de glicerol que contiene un grupo acetilo y dos grupos acilo y también se denomina MADG.

- 20 En los derivados de monoacetildiacylglicerol de la Fórmula 1, R₁ y R₂ son de manera independiente un residuo de ácido graso de 14 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de R₁ y R₂ no limitantes de este modo incluyen palmitoilo, oleoilo, linoleoilo, linolenoilo, estearoilo, miristoilo, araquidonoilo, y etc. Las combinaciones preferentes de R₁ y R₂ (R₁/R₂) incluyen oleoilo/palmitoilo, palmitoilo/oleoilo, palmitoilo/linoleoilo, palmitoilo/linolenoilo, palmitoilo/araquidonoilo, palmitoilo/estearoilo, palmitoilo/palmitoilo, oleoilo/estearoilo, linoleoilo/palmitoilo, linoleoilo/estearoilo, estearoilo/linoleoilo, estearoilo/oleoilo, miristoilo/linoleoilo, miristoilo/oleoilo, y etc. En cuanto a la actividad óptica, los derivados de monoacetildiacylglicerol de la Fórmula 1 pueden ser de forma (R), de forma (S) o una mezcla racémica, y pueden incluir sus estereoisómeros.

- 25 En una realización, el monoacetildiacylglicerol es un compuesto de la siguiente Fórmula 2:

[Fórmula 2]



El compuesto de la Fórmula 2 es 1-palmitoil-2-linoleoil-3-acetilglicerol, a menudo denominado "EC-18" en la presente

divulgación. R₁ y R₂ del compuesto de la Fórmula 2 son palmitoilo y linoleoilo, respectivamente.

Los compuestos de monoacetildiacilglicerol se pueden separar y extraer del asta de ciervo natural o se pueden producir por medio de procedimientos de síntesis orgánica conocidos (Patente Coreana Registrada Núm. 10-0789323). Más específicamente, el asta de ciervo se extrae con hexano, seguido por la extracción del residuo con cloroformo y la eliminación del cloroformo para proporcionar extractos de cloroformo. El volumen de los disolventes para esta extracción es suficiente para sumergir el asta de ciervo. En general, se utilizan aproximadamente de 4 a 5 litros de hexano y/o cloroformo para 1 kg de asta de ciervo, pero no se limitan a los mismos. Los extractos obtenidos por medio de este procedimiento se fraccionan de manera adicional y se purifican por el uso de una serie de cromatografía en columna de gel de sílice y el procedimiento de TLC para obtener el compuesto de monoacetildiacilglicerol para la presente invención. Un disolvente para la extracción se selecciona entre cloroformo/metanol, hexano/acetato de etilo/ácido acético, pero no se limita a los mismos.

Un procedimiento sintético químico para la preparación de compuestos de monoacetildiacilglicerol se muestra en la Patente Coreana Registrada Núm. 10-0789323. Específicamente, el procedimiento comprende (a) una etapa de preparación de 1-R1-3-grupo protector-glicerol por medio de la adición de un grupo protector en la posición 3 de 1-R1-glicerol; (b) una etapa de preparación de 1-R1-2-R2-3-grupo protector-glicerol por medio de la introducción de R2 en la posición 2 del 1-R1-3-grupo protector-glicerol; y (c) una etapa de preparación del compuesto de monoacetildiacilglicerol deseado por medio de la realización de una reacción de desprotección y la reacción de acetilación del 1-R1-3-grupo protector-glicerol al mismo tiempo. El compuesto de monoacetildiacilglicerol se puede purificar de manera adicional en caso de ser necesario. De manera alternativa, los compuestos de monoacetildiacilglicerol se pueden preparar por medio de la descomposición de ácido de fosfatidilcolina (acetólisis), pero no se limita a esto. Los estereoisómeros de los compuestos de la fórmula (1) también están dentro del alcance de la presente invención.

En la presente divulgación, se muestra que el compuesto de monoacetildiacilglicerol inhibe la fosforilación de STAT-3, por lo tanto, es eficaz en la prevención o el tratamiento de la artritis reumatoide.

En la presente divulgación, el término "artritis reumatoide" es una enfermedad inflamatoria crónica de causa desconocida que se caracteriza por la poliartritis. La inflamación aparece inicialmente en la membrana sinovial que rodea la articulación, pero gradualmente se extiende a la periferia del cartilago y del hueso, lo que lleva al daño y a la deformidad de la articulación. Además de las articulaciones, la artritis reumatoide puede atacar a otras partes del cuerpo. Los síntomas de la artritis reumatoide incluyen anemia, síndromes secos, nódulos subcutáneos, fibrosis pulmonar, vasculitis y úlceras cutáneas. Los medicamentos utilizados para el tratamiento de la artritis reumatoide incluyen agentes antiinflamatorios no esteroideos, esteroides, un fármaco antirreumático y agentes bloqueantes del TNF, pero es sabido que presentan un riesgo de diversos efectos secundarios. De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "prevención" o "prevenir" incluye cualquier actividad para suprimir o retrasar la aparición de la artritis reumatoide por medio de la administración de la composición de la presente invención. El término "tratamiento" o "tratar" incluye la profilaxis, mitigación, mejora, retraso o reducción de los síntomas, así como la eliminación o la prevención parcial o completa de los síntomas de la artritis reumatoide por medio de la administración de la composición de la presente invención.

Recientemente se ha descubierto que las células Th17 que producen interleucina-17 (IL-17) desempeñan un papel principal en la patogénesis de la artritis reumatoide. En especial, las células Th17 inducen directamente la inflamación de las articulaciones y la destrucción ósea. Específicamente, STAT-3 conocido como un factor de transcripción clave para la diferenciación y la actividad de las células Th17 puede regular el locus de IL-17 y desempeñar un papel esencial en la expresión de muchos factores de transcripción implicados en la diferenciación de las células Th17. STAT-3 puede ser activado por una fosforilación. Se ha conocido que la inhibición de la activación de STAT-3 en células Th17 puede controlar las células Th17 e incrementar la actividad de las células T inmunorreguladoras, para de este modo prevenir o tratar la artritis reumatoide. Por lo tanto, STAT-3 se ha convertido en una diana terapéutica para la artritis reumatoide.

En los ejemplos de la presente divulgación, se muestra que (i) en las células U937 y NK-92 en las que STAT-3 se activa por medio del tratamiento de IL-6 y PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), respectivamente, el EC-18 inhibe la fosforilación de STAT-3 de una manera dependiente de la concentración (Experimento 1 y 2, Figs. 1 y 2), y (ii) en las células A549 y HepG2 en las que STAT-3 se activa por medio del tratamiento de IL-10, el EC-18 inhibe la fosforilación de STAT (Ejemplo 3, Figura 3). Estos resultados muestran que el compuesto de monoacetildiacilglicerol es eficaz en el tratamiento de la artritis reumatoide. En el ejemplo de modelo animal en el que la artritis es inducida por colágeno, el índice de artritis determinado por el examen a simple vista (Ejemplo 4, Fig. 5) y la concentración de IL-6 en el suero (Ejemplo 4, Figura 4) se redujeron de manera significativa en comparación con el grupo de control negativo. El resultado de la tinción de tejidos también muestra que el EC-18 en la concentración de 125, 500 y 2000 mg/kg es eficaz para la mejora de los síntomas de la artritis inducida por colágeno (Ejemplo 4, Figs. 6 y 7).

La composición farmacéutica que comprende un monoacetildiacilglicerol de la presente invención puede incluir vehículos, excipientes, o diluyentes convencionales aceptables para uso farmacéutico. La cantidad de monoacetildiacilglicerol en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, sin limitación específica, y específicamente es de 0,0001 a 100% en peso, con preferencia, de 0,001 a 50% en peso, con mayor preferencia de

0,01 a 20% en peso, con respecto a la cantidad total de la composición.

La composición farmacéutica se puede formular en forma sólida, líquida, en gel o suspensión para la administración oral o no oral, por ejemplo, comprimido, bolo, polvo, gránulo, cápsula tal como una cápsula dura o blanda de gelatina, emulsión, suspensión, jarabe, concentrado emulsionable, solución acuosa esterilizada, solución no acuosa, formulación liofilizada, supositorio, y etc. En la formulación de la composición, se pueden utilizar excipientes o diluyentes convencionales tal como materiales de relleno, agentes de carga, aglutinantes, agentes humectantes, agentes disgregantes, y agentes tensioactivos. La formulación sólida para la administración oral incluye comprimidos, bolo, polvo, gránulo, cápsula y etc., y la formulación sólida se puede preparar por medio de la mezcla de uno o más de los componentes activos y por lo menos un excipiente tal como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa, gelatina, y etc. Además del excipiente, también se puede utilizar un lubricante tal como estearato de magnesio y talco. La formulación líquida para administración oral incluye emulsión, suspensión, jarabe, y etc., y puede incluir diluyentes convencionales tal como agua y parafina líquida o puede incluir diversos excipientes tal como agentes humectantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, y agentes conservantes. La formulación para la administración no oral incluye solución acuosa esterilizada, solución no acuosa, formulación liofilizada, supositorio, y etc., y el disolvente para una solución de este tipo puede incluir propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tal como aceite de oliva, y éster para la inyección con una jeringa, tal como oleato de etilo. Los materiales de base del supositorio pueden incluir Witepsol, Macrogol, Tween 61, manteca de cacao, Laurin y glicerogelatina.

El compuesto de monoacetildiacilglicerol se puede administrar en una cantidad eficaz para uso farmacéutico. El término "cantidad eficaz para uso farmacéutico" se utiliza para referirse a una cantidad que es suficiente para lograr un resultado deseado en un tratamiento médico. La "cantidad eficaz para uso farmacéutico" se puede determinar de acuerdo con la categoría, edad, sexo, gravedad y tipo de enfermedad, actividad del fármaco, sensibilidad al fármaco, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción del individuo y etc. La composición de la presente invención se puede administrar sola o con otros agentes terapéuticos de manera secuencial o simultánea. La composición de la presente invención se puede administrar en una oportunidad o en múltiples oportunidades. La cantidad preferente de la composición de la presente invención puede variar de acuerdo con la afección y el peso del paciente, la gravedad de la enfermedad, el tipo de formulación del fármaco, la vía de administración y el período de tratamiento. Una cantidad total adecuada de administración por 1 día puede determinarse por un médico, y por lo general es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg, con preferencia de aproximadamente 0,05 a 200 mg/kg, con mayor preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg una vez al día o se puede administrar en dosis divididas varias veces al día. La composición de la presente invención se puede administrar a cualquier individuo que requiere la prevención o el tratamiento de la artritis reumatoide. Por ejemplo, la composición de la presente invención se puede administrar no solamente a humanos sino también a animales no humanos (específicamente mamíferos), tal como monos, perros, gatos, conejos, cobayos, ratas, ratones, vacas, ovejas, cerdos, cabras, y etc. La composición de la presente invención se puede administrar por varios procedimientos convencionales, por ejemplo, por administración oral o rectal, o por inyección intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.), intrauterina dural o cerebrovascular.

También se desvelan procedimientos para prevenir o tratar la artritis reumatoide, que comprende administrar una composición que comprende un compuesto de la Fórmula I a un paciente necesitado de dicho tratamiento. El término "paciente necesitado de dicho tratamiento" incluye cualquier animal que incluye el ser humano que sufre de artritis reumatoide o que puede desarrollar artritis reumatoide. La artritis reumatoide se puede tratar o prevenir por medio de la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I a un paciente necesitado de dicho tratamiento. El término "administración" significa introducir la composición farmacéutica de la presente invención a un paciente necesitado de dicho tratamiento por cualquier procedimiento adecuado. La composición de la presente divulgación se puede administrar por medio de diversos procedimientos convencionales, por ejemplo, por administración oral o no oral.

También se desvelan procedimientos para prevenir o evitar la artritis reumatoide, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula I a un paciente necesitado de dicho tratamiento. Una cantidad total adecuada de administración por 1 día puede determinarse por un médico, y por lo general es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg, con preferencia, de aproximadamente 0,05 a 200 mg/kg, con mayor preferencia de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg. La cantidad de administración total por día se puede administrar una vez al día o se puede administrar en dosis divididas varias veces al día. Sin embargo, la cantidad eficaz para uso terapéutico específica del monoacetildiacilglicerol que se administra a un paciente en particular puede variar dependiendo del tipo y grado de la respuesta a ser alcanzada en el tratamiento, la composición específica, que incluyen si otro agente está incluido en la composición, la edad del paciente, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la proporción de composición, el período de tratamiento, otros fármacos utilizados en conjunto en el tratamiento y una variedad de factores muy conocidos en el campo médico.

Efectos técnicos

El monoacetildiacilglicerol de la presente invención es eficaz para inhibir la fosforilación de STAT-3 conocido por ser una diana terapéutica para la artritis reumatoide. Dado que el monoacetildiacilglicerol es un agente terapéutico eficaz sin toxicidad, el monoacetildiacilglicerol puede superar los efectos secundarios de los medicamentos utilizados

actualmente en el tratamiento de la artritis reumatoide. Por lo tanto, el monoacetildiacilglicerol se puede utilizar para prevenir, tratar o mejorar la artritis reumatoide.

Breve descripción de las figuras

5 La Fig. 1 es el resultado del análisis de Western Blot que muestra la inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6 en células U937 con el tratamiento de EC-18 en diferentes concentraciones. En (A), el EC-18 se trata durante 15 minutos. En (B) el EC-18 se trata durante 60 minutos.

La Fig. 2 es el resultado del análisis de Western Blot que muestra la inhibición de la fosforilación de STAT-3 (A) y la fosforilación de STAT-1 (B) inducida por PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) en células NK-92 con el tratamiento de EC-18 en diferentes concentraciones.

10 La Fig. 3 es el resultado de fluorescencia de la luciferasa que representa la actividad de STAT-3 en células A549 (A) y células HepG2 (B).

La Fig. 4 es la medición de la concentración de interleuquina-6 en suero corregida en el día de la extirpación de tejido en el grupo normal, el grupo de control negativo, los grupos de tratamiento con EC-18 y el grupo de control positivo.

15 La Fig. 5 es el puntaje de artritis medido por medio del examen a simple vista en el grupo normal, el grupo de control negativo, los grupos de tratamiento con EC-18 y el grupo de control positivo.

La Fig. 6 es el resultado del puntaje de artritis histopatológica de la articulación de la rodilla en el grupo normal, el grupo de control negativo, los grupos de tratamiento con EC-18 y el grupo de control positivo.

20 Las Figs. 7 y 8 muestran imágenes microscópicas de tejido artrítico teñido en el grupo normal, el grupo de control negativo, los grupos de tratamiento con EC-18 y el grupo de control positivo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada por los ejemplos.

Ejemplo: cultivo de células

25 Se cultivaron líneas celulares humanas NK-92, U937, A549 y HepG2 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD) a 37 °C bajo 5% de CO₂ en condiciones húmedas. Las células NK-92 se cultivaron en medios alfa-MEM (Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) que contienen 10% de Suero Fetal de Ternero (FCS, Hyclone, Logan, UT), 2 mM de L-glutamato, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (Life Technologies). Las células U937, A549 y HepG2 se cultivaron en medio RPMI que contiene 10% de Suero Fetal de Ternero.

30 Ejemplo experimental 1: efecto inhibitorio de EC-18 en la fosforilación de STAT-3 en células U937

35 Las células tratadas en EC-18 y las citoquinas IL-6 se lisaron con tampón de lisis SDS frío [(50 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 0,2 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, 0,1% de SDS, 1 mM de Na₃VO₄, 10 mM de NaF, y Cóctel Inhibidor de Proteínas completo (Roche)] durante 30 minutos en hielo. Después de la lisis celular, la solución acuosa se separó del precipitado insoluble por medio de centrifugación de los lisados de células durante 30 minutos a 13.000 rpm en una centrifugadora de alta velocidad. Después de la cuantificación de proteínas, la solución acuosa se separó en 10 a 12% de SDS-PAGE por medio de electroforesis. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) a 100 V durante 2 horas.

40 Para medir la cantidad de STAT-3 fosforilado, la membrana se incubó con anticuerpo de poli conejo-anti-(STAT-1, STAT-3) o poli conejo-anti-fosfo (STAT-1, STAT-3) (Cell Signaling Technology, EE.UU. (1:1000) como un anticuerpo primario durante 60 minutos a temperatura ambiente. La membrana se incubó con anticuerpo de IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) (1:3000) como un anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. La misma cantidad de las proteínas celulares se confirmó por medio de anticuerpo poli conejo anti-(STAT-1, STAT-3). Después de la incubación con los anticuerpos, la membrana se incubó con solución de ECL (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) y se expuso a una película de rayos X.
45 La cantidad de STAT-3 fosforilado se midió en la banda sobre la película.

El resultado muestra que STAT-3 es fosforilado por el tratamiento de IL-6 y la cantidad de STAT-3 fosforilado disminuye por medio del tratamiento previo del EC-18 de una manera dependiente de la concentración (Fig. 1A). La Fig. 1B muestra que el efecto inhibitorio del EC-18 en la fosforilación de STAT-3 se mantiene después de 1 hora.

Ejemplo experimental 2: efecto inhibitorio de EC-18 en la fosforilación de STAT-3 en las células NK-92

50 Las células tratadas en EC-18 y PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) se lisaron con tampón de lisis SDS frío [(50 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 0,2 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, 0,1% de SDS, 1 mM de Na₃VO₄, 10 mM de

NaF, y Cóctel Inhibidor de Proteínas completo (Roche)] durante 30 minutos en hielo. Después de la lisis celular, la solución acuosa se separó del precipitado insoluble por medio de la centrifugación de los lisados de células durante 30 minutos a 13.000 rpm en una centrifugadora a alta velocidad. Después de la cuantificación de proteínas, la solución acuosa se separó en 10 a 12% de SDS-PAGE por medio de electroforesis. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) a 100 V durante 2 horas.

Para medir la cantidad de STAT-3 y STAT-1 fosforilada, la membrana se incubó con anticuerpo de poli conejo-anti-STAT-3, poli conejo-anti-STAT-1, o poli conejo-anti-fosfo-STAT-3 (Cell Signaling Technology, EE.UU. (1:1000) como un anticuerpo primario durante 60 minutos a temperatura ambiente. La membrana se incubó con anticuerpo de IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) (1:3000) como anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. La misma cantidad de proteínas celulares se confirmó por medio de poli conejo anti-STAT-3. Después de la incubación con los anticuerpos, la membrana se incubó con solución de ECL (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) y se expuso a una película de rayos X. La cantidad de STAT fosforilada se midió en la banda sobre la película.

El resultado muestra que STAT-3 es fosforilado por el tratamiento de IL-6 en las células NK-92 y la cantidad de STAT-3 fosforilado se reduce por el tratamiento previo de EC-18 de una manera dependiente de la concentración (Fig. 2A). En contraste, el resultado muestra que EC-18 no inhibe la fosforilación de STAT-1 (Fig. 2B).

Ejemplo experimental 3: medición del efecto inhibitorio de EC-18 en la fosforilación de STAT-3 por el uso del reportero de luciferasa

El vector pGL4.47 [luc2P / SIE / Hygro] (Promega) que contiene el Elemento Inducible por sis (SIE) al que se une STAT-3 se introdujo en células A549 y células HepG2. La inhibición de la activación de STAT-3 por EC-18 se midió por el tratamiento previo de las células con EC-18 y después por el tratamiento de las células con IL-10.

Después de la interrupción de las células por medio de un tratamiento con tripsina-EDTA, las células A549 y las células HepG2 se dividieron en la placa de cultivo. Por el uso de Reactivo de Transfección Attractene (Qiagen), las células se transfectaron con un vector pGL4.47[luc2P/SIE/Hygro] y se incubaron a 37 °C bajo condiciones de 5% de CO₂ durante un día. Al día siguiente, se recogieron las células de la placa de cultivo y se transfirieron 0,1 ml de las células a una placa de 96 pocillos en una concentración de 5x10⁴ células/pocillo y se incubaron a 37 °C bajo condiciones de 5% de CO₂ durante un día. Al día siguiente, las células se trataron previamente con diferentes concentraciones de EC-18 durante una hora y después se trataron con 10 ng/ml de IL-10. Después de la incubación a 37 °C bajo condiciones de 5% de CO₂ durante 6 horas, se midió la actividad de Luciferasa por el uso de Sistema de Ensayo de Luciferasa ONE-Glo (Promega). Específicamente, se añadieron 0,1 ml de una mezcla 1:1 al Sistema de Ensayo de Luciferasa ONE-Glo y Sustrato a cada pocillo. Después de tres minutos, la fluorescencia se midió por el uso de Lector de Placas Multietiqueta VICTOR X (PerkinElmer) durante 0,5 segundos.

La fluorescencia de luciferasa se reduce en las células tratadas previamente con diferentes concentraciones de EC-18, en comparación con las células tratadas sólo con IL-10, lo que indica una disminución de la actividad STAT-3 en las células tratadas previamente con EC-18 (Fig. 3A y 3B). El resultado muestra que la activación de STAT-3 inducida por IL-10 se reduce por el tratamiento de EC-18 en las células A549 y las células HepG2.

Ejemplo experimental 4: eficacia de EC-18 para el tratamiento de la artritis en un modelo animal

Para un experimento de modelo animal de artritis, se indujo artritis en ratones DBA/1J machos por medio de la administración de colágeno bovino de tipo II a los ratones. La eficacia de EC-18 para tratar (o mejorar) la artritis se evaluó por medio de la administración repetida de EC-18 a los ratones por vía oral. Para la comparación, se administró Remicade (control positivo 1) por vía intraperitoneal y se administró metotrexato (control positivo 2) por vía oral. El experimento incluyó siete grupos: grupo normal (G1), control negativo (G2), 125 mg/kg, 500 mg/kg y 2000 mg/kg de EC-18 (grupos de tratamiento con EC-18, G3, G4, G5), 20 mg/kg de Remicade (control positivo 1, G6) y 2,5 mg/kg de metotrexato (control positivo 2, G7). Cada grupo consiste en 10 ratones. Se administró aceite de oliva al grupo normal (G1) y al grupo de control negativo (G2) como excipiente. En todos los grupos, la administración se llevó a cabo una vez al día durante cinco semanas (un total de 35 administraciones). Se administró Remicade (G6) por vía intraperitoneal, mientras que EC-18, metotrexato y el aceite de oliva se administraron por vía oral a la fuerza. Para todos los grupos excepto el grupo normal (G1), la artritis se indujo por medio de la inmunización de los animales dos veces con colágeno bovino de tipo II y emulsión de adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund. Durante el período de observación, se observaron síntomas comunes de la artritis una vez al día, el peso se midió una vez por semana, la evaluación del puntaje artrítico se llevó a cabo a simple vista dos veces por semana, el grosor de la pata se midió dos veces por semana.

La concentración de IL-6 en suero recogido en el día de la extirpación de tejido se muestra en la Fig. 4. De acuerdo con lo mostrado en la Fig. 4, la concentración de IL-6 era significativamente mayor en el grupo 2 (grupo de control negativo) en el cual la artritis fue inducida por colágeno y la concentración de IL-6 se redujo en los grupos de tratamiento con EC-18 (G3, G4 y G5), similar a los grupos de control positivos (grupo de tratamiento con Remicade y Metotrexato, G6 y G7). La Fig. 5 muestra el puntaje de artritis evaluado por medio de un examen a simple vista. De acuerdo con lo mostrado en la Fig. 5, el puntaje de artritis en los grupos de tratamiento con EC-18 (G3, G4 y G5) se

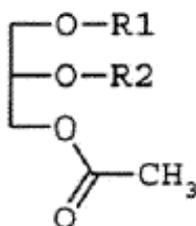
5 redujo de manera significativa, en comparación con el grupo de control negativo (G2). La Fig. 6 muestra el puntaje de artritis medido por medio del examen histopatológico de la articulación de la rodilla extraída de ambas patas traseras. De acuerdo con lo mostrado en la Figura 6, el puntaje de artritis histopatológica es alto en el Grupo 2 (grupo de control negativo) en el que la artritis fue inducida por colágeno y el puntaje se redujo en los grupos de tratamiento con EC-18 (G3, G4 y G5), similar a los grupos de control positivo (grupo de tratamiento con Remicade y Metotrexato, G6 y G7). Las Figs. 7 y 8 muestran las imágenes microscópicas de tejido artrítico teñido del grupo normal (G1), el grupo de control negativo (G2), el grupo de tratamiento con EC-18 de 500 mg/kg (G4) y el grupo de tratamiento con Remicade (G6) (Fig. 7; 40x, Fig. 8: x100). De acuerdo con lo mostrado en la Fig. 7 y 8, el aplastamiento del cartílago y el incremento del pannus se reducen en el grupo de tratamiento con EC-18 (G4) y el grupo de tratamiento con Remicade (G6), en comparación con el grupo de control negativo (G2). Por lo tanto, en este ejemplo, el modelo de artritis se estableció como índices de artritis tal como el puntaje de artritis evaluado a simple vista, el grosor del pie, el nivel de interleucina-6 (IL-6) en suero, la concentración de colágeno IgG anti-tipo II (anti-CII) y el puntaje de artritis histopatológica se incrementan de manera significativa en el grupo de control negativo, en comparación con el grupo normal. Además, los resultados muestran que EC-18 es eficaz en el tratamiento de la artritis.

10
15 A partir de la descripción anterior, aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que los ejemplos descritos con anterioridad están destinados a ser ilustrativos en todos los aspectos y no limitantes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de monoacetildiácilglicerol de la Fórmula 1 como un componente activo para su uso en la prevención o el tratamiento de la artritis reumatoide.

[Fórmula 1]



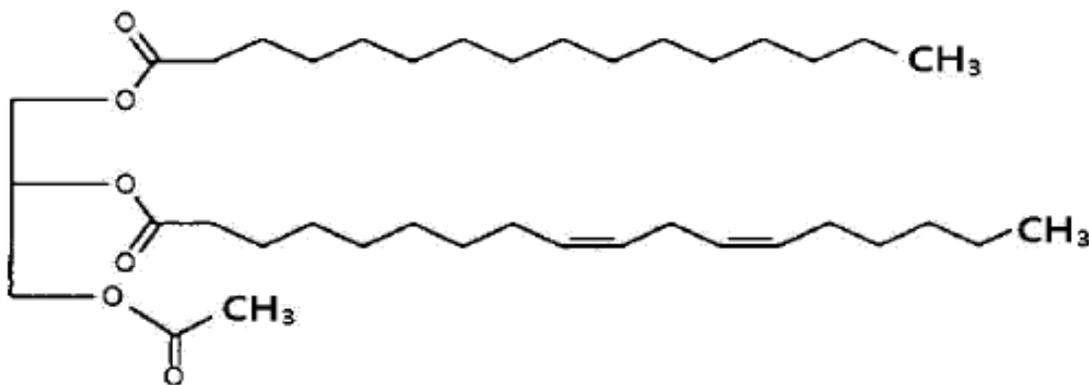
5 en la que R1 y R2 son de manera independiente un residuo de ácido graso de 14 a 20 átomos de carbono; en la que el compuesto de monoacetildiácilglicerol se caracteriza por inhibir la fosforilación de STAT-3.

10 2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que R1 y R2 se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en palmitoilo, oleoilo, linoleoilo, linoleñoilo, estearoilo, miristoilo y araquidonoilo.

3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que R1 y R2 (R1/R2) se selecciona del grupo que consiste en oleoilo/palmitoilo, palmitoilo/oleoilo, palmitoilo/linoleoilo, palmitoilo/linoleñoilo, palmitoilo/araquidonoilo, palmitoilo/estearoilo, palmitoilo/palmitoilo, oleoilo/estearoilo, linoleoilo/palmitoilo, linoleoilo/estearoilo, estearoilo/linoleoilo, estearoilo/oleoilo, miristoilo/linoleoilo, miristoilo/oleoilo.

15 4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el compuesto de la Fórmula 1 es un compuesto de la Fórmula 2:

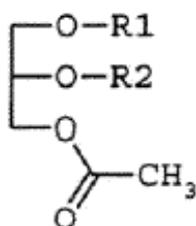
[Fórmula 2]



20 5. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el compuesto de monoacetildiácilglicerol de la Fórmula 1 se separa y se extrae de asta de ciervo natural.

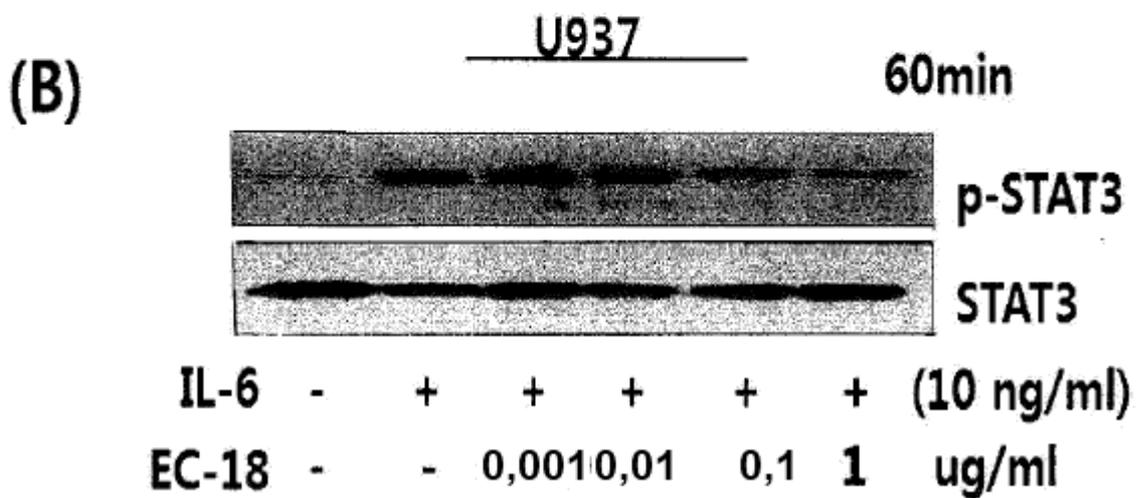
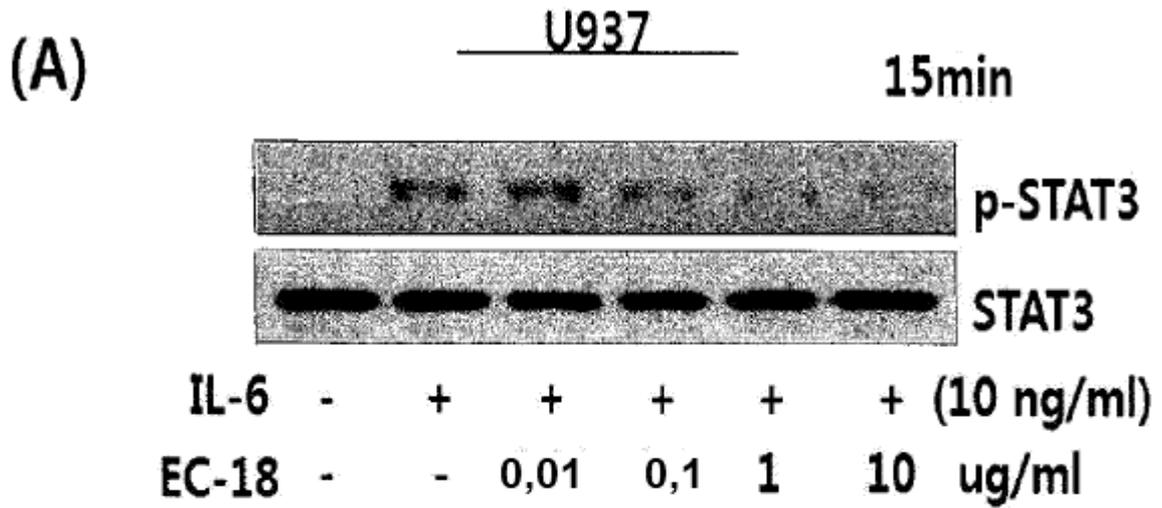
6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición comprende el compuesto de monoacetildiácilglicerol de la Fórmula 1 en una cantidad de 0,001 a 50% en peso de la composición.

[Fórmula I]

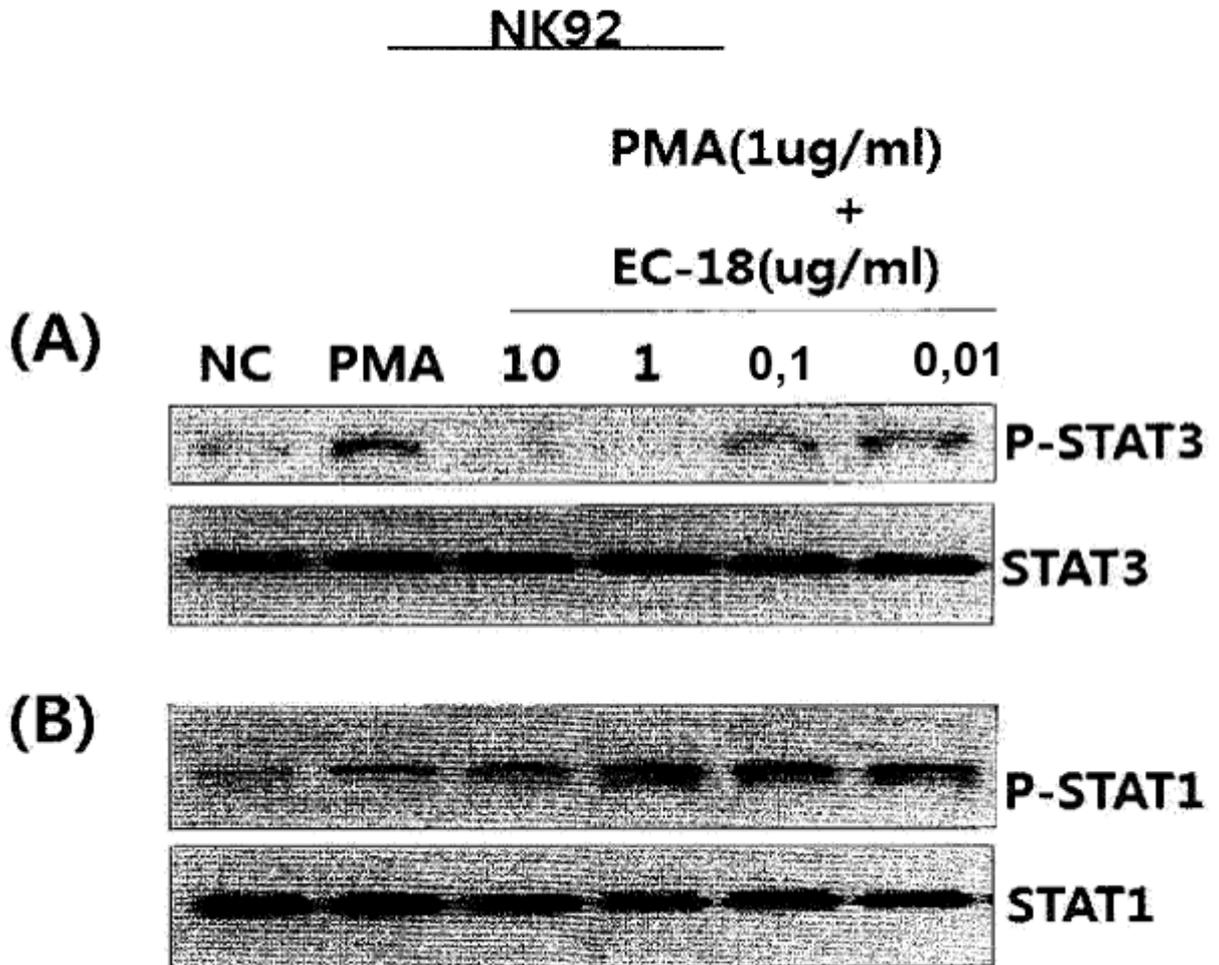


25 en la que R1 y R2 son de manera independiente un residuo de ácido graso de 14 a 20 átomos de carbono.

【FIG. 1】



【FIG. 2】

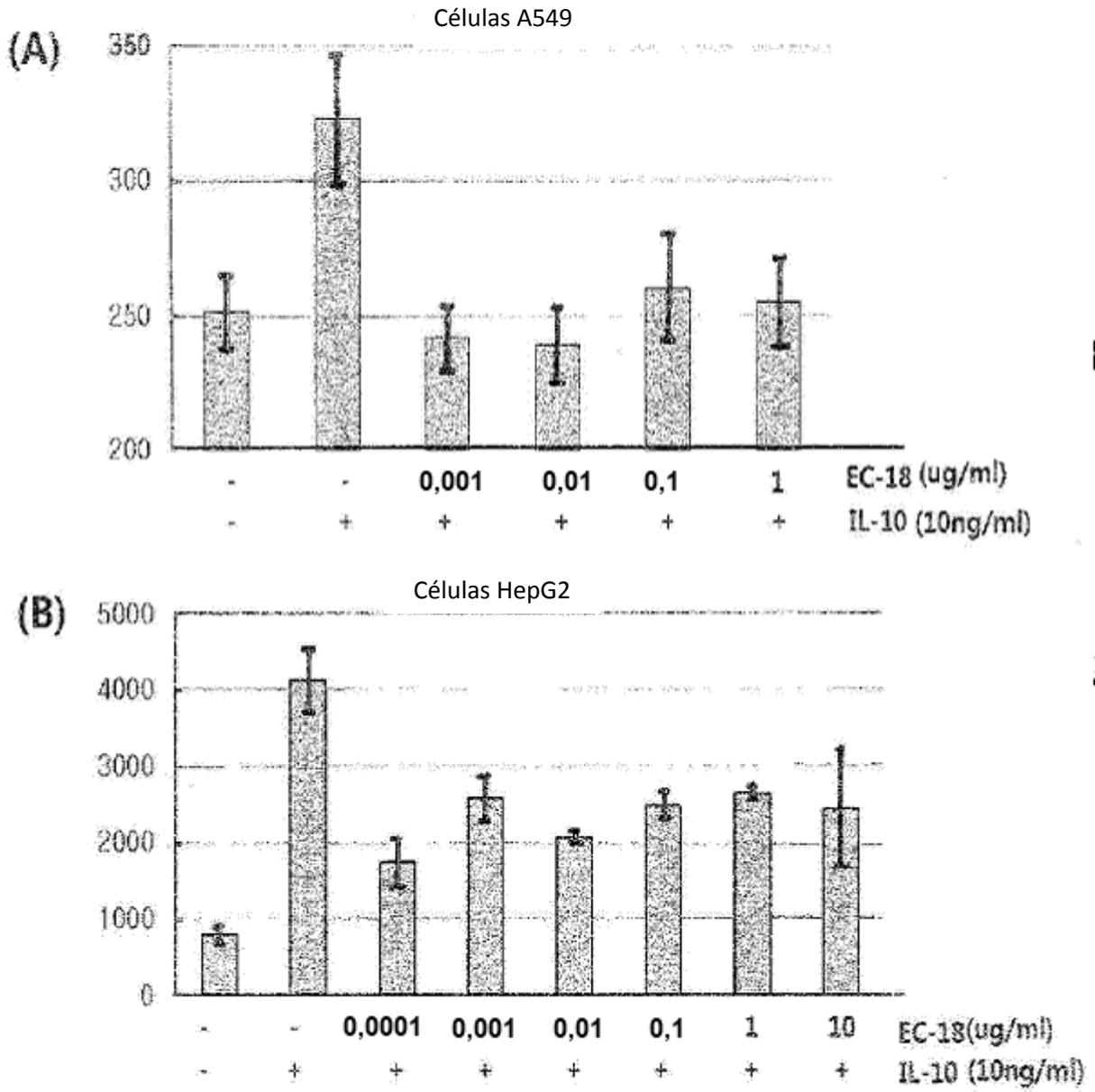


<Western Blot>

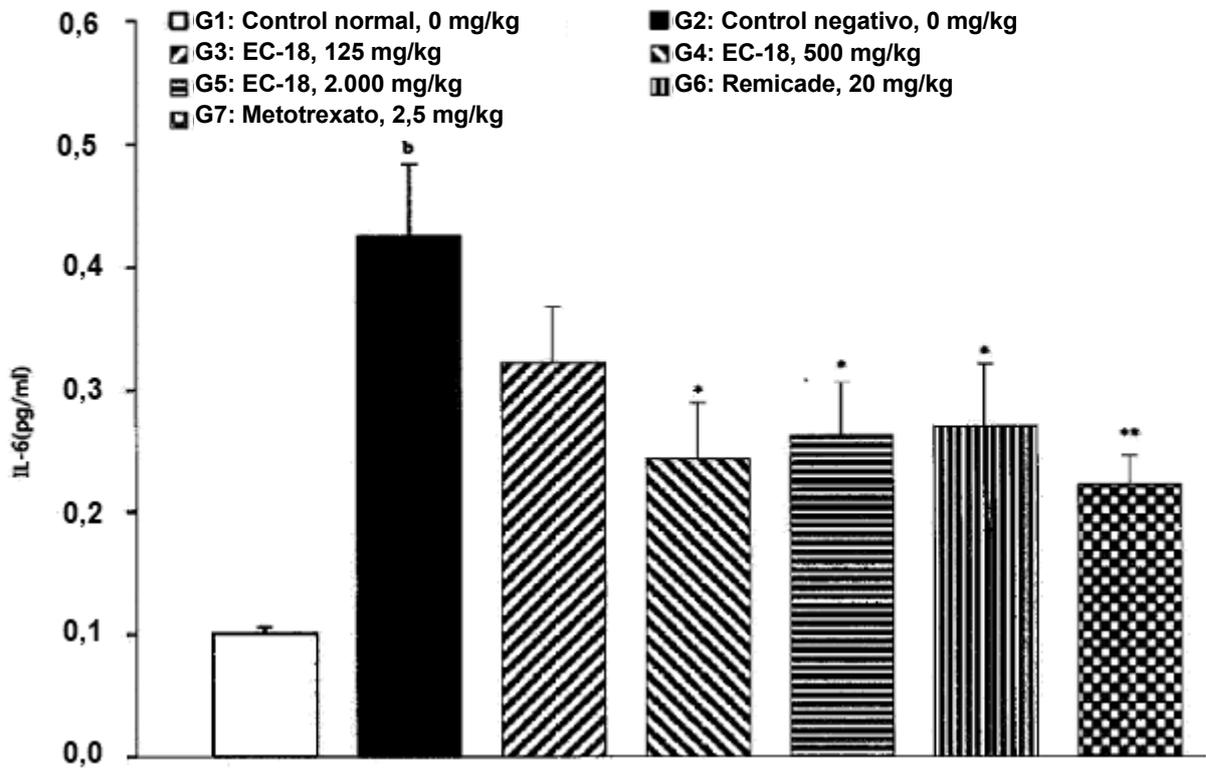
NC: control negativo

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

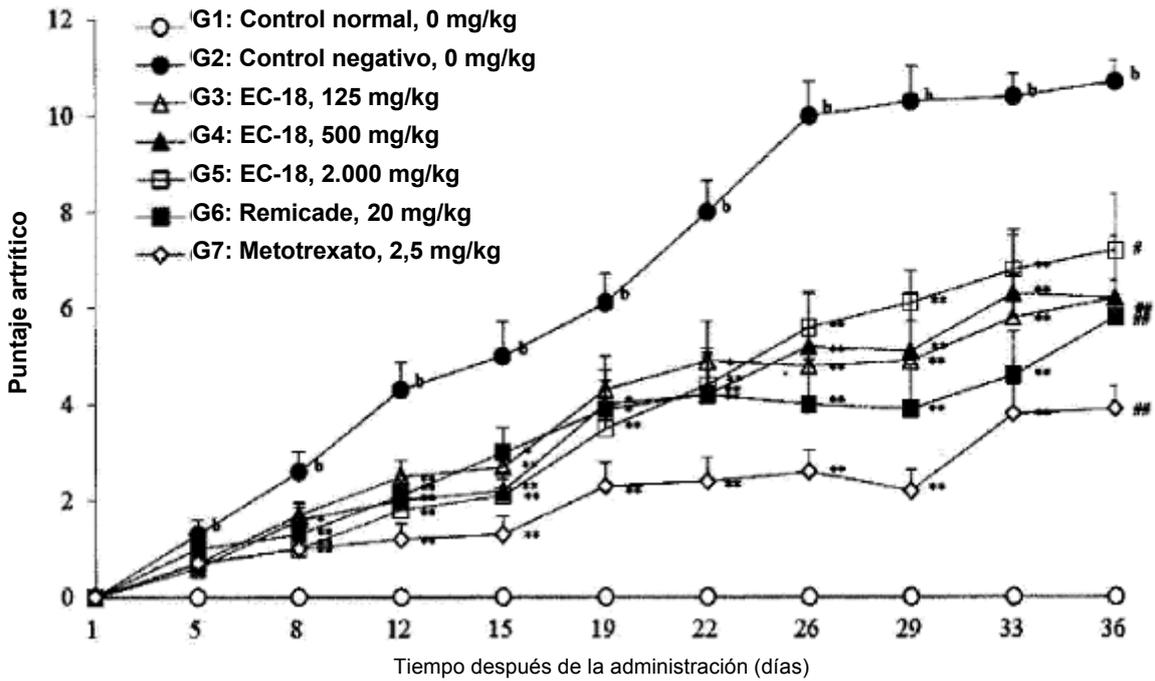
[FIG. 3]



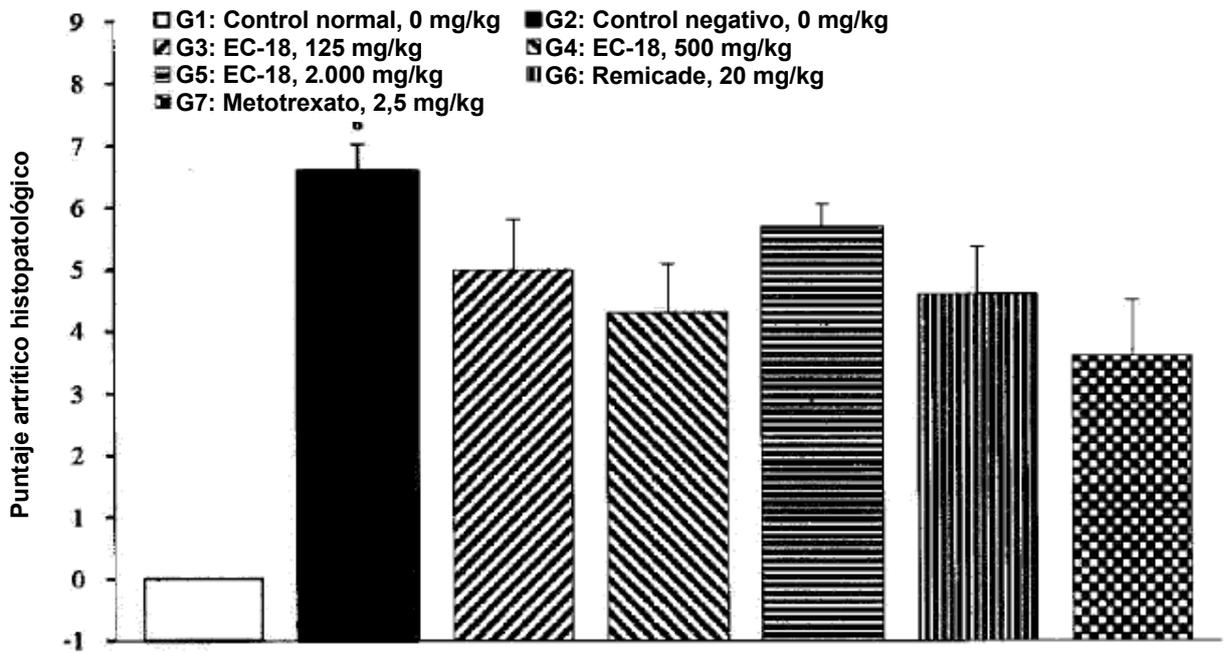
[FIG. 4]



[FIG. 5]



【FIG. 6】



【FIG. 7】

A) Normal



B) Control negativo



C) EC-18 (500mg/kg)



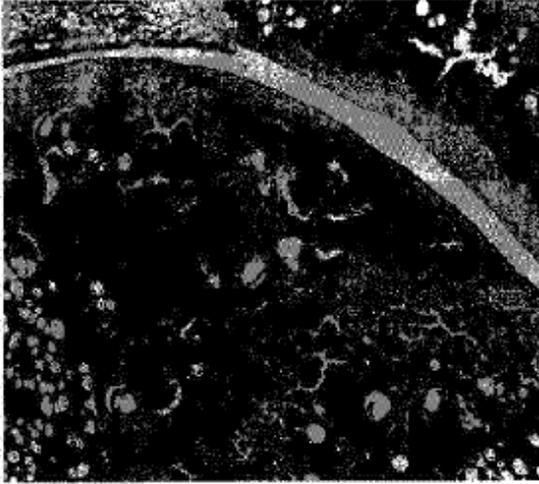
D) Remicade (20mg/kg)



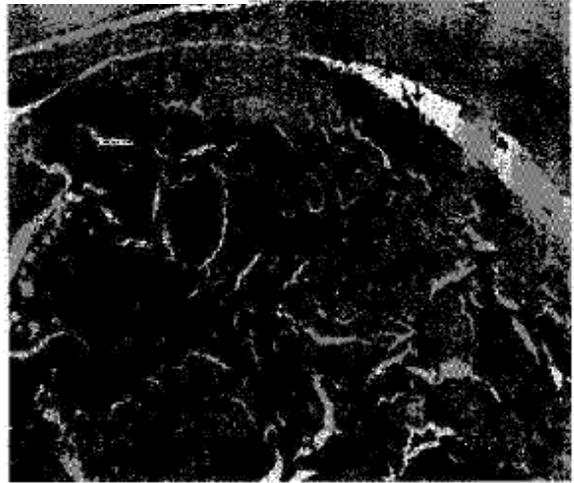
C: cartílago, S: membrana sinovial, TB: hueso trabecular, CB: hueso compacto, BM: médula ósea, GP: placa de crecimiento, asterisco (*): Pannus

【FIG. 8】

A) Normal



B) Control negativo



C) EC-18 (500mg/kg)



D) Remicade (20mg/kg)



C: cartílago, S: membrana sinovial, TB: hueso trabecular. BM: médula ósea, GP: placa de crecimiento, asterisco (*): Pannus, Flecha (↓): Destrucción del cartílago articular y erosión ósea, asterisco (*): Pannus