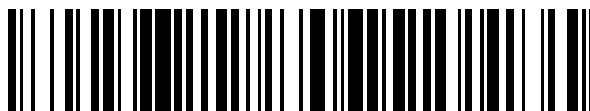


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 850**

51 Int. Cl.:

A61K 35/60 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/JP2013/070134**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14017570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13823573 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2878302**

54 Título: **Composición para prevenir o tratar la osteoartritis**

30 Prioridad:

25.07.2012 JP 2012164723

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2020

73 Titular/es:

**HIROSAKI UNIVERSITY (33.3%)
1, Bunkyo-cho
Hirosaki-shi, Aomori 036-8560, JP;
Wakitani Medical Science Corporation (33.3%) y
SUNSTAR INC. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**KATO, YOJI;
WAKITANI, SHIGEYUKI;
HANADA, YUKAKO y
YAMAMOTO, KAZUSHI**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 769 850 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para prevenir o tratar la osteoartritis.

- 5 La presente invención se refiere a una composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis.

10 La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular asociada con la artritis crónica, y es una enfermedad en la que la degeneración de los componentes articulares provoca la destrucción del cartílago y el cambio proliferativo de hueso y cartílago. En particular, el número de pacientes con osteoartritis de rodilla diagnosticados mediante un examen de rayos X es de aproximadamente 25 millones y, de estos pacientes, se estima que ocho millones o más experimentan dolor.

15 A pesar de estas circunstancias, solo los tratamientos sintomáticos tales como analgésicos y una inyección intraarticular directa de ácido hialurónico se encuentran disponibles actualmente para la osteoartritis. Detener el desarrollo de la osteoartritis es prácticamente imposible. Cuando sus síntomas se agravan, la cirugía es el único procedimiento de tratamiento. En dichas circunstancias, existe una gran necesidad de un agente terapéutico o un procedimiento terapéutico eficaz.

20 En este contexto, el documento EP 2 455 097 A1 describe la aplicabilidad de proteoglucano de cartílago nasal de salmón para el dolor artrítico y el metabolismo del cartílago. Además, Sashinami *et al.* (Sashinami, H. *et al.*; Biochemical and Biophysical Research Communications, 351; 2006; p. 1005-1010) describe un proteoglucano de cartílago de salmón que modula respuestas de citocinas a *Escherichia coli* en macrófagos de ratón. Además, Mitsui *et al.* (Mitsui, T. *et al.*; Biochemical and Biophysical Research Communications, 402; 2010; p. 209-215) describe un proteoglucano de cartílago de salmón que suprime colitis experimental en ratón mediante la inducción de células T reguladoras Foxp3+. Por último, Takahashi *et al.* (Takahashi, T. *et al.*; Food Style 21, Shokuhin Kagaku Shimbunsha, Food Chemicals Newspaper, 15(10); 2011; P. 52-54) describe la aplicabilidad de un proteoglucano de cartílago nasal de salmón en el dolor artrítico y el metabolismo del cartílago.

30 Literatura de patentes 1: JP2007-262103A
Literatura de patentes 2: JP2009-274955A

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un medio para prevenir o tratar la osteoartritis.

35 En el contexto de la presente invención se ha descubierto inesperadamente que los proteoglucanos de alto peso molecular son eficaces para prevenir o tratar la osteoartritis. Se ha conseguido obtener la presente invención con mejoras adicionales basadas en este hallazgo.

Específicamente, la presente invención comprende las invenciones de los puntos siguientes.

40 Punto 1. Una composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis, que comprende un extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 5,000,000, en la que la cantidad de ácidos urónicos derivados de los proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 5,000,000 representa por lo menos el 30% en masa del contenido total de ácido urónico del extracto de agua de cartílago de pescado, y en el que la cantidad de ácidos urónicos derivados de los proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 1,800,000 representa por lo menos el 50% en masa del contenido total de ácido urónico del extracto de agua de cartílago de pescado, siendo la composición para administración oral.

50 Punto 2. La composición para una utilización según el punto 1, en la que el extracto de agua de cartílago de pescado es un extracto en agua caliente de cartílago de pescado.

55 Punto 3. La composición para una utilización según el punto 1 o el punto 2, en la que el cartílago de pescado es cartílago de salmón o cartílago de trucha.

La composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis según la presente invención puede prevenir o tratar la osteoartritis por medio de su ingesta por vía oral.

Las figuras representan:

60 La figura 1 es una fotografía de un bloque de cartílago nasal de salmón congelado. El bulto dispuesto en el centro del recipiente de plástico es el bloque de cartílago nasal de salmón congelado.

65 La figura 2 representa un cromatograma de cantidad de ácido urónico y un cromatograma de cantidad de proteína a 280 nm de un extracto de agua de cartílago de pescado (producto liofilizado: muestra nº 1) que contiene proteoglucanos de alto peso molecular.

La figura 3 representa un cromatograma de cantidad de ácido urónico y un cromatograma de cantidad de proteína a 280 nm de un producto de proteoglucano disponible comercialmente.

La figura 4 representa una visión general del programa para administrar muestras de ensayo a ratones modelo de osteoartritis.

La figura 5 representa unas imágenes teñidas con safranina O de articulaciones de rodilla de ratones modelo de osteoartritis a los que se administraron muestras de ensayo.

La figura 6a es un gráfico que muestra los resultados del análisis de un ensayo de "Safranina O" mediante la puntuación de Mankin modificada en los ratones modelo de osteoartritis a los que se administraron las muestras de ensayo por vía oral.

La figura 6b es un gráfico que muestra los resultados del análisis de un ensayo de "Condrocitos" (recuento de condrocitos) mediante la puntuación de Mankin modificada en los ratones modelo de osteoartritis a los que se administraron las muestras de ensayo por vía oral.

La figura 6c es un gráfico que muestra los resultados del análisis de un ensayo de "Estructura" (estructura superficial de condrocitos) mediante la puntuación de Mankin modificada en los ratones modelo de osteoartritis a los que se administraron las muestras de ensayo por vía oral.

La figura 6d es un gráfico que muestra los resultados del análisis de la suma de las puntuaciones de "Safranina O", "Condrocito" (recuento de condrocitos) y "Estructura" (estructura superficial de condrocitos) mediante la puntuación de Mankin modificada en los ratones modelo de osteoartritis a los que se administraron las muestras de ensayo por vía oral.

Los proteoglucanos son compuestos que contienen glucosaminoglucanos (mucopolisacáridos) unidos a proteínas. Los glicosaminoglucanos son sacáridos ácidos que comprenden unidades de repetición de disacárido, y los ejemplos incluyen sulfato de condroitina, sulfato de dermatán y sulfato de heparán. En las unidades de repetición de disacárido de estos componentes de sacárido ácidos, uno de los sacáridos es un amino-azúcar y el otro es un ácido urónico. En consecuencia, la detección de proteoglucanos se puede realizar utilizando el procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico, que es un procedimiento conocido para detectar ácidos urónicos.

Además, los compuestos en los que los glicosaminoglucanos están unidos en una estructura en forma de peine a las proteínas se denominan monómeros de proteoglucanos (las proteínas en monómeros de proteoglucanos se denominan proteínas centrales). En particular, en un cuerpo vivo, se considera que dichos monómeros de proteoglucanos se unen a ácidos hialurónicos a través de proteínas de enlace para formar agregados. Los agregados asimismo se denominan agregados de proteoglucanos. El término "proteoglucano" utilizado en la presente memoria descriptiva comprende monómeros de proteoglucano y agregados de proteoglucano. El ácido hialurónico es un tipo de glicosaminoglucano.

La composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis según la presente invención comprende un extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos de alto peso molecular.

El extracto de agua de cartílago de pescado contenido en la composición para su uso en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis descrito en la presente memoria contiene proteoglucanos de alto peso molecular. La expresión "proteoglucanos de alto peso molecular" que se utiliza en la presente memoria se refiere específicamente a proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 1,800,000, preferentemente pesos moleculares no inferiores a 2,500,000, no inferiores a 3,000,000, no inferiores a 4,000,000, no inferiores a 5,000,000, no inferiores a 6,000,000, no inferiores a 7,000,000, no inferiores a 8,000,000, no inferiores a 9,000,000, no inferiores a 10,000,000, no inferiores a 11,000,000, no inferiores a 12,000,000, no inferiores a 13,00,000, no inferiores a 14,000,000, no inferiores a 15,000,000, no inferiores a 16,000,000, no inferiores a 17,000,000, no inferiores a 18,000,000, no inferiores a 19,000,000, o no inferiores a 20,000,000. Se prefiere un peso molecular superior. Los proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 5,000,000 son particularmente preferidos. La existencia de proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a un valor específico tal como se ha descrito anteriormente puede confirmarse sometiendo el extracto de agua de cartílago de pescado a cromatografía de filtración en gel en las condiciones siguientes, determinando la cantidad de ácidos urónicos (que refleja la cantidad de proteoglucanos) en cada fracción utilizando el procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico y creando un cromatograma basado en la cantidad determinada de ácido urónico. Este cromatograma basado en la cantidad de ácido urónico puede denominarse en adelante "cromatograma de cantidad de ácido urónico". Además, asimismo se puede crear un cromatograma basado en la absorbancia midiendo la absorbancia de cada fracción a 280 nm y determinando la cantidad relativa de proteína en función de los resultados de medición de la absorbancia (es decir, se asume que el valor medido es un valor que refleja la cantidad de proteína). Este cromatograma puede denominarse en adelante "cromatograma de cantidad de proteína a 280 nm".

Condiciones de cromatografía de filtración en gel

Columna: columna rellena con sefarosa CL-2B (columna de 1 cm de diámetro x 50 cm rellena de sefarosa CL-2B como vehículo). La sefarosa CL-2B presenta un intervalo de fraccionamiento de dextrano de 100 a 20,000 kDa y está disponible de GE Healthcare y otras empresas. La sefarosa CL-2B es una agarosa reticulada al 2% con un tamaño de partícula de 60 a 200 µm (medido mediante el procedimiento de difracción-dispersión láser), y está registrada con el nº de registro CAS 65099-79-8.)

Tampón: tampón de fosfato 0.1 M (pH 7.1, que contiene NaCl 0.2 M) cantidad de muestra aplicada: 4 mg de extracto de agua de cartílago de pescado (sobre una base de masa seca) (disuelto en 1 ml de tampón para su uso)

Caudal: 0.15 ml/min

Cantidad de fracción: 1 ml/tubo

Curva de calibración del peso molecular: varios marcadores de peso molecular de dextrano descritos más adelante se someten a cromatografía de filtración en gel en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. La absorbancia (que refleja la cantidad de dextrano) de cada fracción se mide mediante el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico, que es un procedimiento bien conocido para detectar sacárido, y se determina la fracción en la que se eluye cada marcador para preparar una curva de calibración que refleje el peso molecular de los componentes contenidos en cada fracción en la cromatografía de filtración en gel en las condiciones anteriores. La expresión "fracción en la que se eluye cada marcador" se refiere a una fracción en la que cada marcador es el que más se eluye, es decir, una fracción que corresponde al pico máximo en un cromatograma que refleja la cantidad de dextrano cuando cada marcador de peso molecular de dextrano se somete a filtración en gel.

Marcadores de peso molecular de dextrano

Dextrano de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (peso molecular: 5,000,000 - 40,000,000) (Sigma)	para medir el volumen vacío de la columna, 20,000 kDa
Patrón de dextrano 1,400,000 (Sigma)	1,400 kDa
Patrón de dextrano 670,000 (Sigma)	670 kDa
Patrón de dextrano 410,000 (Sigma)	410 kDa
Patrón de dextrano 270,000 (Sigma)	270 kDa

El dextrano de *Leuconostoc mesenteroides* se utiliza como marcador después de haber sido sometido a un pretratamiento para eliminar el dextrano de bajo peso molecular contenido en el marcador. El pretratamiento se realiza eluyendo dextrano de *Leuconostoc mesenteroides* en las condiciones descritas anteriormente en "condiciones de cromatografía de filtración en gel" para recoger moléculas que presentan un peso molecular no inferior a 20,000 kDa y liofilizándolas. Más específicamente, se prepara un cromatograma que refleja la cantidad de dextrano midiendo la absorbancia de cada fracción mediante el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico, y la fracción correspondiente al primer pico en el cromatograma se recoge y se liofiliza (se considera que, de esta forma, se recogen y se liofilizan moléculas que presentan un peso molecular no inferior a 20,000 kDa). Este liofilizado se utiliza de hecho como marcador (para medir el volumen vacío de la columna).

La medición de la absorbancia para obtener un cromatograma que refleja la cantidad de dextrano se realiza según el procedimiento descrito por Hodge, J.E. y Hofreiter, B.T., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1, 338 (1962) (el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico). Más específicamente, la medición se lleva a cabo de la forma siguiente.

[1] Se disponen 500 µl de una solución acuosa de la muestra en un tubo de ensayo de 105 x 15 mm.

[2] Se añaden 500 µl de un reactivo de fenol (solución acuosa de 5% v/v de fenol) a la misma, y la mezcla se agita.

[3] Se añaden 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado a la misma, y la mezcla se agita inmediatamente de forma vigorosa durante 10 segundos.

[4] La mezcla se deja en reposo durante 20 minutos o más a temperatura ambiente.

[5] Se mide la absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro.

El procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico se refiere a un procedimiento bien conocido que comprende añadir una solución de carbazol, que es un tinte para teñir ácidos urónicos (por ejemplo ácido glucurónico (Glc A) y ácido idurónico), a un espécimen de medición y medir la absorbancia utilizando un espectrofotómetro para determinar la cantidad de ácido urónico en función de la absorbancia. Se prepara una curva de calibración utilizando una solución patrón de ácido glucurónico que presenta una concentración específica, y se determina la cantidad de ácido

glucurónico en el espécimen. Más específicamente, el procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico se realiza de la forma siguiente. Se disponen 2.5 ml de un reactivo obtenido disolviendo 0.95 g de borato de sodio decahidratado en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado en un tubo de ensayo y se enfrían con hielo. Se disponen en capas suavemente sobre los mismos 0.5 ml de una muestra de ensayo (que contiene preferentemente de 2 a 20 µg de ácido urónico) y se agita bien con enfriamiento con hielo para mantener la mezcla resultante por debajo de la temperatura ambiente. Después de cubrir el tubo de ensayo con una bola de vidrio, se realiza un calentamiento en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, seguido de enfriamiento con agua a temperatura ambiente. Se añade al mismo un reactivo obtenido disolviendo 125 mg de carbazol en 100 ml de alcohol metílico anhidro en una cantidad de 0.1 ml y se mezcla. La mezcla se calienta adicionalmente en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Posteriormente, la mezcla se enfría con agua a temperatura ambiente, y se mide la absorbancia a 530 nm. Como blanco, se utilizan 0.5 ml de agua destilada. Simultáneamente, se prepara una curva de calibración utilizando ácido glucurónico. (El procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico se realiza en los ejemplos, más adelante, de la misma forma que anteriormente).

Sobre una base de masa seca, por lo menos el 10% en masa de los ácidos urónicos (determinado mediante el procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico) contenidos en el extracto de agua de cartílago de pescado descrito en la presente memoria se derivan preferentemente de proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 1,800,000. Es decir, el extracto de agua de cartílago de pescado descrito en la presente memoria es preferentemente tal que la cantidad de ácidos urónicos contenidos en los proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 1,800,000 representa por lo menos el 10% en masa del contenido total de ácido urónico del extracto, sobre una base de masa seca. La cantidad de ácidos urónicos derivados de proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 1,800,000 representa más preferentemente no menos del 15% en masa, no menos del 20% en masa, no menos del 25% en masa, no menos del 30% en masa, no menos del 35% en masa, no menos del 40% en masa, no menos del 45% en masa, no menos del 50% en masa o no menos del 55% en masa. Un mayor % en masa es más deseable.

Además, el extracto de agua de cartílago de pescado descrito en la presente memoria es preferentemente tal que la cantidad de ácidos urónicos contenidos en proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 2,500,000 representa por lo menos el 10% en masa del contenido total de ácido urónico del extracto, sobre una base de masa seca. La cantidad de ácidos urónicos derivados de proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 2,500,000 representa más preferentemente no menos del 15% en masa, no menos del 20% en masa, no menos del 25% en masa, no menos del 30% en masa, no menos del 35% en masa, no menos del 40% en masa, no menos del 45% en masa, no menos del 50% en masa, no menos del 55% en masa o no menos del 60% en masa. Un mayor % de masa es más deseable.

Además, el extracto de agua de cartílago de pescado descrito en la presente memoria es preferentemente tal que la cantidad de ácidos urónicos contenidos en proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 5,000,000 representa por lo menos el 10% en masa del contenido total de ácido urónico del extracto, sobre una base de masa seca. La cantidad de ácidos urónicos derivados de proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 5,000,000 representa más preferentemente no menos del 10% en masa, no menos del 13% en masa, no menos del 16% en masa, no menos del 20% en masa, no menos del 24% en masa, no menos del 27% en masa, no menos del 30% en masa, no menos del 34% en masa o no menos del 37% en masa. Un mayor % en masa es más deseable.

La proporción de la cantidad de ácido urónico de los proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a un valor específico (expresado como X en adelante) con respecto al contenido total de ácido urónico del extracto puede determinarse a partir del área del pico del cromatograma de cantidad de ácido urónico mencionado anteriormente. Más específicamente, la proporción puede determinarse calculando la proporción del área de ácidos urónicos que presentan un peso molecular no inferior a X con respecto a la totalidad del área del pico en el cromatograma de cantidad de ácido urónico. Aún más específicamente, la proporción se puede determinar de la forma siguiente. En un cromatograma de cantidad de ácido urónico en el que la cantidad de ácido urónico se representa en la ordenada frente al n° de fracción en la abscisa, se traza una línea vertical de forma que la línea vertical pase a través de la fracción que contiene el proteoglucano que presenta un peso molecular de X. De las dos porciones de pico divididas por la línea vertical, se calcula la proporción del área de la porción del pico que contiene proteoglucanos que presentan pesos moleculares mayores con respecto a la totalidad del área del pico.

Los ácidos urónicos contenidos en el extracto de agua de cartílago de pescado descrito en la presente memoria pueden incluir los contenidos en cadenas de azúcar escindidas de proteoglucanos, así como los contenidos en proteoglucanos.

Además, el contenido de ácido urónico (medido mediante el procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico) del extracto de agua de cartílago de pescado descrito en la presente memoria es, sobre una base de masa seca, preferentemente no inferior al 5% en masa del extracto, más preferentemente no inferior al 7.5% en masa, todavía más preferentemente no inferior al 10% en masa, de forma aún más preferida no inferior al 12.5% en masa, de forma incluso aún más preferida no inferior al 15% en masa, y de forma particularmente preferida no inferior al 17.5% en masa. Cuando la cantidad o el contenido de ácido urónico se expresa en la presente especificación (en

particular, en figuras y tablas), puede utilizarse el término "GlcA", por ejemplo, que es una abreviatura de ácido glucurónico, e indicarse como "GlcA (μg)". Se considera que la mayor parte de los glucosaminoglucanos de proteoglucanos contenidos en el extracto de agua del cartílago de pescado son sulfato de condroitina. Es conocido que se puede obtener una cantidad aproximada de sulfato de condroitina multiplicando la cantidad de ácido urónico por un factor de conversión de 2.593. En consecuencia, se puede calcular una cantidad aproximada de proteoglucanos contenidos en el extracto de agua de cartílago de pescado descrito en la presente memoria multiplicando la cantidad de ácido urónico por un factor de conversión de 2.593.

El extracto de agua de cartílago de pescado descrito en la presente memoria se extrae del cartílago de pescado (cartílago de peces). El tipo de pescado es preferentemente *Oncorhynchus* (*Salmonidae*), que incluye trucha (salmón jorobado, salmón cereza, salmón satsukimasu, etc.), salmón (salmón chum, salmón rojo, salmón plateado, salmón Chinook, trucha arcoiris, etc.), tiburón y bacalao. El salmón y la trucha son particularmente preferidos. El cartílago que se va a utilizar no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere un cartílago de la cabeza, en particular el cartílago nasal. Además, dado que las cabezas de pescado (en particular, salmón y trucha) generalmente se descartan cuando el pescado se transforma en productos alimenticios, el coste de las cabezas de pescado es reducido, y es posible suministrar una gran cantidad de cabezas de pescado de forma estable, lo que representa otra ventaja.

La extracción se realiza utilizando agua. El cartílago de pescado obtenido a partir de una muestra biológica puede someterse directamente a extracción, o después de pulverizarlo (más específicamente, fragmentarlo o convertirlo en polvo). Tal como se describe más adelante, el cartílago de pescado se puede desgrasar utilizando un disolvente orgánico tal como el etanol antes de la extracción. Como tales, los proteoglucanos (incluidos los proteoglucanos de alto peso molecular) se pueden extraer utilizando agua. Alternativamente, la extracción con agua se puede realizar mientras se calienta el agua o utilizando agua caliente o hirviendo, pudiendo obtenerse así de forma eficaz un extracto de agua de cartílago de pescado con un efecto superior.

Tal como se ha descrito anteriormente, como cartílago de pescado, el cartílago obtenido a partir de una muestra biológica puede someterse directamente a extracción. Sin embargo, el cartílago de pescado se mantiene preferentemente congelado hasta que se somete a extracción. El procedimiento de congelación no está particularmente limitado, y se puede utilizar cualquier procedimiento de congelación conocido. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento de almacenamiento de cartílago de pescado en un congelador a aproximadamente -20 a -80°C durante aproximadamente 24 a 72 horas. Asimismo se puede utilizar el cartílago de pescado desgrasado (es decir, el cartílago de pescado del que se han extraído los lípidos). El uso de cartílago de pescado desgrasado es ventajoso porque se puede obtener un extracto de agua de cartílago de pescado muy purificado que contiene menos lípidos. Los ejemplos del procedimiento de desgrasado incluyen el procedimiento para obtener el "cartílago de pescado desgrasado" que se describe más adelante.

Se obtienen trozos pequeños de cartílago de pescado fragmentando el cartílago de pescado en trozos pequeños. La fragmentación puede realizarse utilizando un procedimiento conocido. Por ejemplo, el cartílago de pescado (preferentemente cartílago de pescado congelado) puede fragmentarse en trozos pequeños utilizando un dispositivo conocido, tal como una batidora o un molino. La operación de fragmentación se realiza preferentemente a baja temperatura. Por ejemplo, la fragmentación se realiza preferentemente a una temperatura a la que el cartílago de pescado fragmentado puede mantenerse congelado. Más específicamente, la fragmentación se realiza preferentemente a una temperatura de 0°C o inferior.

Además, en términos de eficacia de la extracción, los trozos pequeños de cartílago de pescado son preferentemente trozos pequeños congelados de cartílago de pescado (trozos pequeños de cartílago de pescado congelados). Los trozos pequeños de cartílago de pescado congelados se pueden obtener (i) congelando el cartílago de pescado, y después fragmentando el cartílago de pescado congelado en trozos pequeños, o (ii) fragmentando el cartílago de pescado en trozos pequeños, y después congelando los trozos pequeños de cartílago de pescado. Los trozos pequeños de cartílago de pescado congelados obtenidos mediante el procedimiento (i) son más preferidos. El procedimiento de congelación no está particularmente limitado, y se puede utilizar cualquier procedimiento de congelación conocido. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento de almacenamiento de cartílago de pescado en un congelador a aproximadamente -20 a -80°C durante aproximadamente 24 a 72 horas.

Los trozos pequeños de cartílago de pescado o los trozos pequeños de cartílago de pescado congelados pesan preferentemente de aproximadamente 0.001 a 0.5 g, más preferentemente de aproximadamente 0.005 a 0.3 g, y de forma aún más preferida de aproximadamente 0.01 a 0.1 g por trozo. La operación de fragmentación se realiza preferentemente de una forma que permita la producción de dichos trozos pequeños (las condiciones para obtener dichos trozos pequeños se pueden obtener fácilmente seleccionando y ajustando apropiadamente el dispositivo que se va a utilizar).

El polvo de cartílago de pescado se obtiene pulverizando cartílago de pescado para proporcionar un polvo (cartílago de pescado en polvo). La pulverización se puede realizar utilizando un procedimiento conocido. Por ejemplo, la pulverización de cartílago de pescado (preferentemente cartílago de pescado congelado) puede realizarse utilizando un dispositivo conocido, tal como una batidora o un molino. La pulverización se realiza

preferentemente a baja temperatura (por ejemplo, no superior a 0°C).

Además, en términos de eficacia de la extracción, se prefiere utilizar polvo congelado de cartílago de pescado (polvo de cartílago de pescado congelado). El polvo de cartílago de pescado congelado puede obtenerse (i') congelando cartílago de pescado y después pulverizando el cartílago de pescado congelado para proporcionar un polvo, o (ii') pulverizando cartílago de pescado para proporcionar un polvo y después congelando el polvo. El polvo de cartílago de pescado congelado obtenido por el procedimiento (i') es más preferido. El procedimiento de congelación no está particularmente limitado, y se puede utilizar cualquier procedimiento de congelación conocido. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento de almacenamiento de cartílago de pescado en un congelador a aproximadamente -20 a -80°C durante aproximadamente 24 a 72 horas.

El término "polvo" se refiere a un trozo más pequeño que al que se refiere con la expresión "trozos pequeños"; sin embargo, estas dos referencias no se distinguen necesariamente de forma nítida. Entre los productos resultantes de la pulverización de cartílago de pescado, los trozos relativamente grandes se denominan "trozos pequeños" y los trozos relativamente pequeños se denominan "polvo". Por lo tanto, aunque no existe una limitación particular, el polvo contiene preferentemente partículas que presentan un tamaño de partícula de aproximadamente 10 a 1,000 µm, preferentemente de aproximadamente 50 a 500 µm, más preferentemente de aproximadamente 100 a 200 µm (medido mediante un procedimiento de difracción y dispersión láser). El polvo contiene preferentemente partículas que presentan el tamaño de partícula anterior en una gran proporción (por ejemplo, no inferior al 50% en masa, preferentemente no inferior al 70% en masa).

Como los trozos pequeños de cartílago de pescado o el polvo de cartílago de pescado, asimismo se puede utilizar cartílago de pescado desgrasado (es decir, trozos de cartílago de pescado o polvo de cartílago de pescado de los que se han eliminado los lípidos). Es decir, asimismo se pueden utilizar trozos de cartílago de pescado desgrasado o polvo de cartílago de pescado desgrasado. Mediante el uso de cartílago de pescado desgrasado se puede obtener un extracto de agua de cartílago de pescado altamente purificado que contiene menos lípidos. Los trozos pequeños de cartílago de pescado desgrasado o el polvo de cartílago de pescado desgrasado pueden obtenerse (α) pulverizando el cartílago de pescado desgrasado en trozos pequeños o polvo, o (β) pulverizando el cartílago de pescado en trozos pequeños o polvo, y después desgrasando los trozos pequeños o el polvo.

El desgrasado puede realizarse mediante un procedimiento conocido. Por ejemplo, la etapa de desgrasado del cartílago de pescado (α) anterior se puede realizar colocando el cartílago de pescado bajo agua corriente (por ejemplo, agua del grifo) durante aproximadamente 1 a 24 horas. La preparación del cartílago de pescado se puede realizar utilizando un procedimiento conocido, tal como un procedimiento que comprende sumergir tejidos de pescado (preferentemente una cabeza de pescado) en agua durante aproximadamente 1 a 24 horas para hinchar los tejidos y retirar otros tejidos que no sean cartílago (preferentemente cartílago nasal) y un procedimiento que comprende descongelar una cabeza de salmón congelado, separar inmediatamente después el cartílago nasal y colocar el cartílago nasal bajo agua corriente durante aproximadamente 1 a 24 horas, lavando y desgrasando así el cartílago. Cuando el cartílago presenta carne residual, la carne se retira preferentemente con pinzas o similares. En este punto, dado que el cartílago de pescado no se ha pulverizado en trozos pequeños o en polvo, es probable que se extraiga poco proteoglicano, incluso si el cartílago se dispone bajo agua corriente. Además, como en la etapa (β) siguiente, los lípidos asimismo se pueden retirar mediante extracción con un disolvente orgánico.

La etapa (β) de desgrasado de los trozos pequeños de cartílago de pescado o el polvo de cartílago de pescado puede realizarse, por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende extraer y retirar lípidos utilizando un disolvente orgánico. Los ejemplos del disolvente orgánico incluyen etanol, hexano y acetona. Más específicamente, como etapa (β), se puede utilizar preferentemente un procedimiento divulgado en el documento JP2009-173702A. Más específicamente, puede utilizarse preferentemente, por ejemplo, el polvo de cartílago de pescado desgrasado que se obtiene mediante un procedimiento que incluye las etapas A a E siguientes (el documento JP2009-173702A asimismo divulga condiciones más detalladas).

A. Se trituran tejidos congelados de animales acuáticos (tejidos de pescado) y se tratan a de 0 a 20°C, pH de 4.8 a 7 después de añadir agua.

B. Una mezcla sólido-líquido obtenida mediante la etapa A se centrifuga para eliminar la capa lipídica superior y la capa acuosa intermedia para recoger un precipitado.

C. El precipitado se seca y se pulveriza proporcionando un polvo fino.

D. Se añade un disolvente, a saber, hexano, acetona o etanol, al polvo fino seco obtenido para extraer y retirar lípidos residuales.

E. Se elimina el disolvente.

Es más preferido utilizar trozos pequeños de cartílago de pescado congelados y desgrasados o polvo de cartílago de pescado (trozos pequeños de cartílago de pescado desgrasados y congelados o polvo de cartílago de pescado

congelado y desgrasado). Estos pueden obtenerse, por ejemplo, congelando el cartílago de pescado desgrasado y pulverizando el cartílago de pescado congelado en trozos pequeños o en polvo.

Estos procedimientos de desgrasado se pueden aplicar no solo a trozos pequeños de cartílago de pescado o polvo de cartílago de pescado, sino asimismo al cartílago obtenido a partir de una muestra biológica.

El cartílago de pescado (incluidos trozos pequeños de cartílago de pescado y polvo de cartílago de pescado, que en adelante se denominará colectivamente "cartílago de pescado fino") se somete a extracción con agua. Los ejemplos de agua utilizada para la extracción con agua (que en adelante se denominará "agua de extracción") incluyen agua Milli-Q, agua destilada, agua desionizada, agua purificada y agua corriente. Además, el pH del agua de extracción es generalmente de aproximadamente 5.5 a 8.0, preferentemente de aproximadamente 6.0 a 7.5, más preferentemente de aproximadamente 6.5 a 7.5. No se prefiere disolver sustancias que cambian mucho el pH, tales como ácidos, álcalis y bases. Si un compuesto ácido tal como un ácido orgánico o un ácido inorgánico, o un compuesto alcalino tal como el hidróxido de sodio, se añade al agua de extracción, se reducen o desaparecen proteoglucanos de alto peso molecular (en particular, proteoglucanos de alto peso molecular que presentan pesos moleculares superiores a 10,000,000). En consecuencia, no se prefiere la adición de compuestos ácidos o compuestos alcalinos. Aunque no se desea una interpretación restrictiva, presumiblemente esto ocurre porque los compuestos ácidos y los compuestos alcalinos causan la degradación de los agregados de proteoglucanos durante la extracción.

El extracto de agua se puede obtener, por ejemplo, sumergiendo el cartílago de pescado en agua durante un período de tiempo apropiado (por ejemplo, no inferior a 30 minutos, preferentemente de aproximadamente 30 minutos a 24 horas, más preferentemente de aproximadamente 1 a 12 horas, todavía más preferentemente de aproximadamente 2 a 6 horas, y de forma aún más preferida de aproximadamente 3 a 4 horas). La cantidad de agua no está particularmente limitada; por ejemplo, la cantidad de agua es una cantidad suficiente para sumergir completamente todos los trozos pequeños de cartílago de pescado o polvo de cartílago de pescado sometido a extracción. La extracción con agua puede realizarse mientras se deja en reposo o mientras se agita. Se prefiere la agitación. La temperatura del agua durante la extracción no está particularmente limitada; sin embargo, la temperatura es preferentemente no inferior 50°C, y más preferentemente no inferior a 70°C. Para garantizar este intervalo de temperatura, el agua puede calentarse durante la extracción o antes de la extracción. La temperatura de calentamiento (es decir, la temperatura del agua utilizada) es preferentemente de aproximadamente 50 a 100°C, más preferentemente de aproximadamente 70 a 100°C, todavía más preferentemente de aproximadamente 80 a 100°C, de forma aún más preferida de aproximadamente 90 a 100°C. El calentamiento puede realizarse a presión aumentada. Dado que el calentamiento puede causar la degradación de los proteoglucanos de alto peso molecular, el agua de extracción calentada puede reemplazarse durante la extracción. El agua de extracción puede reemplazarse, por ejemplo, cada 15 minutos a 4 horas, preferentemente cada 30 minutos a 2 horas, o aproximadamente cada 1 hora. Una forma de realización preferida de la extracción con agua es, por ejemplo, un procedimiento que comprende añadir agua (preferentemente agua calentada) al cartílago de pescado en una cantidad suficiente para sumergir completamente la cantidad total de cartílago de pescado, y dejarlo en reposo o agitarlo durante 3 a 4 horas mientras se calienta. Otra forma de realización preferida es un procedimiento que comprende repetir el proceso siguiente cuatro veces: añadir agua (preferentemente agua calentada) al cartílago de pescado en una cantidad suficiente para sumergir completamente la cantidad total de cartílago de pescado, permitiendo que permanezca durante una hora mientras se calienta, y recoger el agua resultante (en este caso, la extracción con agua se realiza durante 4 horas en total).

Después de la extracción con agua, la porción líquida se recoge para obtener un extracto de agua de cartílago de pescado. La recogida de la porción líquida puede realizarse, por ejemplo, recogiendo el sobrenadante por medio de un tratamiento de centrifugación (por ejemplo, centrifugación a 5000 rpm, 4°C, durante 20 minutos) o un tratamiento de centrifugación continua. El líquido (sobrenadante) puede utilizarse sin modificar como extracto de agua de cartílago de pescado, o puede purificarse adicionalmente mediante un procedimiento conocido (por ejemplo, desgrasado). Alternativamente, el líquido puede concentrarse por destilación a presión reducida o similar. Asimismo es posible secar o pulverizar el líquido según el procedimiento de liofilización o el procedimiento de secado por pulverización.

Por ejemplo, el extracto de agua de cartílago de pescado así obtenido que contiene proteoglucanos de alto peso molecular se utiliza preferentemente como una composición para la prevención o el tratamiento de la osteoartritis.

La composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis según la presente invención comprende un extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos de alto peso molecular. La composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis de la presente invención se utiliza preferentemente en los campos farmacéutico y alimentario.

Cuando la composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis se utiliza en el campo farmacéutico, la composición (en adelante, a veces denominada "composición farmacéutica") puede consistir solo en un extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos de alto peso molecular, o puede contener otros componentes. La composición farmacéutica puede contener bases, vehículos y aditivos

farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, disolventes, edulcorantes, colorantes, correctores, agentes para enmascarar olores, tensioactivos, humectantes, conservantes, ajustadores del pH y espesantes). Dichas bases, vehículos, aditivos, etc., se describen específicamente, por ejemplo, en el Japanese Pharmaceutical Excipients Directory 2007 (Yakuji Nippo Limited), y se pueden utilizar, por ejemplo, los mencionados en el mismo. La composición de la presente invención se puede formar en una forma de preparación, tal como comprimidos, comprimidos recubiertos, polvos, gránulos, gránulos finos, cápsulas, píldoras, líquidos, suspensiones, emulsiones, jaleas, preparados masticables o comprimidos blandos, utilizando un procedimiento conocido.

La cantidad del extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos de alto peso molecular en la composición farmacéutica descrita en la presente memoria no está particularmente limitada, siempre que se proporcionen efectos de prevención o tratamiento de la osteoartritis. La cantidad puede ajustarse adecuadamente según la cantidad de ingesta diaria preferida del extracto de agua de cartílago de pescado. La cantidad es preferentemente de 0.0005 a 100% en masa, más preferentemente de 0.005 a 90% en masa, y todavía más preferentemente de 0.05 a 80% en masa.

El sujeto a quien se va a administrar la composición farmacéutica descrita en la presente memoria es un paciente con osteoartritis. En particular, se prefiere un paciente con gonartrosis. La gravedad de la enfermedad del paciente no está particularmente limitada, y la composición puede administrarse a pacientes en etapa temprana, pacientes en etapa intermedia y pacientes en etapa tardía. Asimismo es posible utilizar preventivamente la composición en personas que presentan un alto riesgo de desarrollar osteoartritis, tales como las personas de edad avanzada.

El momento de administración de la composición farmacéutica no está particularmente limitado, y puede seleccionarse apropiadamente considerando, por ejemplo, la forma de dosificación, la edad del paciente, la gravedad de los síntomas del paciente, etc. El modo de administración es preferentemente la administración oral. Cuando el sujeto objetivo es un paciente a quien la composición farmacéutica es difícil de administrar por vía oral, como un paciente con disfagia, la composición puede alimentarse directamente al estómago a través de un tubo de gastrostomía.

La dosificación de la composición farmacéutica puede seleccionarse adecuadamente según la edad del paciente, la gravedad de los síntomas del paciente y otras condiciones. La cantidad de proteoglucanos de alto peso molecular en la composición farmacéutica se ajusta preferentemente de forma que la cantidad de ingesta diaria por adulto se encuentre dentro del intervalo de 1 a 1,000 mg, y más preferentemente de 10 a 300 mg. La composición farmacéutica puede administrarse una vez al día, o puede administrarse en dosis separadas varias veces (preferentemente 2 a 3 veces) al día.

Cuando la composición para una utilización en la prevención de la osteoartritis de la presente invención se utiliza como aditivo alimentario, la composición (en adelante denominada a veces como "aditivo alimentario") puede consistir solo en un extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos de alto peso molecular, o puede comprender el extracto de agua de cartílago de pescado y otros componentes tales como bases, vehículos, aditivos higiénicamente aceptables para alimentos y otros componentes y materiales que se pueden utilizar como aditivos alimentarios. Los ejemplos de las formas de dichos aditivos alimentarios incluyen, entre otros, líquidos, polvos, copos, gránulos y pastas. Los ejemplos específicos de aditivos alimentarios incluyen condimentos (por ejemplo, salsa de soja, salsa Worcestershire, ketchup y aderezos), copos (*furikake* [mezcla de condimentos para espolvorear sobre arroz cocido]), salsa *yakiniku* [salsa barbacoa de estilo coreano], especias y roux tipo pasta (por ejemplo, roux de curry tipo pasta). Estos aditivos alimentarios pueden prepararse apropiadamente según procedimientos conocidos. La cantidad del extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos de alto peso molecular en el aditivo alimentario descrito en la presente memoria no está particularmente limitada, siempre que se proporcionen efectos de prevención o tratamiento de la osteoartritis. La cantidad es preferentemente de 0.0005 a 100% en masa, más preferentemente de 0.005 a 90% en masa, y todavía más preferentemente de 0.05 a 80% en masa.

El consumo de un alimento que comprende dicho aditivo alimentario da como resultado la ingesta del aditivo alimentario descrito en la presente memoria. El aditivo alimentario puede añadirse a un alimento mientras se cocina o se produce el alimento, o puede añadirse inmediatamente antes o mientras se consume el alimento cocinado. La ingesta oral del aditivo alimentario proporciona de esta forma un efecto preventivo de la osteoartritis. Diversas condiciones, tales como el sujeto que recibe el aditivo alimentario de la presente invención y la cantidad de ingesta de proteoglucanos de alto peso molecular contenidos en el aditivo alimentario, no están particularmente limitadas, pero son preferentemente, por ejemplo, las mismas que las descritas anteriormente para la composición farmacéutica descrita en la presente memoria.

Cuando la composición para su uso en la prevención de la osteoartritis se utiliza como alimento o bebida, la composición (en adelante denominada a veces "alimento o bebida") comprende el extracto de agua de cartílago de pescado y otros componentes, tales como bases, vehículos, aditivos higiénicamente aceptables para alimentos y otros ingredientes y materiales que se pueden utilizar para alimentos. Los ejemplos incluyen alimentos y bebidas que comprenden un extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos de alto peso molecular,

tales como alimentos procesados, bebidas, alimentos saludables (por ejemplo, alimentos con declaraciones de función de nutrientes y alimentos para usos específicos en la salud), suplementos, alimentos médicos (por ejemplo, dietas hospitalarias, dietas para enfermos y alimentos para el cuidado de enfermería) y similares. Los ejemplos incluyen además los producidos formando el extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos de alto peso molecular en un polvo mediante liofilización o secado por pulverización, e incorporando el polvo en diversas bebidas y alimentos, tales como bebidas (por ejemplo, zumos), productos de confitería (por ejemplo, chicles, dulces gomosos, chocolates, galletas, bizcochos, *okaki* (galletas de arroz), *sembei* (galletas de arroz), galletas de arroz, budines, jaleas y *annin tofu* (gelatina de almendras)), panes, sopas (incluidas sopas en polvo) y alimentos procesados.

Cuando el alimento o la bebida descritos en la presente memoria se preparan como alimentos saludables (por ejemplo, alimentos con declaraciones de función de nutrientes y alimentos para uso específico en la salud) o suplementos, las formas preferidas de los mismos son gránulos, cápsulas, píldoras (incluidos, por ejemplo, comprimidos masticables) y bebidas (preparaciones para bebidas) debido a la facilidad de una ingesta continua. Entre las mismas, en términos de facilidad de ingesta, se prefieren formas tales como cápsulas, comprimidos y píldoras, pero no están particularmente limitadas a las mismas. El alimento o la bebida en forma de gránulos, cápsulas, píldoras, o similares, puede prepararse apropiadamente según procedimientos conocidos utilizando vehículos farmacéuticamente y/o higiénicamente aceptables para alimentos o similares. Cuando el alimento o la bebida se conforman en otras formas, asimismo se pueden utilizar procedimientos conocidos.

La cantidad de extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos en el alimento o la bebida descritos en la presente memoria no está particularmente limitada siempre que se proporcione un efecto de prevención de la osteoartritis. La cantidad es preferentemente de 0.0005 a 100% en masa, más preferentemente de 0.005 a 90% en masa, y de forma aún más preferida de 0.05 a 80% en masa.

El alimento o la bebida descritos en la presente memoria se utilizan preferentemente para prevenir la osteoartritis. Diversas condiciones, tales como el sujeto que recibe el alimento o la bebida y la cantidad de ingesta de proteoglucanos de alto peso molecular contenidos en el alimento o la bebida, no están particularmente limitadas, pero son preferentemente las mismas que, por ejemplo, las descritas anteriormente para la composición farmacéutica descrita en la presente memoria.

Las dietas hospitalarias son comidas proporcionadas a personas hospitalizadas. Las dietas para enfermos son comidas para los enfermos. Los alimentos para el cuidado de enfermería son comidas para personas que reciben atención. El alimento o la bebida descritos en la presente memoria se utilizan particularmente como dietas hospitalarias, dietas para enfermos o alimentos para cuidados de enfermería que son para pacientes hospitalizados debido a osteoartritis, pacientes que se recuperan de la misma en el hogar o pacientes que reciben cuidados de enfermería. Las personas que presentan un alto riesgo de desarrollar osteoartritis, tales como las personas de edad avanzada, asimismo pueden ingerir de forma preventiva el alimento o la bebida.

La presente invención proporciona además un procedimiento para prevenir o tratar la osteoartritis, que comprende administrar o hacer ingerir por vía oral la composición para su uso en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis descrita en la presente memoria a pacientes con osteoartritis, o personas que presentan un alto riesgo de desarrollar osteoartritis. Específicamente, estos procedimientos pueden realizarse mediante administración oral o ingesta oral de la composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis descrita en la presente memoria. En este procedimiento, cada una de las condiciones, tales como la administración oral y la cantidad de ingesta, son como se han descrito anteriormente.

Ejemplos

La presente invención se describe con mayor detalle a continuación. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos siguientes.

Preparación de proteoglucanos

Se obtuvo un extracto de agua que contiene proteoglucanos del cartílago nasal de salmón de la forma siguiente. El cartílago nasal de salmón se obtuvo separando el cartílago nasal inmediatamente después de descongelar una cabeza de salmón congelada, disponer el cartílago nasal bajo agua corriente durante 6 horas para lavar y desgrasar el cartílago nasal, retirar trozos de carne y similares con pinzas y lavar el cartílago nasal con agua a mano.

El cartílago nasal de salmón se almacenó y se congeló en un congelador, y el cartílago nasal congelado se utilizó como "bloque de cartílago nasal de salmón congelado". La figura 1 es una fotografía del bloque de cartílago nasal de salmón congelado. El bloque de cartílago nasal de salmón congelado presentaba un tamaño de aproximadamente 2.5 x 1.5 cm a aproximadamente 4.5 x 2 cm, y un peso de aproximadamente 1.71 g a aproximadamente 6.91 g (el peso promedio de 7 bloques era 3.701 g); no obstante, el tamaño y el peso dependen del tamaño de la cabeza de salmón utilizada.

Los proteoglucanos se extrajeron calentando un bloque de cartílago nasal de salmón congelado a 100°C. Específicamente, la extracción se realizó de la forma siguiente. Se añadieron 2,500 ml de agua destilada a un total de aproximadamente 1,000 g de los bloques de cartílago nasal de salmón congelado, y la mezcla resultante se calentó a 100°C durante 3 horas. La mezcla se centrifugó con un separador centrífugo a 8,000 rpm a 4°C durante 30 minutos para eliminar la materia insoluble (residuo) y recoger el sobrenadante. El sobrenadante recogido se filtró con succión utilizando papel de filtro. El filtrado obtenido se liofilizó para obtener un liofilizado que contenía proteoglucanos. El liofilizado se trituró con una fresa, se pulverizó dando un polvo y se sometió al análisis siguiente. Se obtuvieron aproximadamente 65 g de polvo. El polvo liofilizado que contiene proteoglucanos se denomina "muestra nº 1".

Análisis de peso molecular

La muestra nº 1 se separó en fracciones por cromatografía de filtración en gel en las condiciones que se describen a continuación. La cantidad de ácidos urónicos contenidos en cada fracción se cuantificó mediante el procedimiento de carbazol-ácido sulfúrico. Además, se midió la absorbancia a 280 nm de cada fracción, y la absorbancia se definió como un valor que refleja la cantidad de proteína contenida en el mismo. Sobre la base de estos resultados, se extrajo un cromatograma de cantidad de ácido urónico y un cromatograma de cantidad de proteína a 280 nm. La figura 2 representa una superposición del cromatograma de cantidad de ácido urónico y el cromatograma de cantidad de proteína a 280 nm. La cantidad de ácido urónico en la cantidad total de muestra nº 1 (aproximadamente 65 g) fue de aproximadamente 12 g.

La figura 2 representa el cromatograma de cantidad de ácido urónico junto con la posición de cada fracción en la que se eluyó cada marcador de peso molecular. Como la cantidad de cada fracción en la cromatografía de filtración en gel fue de 1 ml/tubo tal como se describe a continuación, el eje horizontal, es decir, "volumen de elución (ml)" de la figura 2 asimismo refleja el nº de fracción.

Condiciones de cromatografía de filtración en gel

Columna: columna rellena de sefarosa CL-2B (columna de 1 cm de diámetro x 50 cm rellena de sefarosa CL-2B como vehículo).

La sefarosa CL-2B presenta un intervalo de fraccionamiento de dextrano de 100 a 20,000 kDa, y está disponible de GE Healthcare y otras empresas.

La sefarosa CL-2B es una agarosa reticulada al 2% con un tamaño de partícula de 60 a 200 µm (medido por el procedimiento de difracción-dispersión láser), y está registrada con el nº de registro CAS 65099-79-8.)

Tampón: tampón de fosfato 0.1 M (pH de 7.1, que contiene NaCl 0.2 M)

Cantidad de muestra aplicada: 1 mg/ml en términos de ácido urónico

Caudal: 0.15 ml/min.

Cantidad de fracción: 1 ml/tubo

Curva analítica de peso molecular: los diversos marcadores de peso molecular de dextrano descritos a continuación se sometieron a cromatografía de filtración en gel en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente (excepto que la cantidad de muestra aplicada fue 1 mg/ml de tampón) y la absorbancia (que refleja la cantidad de dextrano) de cada fracción se midió mediante el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico para preparar una curva de calibración.

Marcadores de peso molecular de dextrano

Dextrano de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (peso molecular: 5,000,000 - 40,000,000) (Sigma)	para medir el volumen vacío de la columna, 20,000 kDa
Patrón de dextrano 1,400,000 (Sigma)	1,400 kDa
Patrón de dextrano 670,000 (Sigma)	670 kDa
Patrón de dextrano 410,000 (Sigma)	410 kDa
Patrón de dextrano 270,000 (Sigma)	270 kDa

El dextrano de *Leuconostoc mesenteroides* se utilizó después de haber sido sometido a un pretratamiento para eliminar el dextrano de bajo peso molecular contenido en el marcador. El pretratamiento se realizó eluyendo el dextrano de *Leuconostoc mesenteroides* en las condiciones descritas anteriormente en "condiciones de cromatografía de filtración en gel" (la cantidad aplicada era la cantidad para el marcador) para recoger moléculas que presentan un peso molecular no inferior a 20,000 kDa y liofilizarlas. Más específicamente, se preparó un

cromatograma que refleja la cantidad de dextrano midiendo la absorbancia de cada fracción mediante el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico. La fracción que correspondía a un primer pico en el cromatograma se recogió y se liofilizó (se consideró que de esta forma se obtuvo dextrano que tenía un peso molecular no inferior a 20,000 kDa). Este liofilizado se utilizó de hecho como marcador (para medir el volumen vacío de la columna).

La medición de la absorbancia para obtener un cromatograma que refleje la cantidad de dextrano se realizó según el procedimiento (el procedimiento de fenol-ácido sulfúrico) descrito por Hodge, J.E. y Hofreiter, B.T., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1, 338 (1962) Más específicamente, la medición se realizó de la forma siguiente.

[1] Se disponen 500 µl de una solución acuosa de la muestra en un tubo de ensayo de 105 x 15 mm.

[2] Se añaden 500 µl de un reactivo de fenol (solución acuosa de 5% v/v de fenol) a la misma, y la mezcla se agita.

[3] Se añaden 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado a la misma, y la mezcla se agita inmediatamente de forma vigorosa durante 10 segundos.

[4] La mezcla se deja en reposo durante 20 minutos o más a temperatura ambiente.

[5] Se mide la absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro.

La curva de calibración obtenida fue ($y = -4.3446 \ln(x) + 56.68$; $R^2 = 0.9823$). A partir del valor de R^2 , se descubrió que el peso molecular y el número de fracción (es decir, el volumen de elución) estaban muy correlacionados.

Tal como se muestra en la figura 2, se descubre que la muestra nº 1 contenía proteoglucanos de alto peso molecular que tenían pesos moleculares no inferiores a 1,800,000 (en particular, un peso molecular no inferior a 5,000,000).

Asimismo se analizó de la misma forma un producto de "proteoglucanos" disponible comercialmente con fines de comparación. La figura 3 representa una superposición de un cromatograma de cantidad de ácido urónico y un cromatograma de cantidad de proteína a 280 nm. En el cromatograma de cantidad de ácido urónico de la figura 3 asimismo se mostró la posición de cada fracción en la que se eluyó cada marcador de peso molecular de dextrano. La curva de calibración obtenida fue ($y = -3.943 \ln(x) + 59.069$; $R^2 = 0.9978$). A partir del valor de R^2 se encontró que el peso molecular y el número de fracción (es decir, el volumen de elución) estaban muy correlacionados. Tal como se representa en la figura 3, el producto de proteoglucanos disponible comercialmente no contiene sustancialmente proteoglucanos que tengan pesos moleculares no inferiores a 1,800,000 y, en particular, no contiene proteoglucanos que tengan pesos moleculares no inferiores a 5,000,000. El producto de proteoglucano disponible comercialmente se denomina en adelante "muestra nº 2".

La proporción de la cantidad de ácido urónico de los proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 1,800,000 en cada una de las muestras 1 y 2, con respecto al contenido total de ácido urónico de toda la muestra, se calculó sobre la base del cromatograma de ácido urónico que se representa en la figura 2 o 3. Más específicamente, la proporción se obtuvo calculando la proporción del área de ácidos urónicos que presenta pesos moleculares no inferiores a 1,800,000 basándose en la totalidad del área del pico en el cromatograma de cantidad de ácido urónico que se muestra en la figura 2 o 3. Aún más específicamente, en el cromatograma de cantidad de ácido urónico, se trazó una línea vertical desde un punto de volumen de elución correspondiente a un peso molecular de 1,800,000 en el cromatograma de cantidad de ácido urónico, y se calculó la relación de las dos áreas del cromatograma dividido por la vertical línea. La proporción de la cantidad de ácido urónico de los proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 5,000,000 en cada una de las muestras nº 1 y 2, con respecto al contenido de ácido urónico de la totalidad de la muestra, asimismo se calculó de forma similar. La tabla 1 representa los resultados.

Tabla 1

Peso molecular	No inferior a 5,000,000 (500×10^4)	No inferior a 1,800,000 (180×10^4)
Muestra nº 1	37.9%	55.8%
Muestra nº 2	0.0%	3.0%

Examen del efecto sobre la osteoartritis

<Producción de ratones modelo>

Se produjeron ratones modelo de osteoartritis de la forma siguiente. Se adquirieron ratones C57bl6 de seis semanas de edad (machos: aproximadamente 20 a 22 g) de Japan SLC, Inc. Se inyectaron por vía subcutánea 0.3 ml de Ketalar (50 mg/ml) y 0.1 ml de Celactal (2%) en un muslo de cada uno de los ratones para disponer a los ratones bajo anestesia general. Los ratones se afeitaron alrededor de las articulaciones de la rodilla y se prepararon

para la cirugía. La pata trasera derecha de los ratones se sometió a transección del ligamento cruzado anterior y meniscectomía medial. Por el contrario, en la pata trasera izquierda de los ratones, se realiza una incisión en la cápsula articular de forma similar a la pata derecha; sin embargo, la piel se suturó sin dañar el ligamento o el menisco para realizar una operación simulada (cirugía simulada). Por lo tanto, se prepararon ratones con deterioro moderado que se sometieron a transección del ligamento cruzado anterior y meniscectomía parcial.

Administración de muestras de ensayo a los ratones modelo

Los ratones se dividieron en cuatro grupos tal como se muestra en la tabla 2 (n = 10). Suponiendo que la cantidad de ingesta diaria de alimento por ratón es de 4 g, cada muestra (muestra nº 1 o 2) se añadió a un alimento general para animales experimentales en una cantidad que se muestra en la tabla 2 para hacer la cantidad total de 4 g. Sin embargo, dado que la muestra nº 2 contenía un excipiente, la muestra nº 2 se añadió en una cantidad tal que el contenido de proteoglucanos de la alimentación fuera de 5 mg (tabla 2).

Tabla 2

Grupo	Contenido
	Muestra de alimento
Grupo 1	0.5 mg de muestra nº 1, 4 g de alimento por día
Grupo 2	5 mg de muestra nº 1, 4 g de alimento por día
Grupo 3	25 mg de muestra nº 1, 4 g de alimento por día
Grupo 4	5 mg de muestra nº 2, 4 g de alimento por día

Después de realizar una cirugía para preparar los ratones modelo anteriores, se realizó un ensayo según el programa siguiente. Específicamente, los alimentos que contienen las muestras se alimentaron a los ratones modelo durante 4 semanas después de la cirugía. Durante el período de alimentación, los ratones se mantuvieron, 5 ratones por jaula, a una temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad del 50-60%, con libre acceso a la alimentación; la actividad no estaba restringida. La cantidad de consumo se midió cuando los alimentos se reemplazaron cada una semana; se estimó la cantidad de ingesta diaria por ratón. La figura 4 representa una descripción general del programa de ensayo. Asimismo se investigó un grupo de control que recibió solo un alimento general para animales de experimentación (CE-2).

Cuatro semanas después de la cirugía, cada ratón se dispuso bajo anestesia (se inyectaron por vía subcutánea 0.3 ml de Ketalar (50 mg/ml) y 0.1 ml de Celactal (2%)) para recoger sangre del corazón y extraer las articulaciones de la rodilla. Después de afeitar a los ratones de la misma forma que para la cirugía, se cortaron cada par de fémur y tibia, se colocaron en la misma dirección, se dispusieron en un paquete de ensayo y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Posteriormente, los huesos se descalcificaron con EDTA (0.5 mol) durante 3 semanas, y los tejidos óseos resultantes se embebieron en parafina para preparar muestras descalcificadas que tenían un espesor de aproximadamente 5 µm. Los especímenes se seccionaron y después se tiñeron con hematoxilina y eosina (tinción con HE), y con safranina O (tinción con safranina O). La safranina O es un colorante básico que se une a los glicosaminoglucanos ácidos para producir un color naranja. Por lo tanto, la safranina O se utiliza como un indicador del tejido del cartílago. Después de la tinción, tres evaluadores calificaron cada grupo en términos de los tres elementos siguientes: "safranina O" (intervalo de tinción; que indica la cantidad de glicosaminoglucanos), "condrocitos" (el número de condrocitos) y "estructura" (estructura de la superficie del cartílago) utilizando la puntuación de Mankin modificada, y evaluaron la lesión del cartílago articular utilizando los valores medios. El análisis estadístico se realizó según el procedimiento de Bonferroni/Dunn para comparaciones múltiples.

La puntuación de Mankin es muy fiable porque 1) se realizan comparaciones con casos humanos y 2) los cambios se examinan a lo largo del tiempo. La puntuación de Mankin se utiliza generalmente como un procedimiento para evaluar la degeneración del cartílago. La tabla 3 muestra los criterios de cada elemento de la puntuación de Mankin modificada utilizada en este análisis.

[Tabla 3]

Tabla 3 Puntuación de Mankin modificada (criterios para la evaluación histológica)

Tinción con Safranina O-fast green

0 = tinción uniforme en todo el cartílago articular

1 = pérdida de tinción en la zona superficial para menos de la mitad de la longitud de la meseta

2 = pérdida de tinción en la zona superficial para la mitad o más de la longitud de la meseta

3 = pérdida de tinción en las zonas superficial y media para menos de la mitad de la longitud de la meseta

4 = pérdida de tinción en las zonas superficial y media para la mitad o más de la longitud de la meseta

5 = pérdida de tinción en las 3 zonas para menos de la mitad de la longitud de la meseta

6 = pérdida de tinción en las 3 zonas para la mitad o más de la longitud de la meseta

Pérdida de condrocitos 0 = sin disminución en las células 1 = disminución mínima en las células 2 = disminución moderada en las células 3 = disminución marcada en las celdas 4 = disminución muy amplia en las células
Estructura 0 = normal 1 = irregularidades en la superficie 2 = 1-3 hendiduras superficiales 3 = > 3 hendiduras superficiales 4 = 1-3 hendiduras que se extienden a la zona media 5 = > 3 hendiduras que se extienden a la zona media 6 = 1-3 hendiduras que se extienden a la zona profunda 7 = > 3 hendiduras que se extienden a la zona profunda 8 = hendiduras que se extienden a cartílago calcificado

<Resultados del análisis>

5 La tabla 4 muestra los resultados de la medición de la cantidad de ingesta de alimento y el peso corporal (valores medios) de cada grupo.

Tabla 4

	Cantidad de ingesta (g/día)	Peso corporal (g) inmediatamente después de la cirugía	Peso corporal (g) cuatro semanas después de la cirugía
Control	3.6	No registrado	No registrado
Grupo 1	5.18	22.59	25.59
Grupo 2	4.93	21.92	25.43
Grupo 3	4.68	20.98	24.25
Grupo 4	4.90	21.14	24.58

10 La figura 5 representa unas imágenes (ejemplos representativos) de cada grupo después de la tinción con safranina O.

15 Las figuras 6a a 6d representan los resultados del análisis de la calificación de cada grupo en términos de los tres elementos anteriores (por tres evaluadores) utilizando la puntuación de Mankin, basándose en las imágenes histológicas. En las figuras 6a a 6d, OA muestra los resultados del control, PG de baja concentración muestra los resultados del grupo 1, PG de concentración intermedia muestra los resultados del grupo 2, PG de alta concentración muestra los resultados del grupo 3 y PG de otra empresa los resultados del grupo 4. La figura 6a muestra los resultados del análisis de "safranina O". La figura 6b representa los resultados del análisis de "condrocitos" (el número de condrocitos). La figura 6c muestra los resultados del análisis de "estructura" (estructura de la superficie del cartílago). La figura 6d muestra los resultados de análisis de la puntuación total de estos tres elementos. La descripción sobre el número n de los ratones en la figura 6a asimismo se aplica a las figuras 6b a 6d.

25 Estos resultados confirmaron que la muestra nº 1 suprimió significativamente el desarrollo de lesión de cartílago de ratones modelo de osteoartritis, mientras que la muestra nº 2 no mostró efectos inhibidores de la lesión de cartílago.

30 Estos resultados muestran que los proteoglucanos que presentan pesos moleculares bajos son ineficaces para la osteoartritis a través de la ingesta oral, mientras que los proteoglucanos que presentan pesos moleculares no inferiores a 1,800,000 (particularmente preferentemente no inferiores a 5,000,000) pueden prevenir o tratar la osteoartritis a través de su ingesta oral.

REIVINDICACIONES

5 1. Composición para una utilización en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis, que comprende un extracto de agua de cartílago de pescado que contiene proteoglucanos que presentan unos pesos moleculares de no menos de 5,000,000,

10 en la que la cantidad de ácidos urónicos derivados de los proteoglucanos que presentan unos pesos moleculares de no menos de 5,000,000 representa por lo menos 30% en masa del contenido de ácido urónico total del extracto de agua de cartílago de pescado, y la cantidad de ácidos urónicos derivados de los proteoglucanos que presentan unos pesos moleculares de no menos de 1,800,000 representa por lo menos 50% en masa del contenido de ácido urónico total del extracto de agua de cartílago de pescado,

en la que la composición es para la administración oral.

15 2. Composición para una utilización según la reivindicación 1, en la que el extracto de agua de cartílago de pescado es un extracto de agua caliente de cartílago de pescado.

3. Composición para una utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que el cartílago de pescado es cartílago de salmón o cartílago de trucha.

Fig. 1

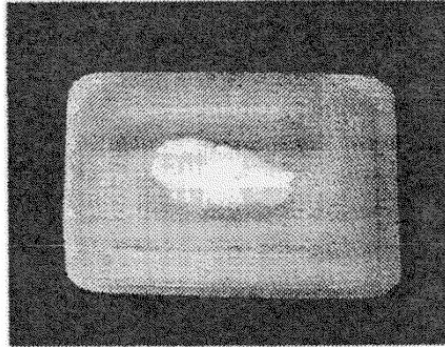


Fig. 2

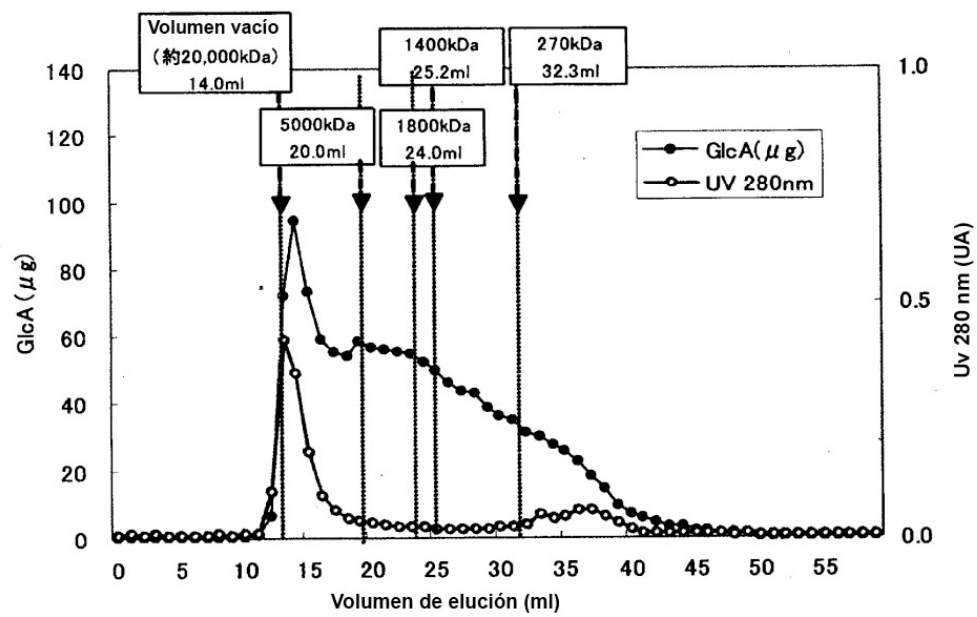


Fig. 3

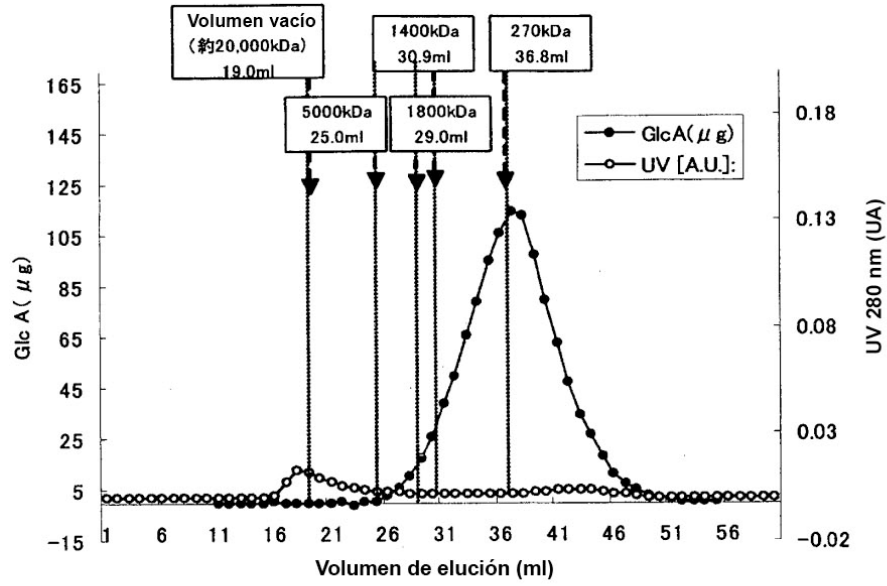


Fig. 4

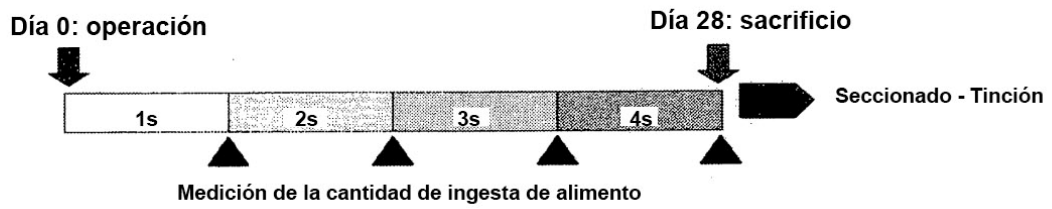


Fig. 5

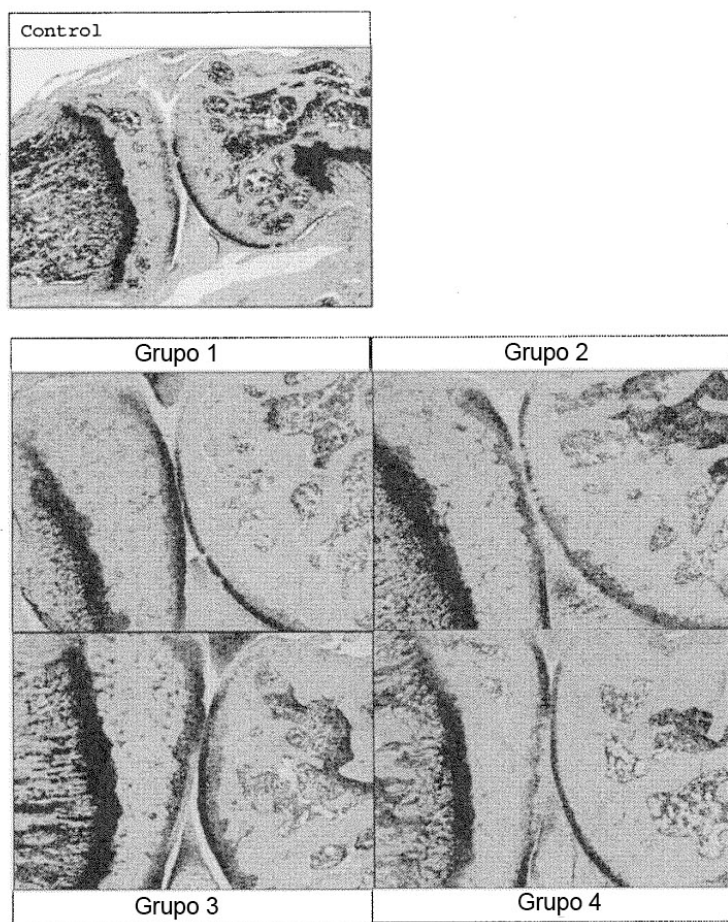


Fig. 6a

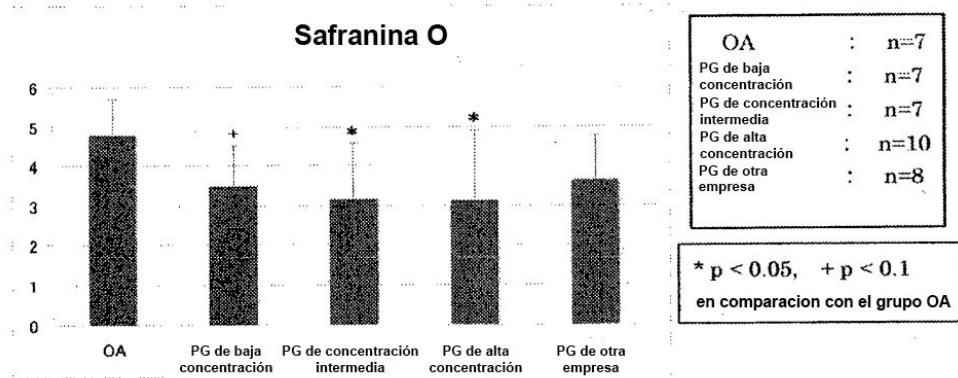


Fig. 6b

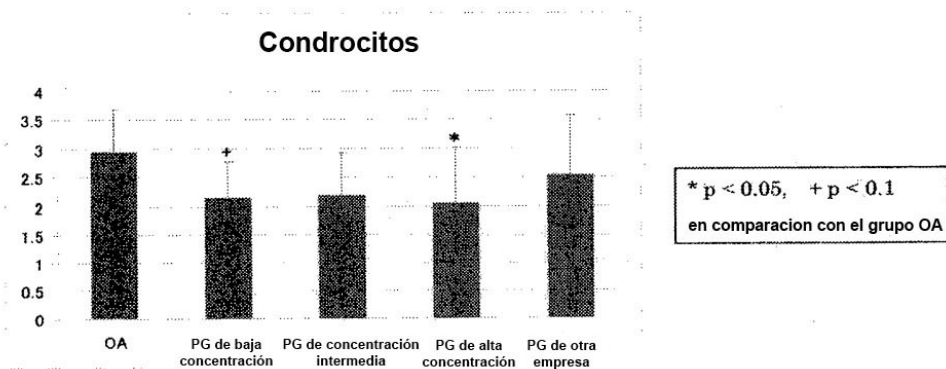


Fig. 6c

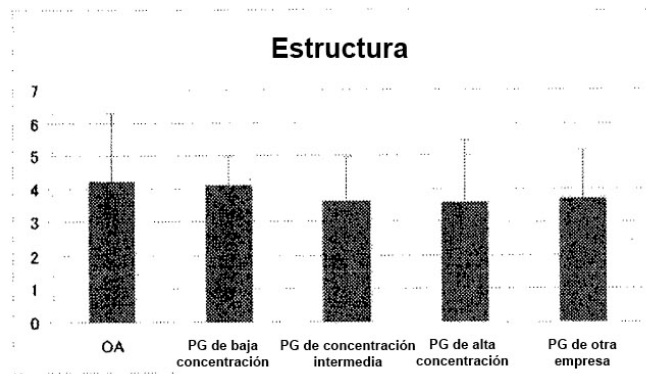


Fig. 6d

