



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 076**

51 Int. Cl.:
A61K 31/737 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05707336 .3**
96 Fecha de presentación : **11.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1917018**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54 Título: **Sulfato de inulina para el tratamiento de la osteoartritis.**

30 Prioridad: **27.02.2004 ES 200400464**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2011

73 Titular/es: **BIOIBERICA, S.A.**
Plaça Francesc Macià, 7
08029 Barcelona, ES

72 Inventor/es: **Verbruggen, August, Lodewijk;**
Ruhi Roura, Ramón;
Vila Pahi, Francisco Javier;
Verges Milano, Josep;
Alaez Verson, Carlos Raúl y
Escaich Ferrer, Josep

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 354 076 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).

DESCRIPCIONSector técnico de la invención

La presente invención se refiere al uso de un polisacárido sulfatado para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la osteoartritis. De igual modo la presente invención se refiere al uso de un oligosacárido sulfatado para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la osteoartritis.

10 Antecedentes de la invención

La osteoartritis, también llamada artrosis, es una enfermedad degenerativa articular que afecta a la mayoría de las personas a partir de los 65 años de edad, y que se caracteriza por una paulatina degradación del tejido cartilaginoso, unido a la presencia de inflamación y dolor. La inflamación se presenta particularmente cuando la enfermedad está en estado avanzado, siendo de diferente naturaleza que la inflamación que se observa en la artritis reumatoide, y generalmente sólo es un componente minoritario en la patología artrósica. La osteoartritis se puede definir como la degeneración del cartílago hialino articular. Secundario a este efecto se produce la afectación de la membrana sinovial y el hueso subcondral, así como la formación de hueso nuevo en los márgenes de las superficies de la articulación. La etiología de la osteoartritis es desconocida y su evolución lenta.

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

Como ayuda para la diagnosis de la osteoartritis se utilizan principalmente dos técnicas: la radiografía, que es el método más sencillo para identificar los cambios óseos de la articulación, y la resonancia magnética nuclear (RMN) que a diferencia de la anterior permite visualizar simultáneamente todos los componentes de la articulación.

En condiciones normales, la renovación del cartílago es un proceso muy lento que consiste en una constante síntesis (anabolismo) y degradación

(catabolismo) de los componentes de la matriz extracelular. El condrocito es la célula responsable de este metabolismo que debe estar coordinado.

En condiciones patológicas, este proceso se altera dado que la renovación del cartílago se acelera conduciendo a una reparación precoz del tejido cartilaginoso causada por un desequilibrio entre el programa anabólico y catabólico del condrocito que conlleva una degradación del cartílago. La reacción de reparación resulta de una hiperproliferación de los condrocitos, conjuntamente con un incremento en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular del cartílago por parte de estas células (D. Hamermam *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 320, 1322-1330 (1989)). Existe, por tanto, un balance entre síntesis y degradación del cartílago que controla dicha reacción homeostática y que depende de hormonas sistémicas y de factores de crecimiento cuyas secreciones disminuyen con la edad. La degradación del cartílago está regulada por enzimas y radicales libres producidos por tejidos adyacentes, pero también por el mismo condrocito.

Resaltaremos los siguientes tratamientos farmacológicos actuales de la osteoartritis:

Sustancias de acción sintomática que actúan de forma rápida como los analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), corticoides e inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2).

Sustancias de acción sintomática que actúan de forma algo más lenta conocidas como SYSADOA (Symptomatic Slow Acting Drug for Osteoarthritis (Fármacos con acción sintomática lenta para el tratamiento de la osteoartritis)) (M.G. Lequesne, *Rev. Rhum. (Eng./Ed.)*, 61, 69-73 (1994)), entre las que se encuentran el ácido hialurónico, el condroitín sulfato y el sulfato de glucosamina. Este grupo se caracteriza por presentar un efecto que se inicia después de 2-3 semanas de tratamiento y persiste de 2 a 6 meses después de cesar su administración.

En la bibliografía se han encontrado documentos acerca de otras aplicaciones de los polisacáridos sulfatados de la presente invención:

R.V. Jones (US 2,686,779) describe un procedimiento para preparar sales de inulina sulfato con metales alcalinos. En dicha patente se resalta que las sales alcalinas de inulina sulfato con diversos grados de sulfatación se han aplicado en la industria química como espesantes para

pastas, adhesivos y como aditivos para fangos utilizados en la perforación de pozos petrolíferos.

Se ha descrito que la inulina sulfato presenta una actividad anticoagulante (*Arkiv for kemi, mineralogi o. geologi*, Bd 24B (5), 1-4 (1946)) y antilipémica (*Arch. Int. Pharmacodyn*, XCIX, 334 (1954)).

V.G. Nair *et al.* (US 4,021,545) dan a conocer que sales de inulina polisulfato (completamente sulfatada) tienen una actividad inhibidora del complemento, por lo que según los inventores podrían utilizarse en el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, ciertos tipos de vasculitis, etc.

G. Franz *et al.* (*Bioactive Carbohydrate Polymers*, 47-58, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000) describen la actividad anticoagulante y antitrombótica del pullulan sulfato.

C.C. Lee (EP 499.164) reivindica, aunque no describe en ningún ejemplo, una composición inyectable que puede contener carragenano para suplementar los fluidos lubricantes naturales. En el citado documento no mencionan el carragenano polisulfato.

T. Kanamaru *et al.* (US 5.135.920) describen que el curdlan sulfato es un agente angiostático. S. Alban *et al.* (*Thromb. Res.* 78 (3), 201-10 (1995)) describen que el mismo compuesto actúa como anticoagulante y antitrombótico.

T. Hata *et al.* (JP 04257509) dan a conocer la aplicación de ácido algínico sulfato como hidratante en preparaciones cosméticas. L. Lange *et al.* (ES 2.064.736) describen la utilización de alginato sulfato para inhibir el colesterol pancreático.

E. Besterman (*Brit. Med. J.*, 310 (1957, I)) describe que el polisacárido laminarina sulfato posee actividad antilipémica. H. Q. Miao *et al.* (*Int. J. Cancer*, 83 (3), 424-31 (1999)) revelan la actividad antimetastática de laminarina sulfato. P. Bohlen *et al.* (WO 03/006645) describen que el polisacárido laminarina sulfato inhibe la actividad heparanasa, la cual, según reivindican, se encuentra asociada, entre otros, a procesos inflamatorios, diabetes o artritis.

L. Lange *et al.* (ES 2.064.736) dan a conocer que el polisacárido pectina sulfato es útil para tratar los niveles elevados de colesterol en sangre.

Hasta el momento no se ha encontrado descrito el uso de inulina sulfato en el tratamiento o profilaxis de la osteoartritis.

Por todo lo dicho se desprende que el proporcionar un fármaco útil en el tratamiento de la osteoartritis, es todavía un problema de la terapéutica.

5

Explicación de la invención

El problema a solucionar por la presente invención es proporcionar polisacáridos sulfatados alternativos para utilizar en el tratamiento o profilaxis de la osteoartritis. La solución que corresponde con el primer aspecto de la invención se refiere al uso de inulina sulfato en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la osteoartritis en un mamífero.

En una realización más preferida la inulina sulfato se encuentra total o parcialmente salificada con un metal alcalino o alcalinotérreo. Preferentemente el metal alcalino es sodio y el polisacárido preferido es inulina sulfato de sodio.

Más preferida es la inulina sulfato de sodio que presenta un grado de sulfatación comprendido entre el 25% y el 62%, sobre base anhidra.

Aún más preferida es la inulina sulfato de sodio que presenta un grado de sulfatación comprendido entre el 55% y el 62%, sobre base anhidra.

En una realización igualmente preferida la inulina sulfato se encuentra parcialmente hidrolizada.

En otra realización igualmente preferida el polisacárido sulfatado es inulina polisulfato, preferentemente inulina polisulfato de sodio.

En una realización especialmente preferida el medicamento se adapta para administración oral.

Igualmente, en una realización especialmente preferida el medicamento se adapta para administración intraarticular.

Los polisacáridos sulfatados de la presente invención son conocidos, y se pueden obtener mediante sulfonación parcial o total de los grupos hidroxilos libres presentes en la estructura de los polisacáridos: inulina, gelano, pullulan, curdlan, ácido algínico, laminarina y pectina.

La sulfonación de un grupo hidroxilo da lugar al correspondiente grupo sulfato.

Cuando en la memoria de la presente invención se habla de grado de sulfatación se refiere al % de grupos sulfatos sobre base anhidra (respecto a la molécula).

Cuando en la memoria de la presente invención se habla de polisacáridos sulfatados se refiere a un polisacárido sulfatado con cualquier grado de sulfatación. A un polisacárido sulfatado con un elevado grado de sulfatación, en la literatura se tiende a denominarlo polisacárido polisulfatado, y por supuesto, cuando el polisacárido está totalmente sulfatado también se le denomina polisacárido polisulfatado. Así pues, en la presente invención está incluido el polisacárido polisulfatado, en concreto, inulina polisulfato.

Los polisacáridos sulfatados se pueden obtener por sulfonación parcial o total de los hidroxilos libres de los polisacáridos comerciales citados anteriormente, utilizando procedimientos descritos en la literatura, como por ejemplo mediante ácido clorosulfónico/piridina (T. Astrup *et al.*, *Acta Physiol. Scand.*, 8, 215-226 (1944)), o bien con ácido clorosulfónico/dimetilformamida (P.Vongchan, *Carbohydrate Research*, 337, 1239-1242 (2002)), o bien utilizando ácido piperidina-*N*-sulfónico (N. Kinzo *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 21, 420-426 (1972)), o bien empleando el complejo trióxido de azufre-piridina (C. Mähner *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 331, 203-208 (2001)).

Para obtener diferentes grados de sulfatación se pueden modificar los procedimientos citados anteriormente (variar la concentración de los reactivos, temperatura de reacción, tiempos de reacción etc...). También, si se desea, se pueden sulfonar selectivamente diferentes hidroxilos del polisacárido, mediante protección/desprotección de los hidroxilos del polisacárido.

Si el polisacárido de partida tiene un peso molecular medio demasiado elevado, si se desea, se puede hidrolizar parcialmente antes o después de la sulfonación.

Los oligosacáridos sulfatados que se utilizan en la invención se pueden obtener mediante hidrólisis enzimática o química (procedimientos bien establecidos en la literatura) del polisacárido comercial, seguido de sulfonación, o bien directamente por hidrólisis enzimática o química del polisacárido sulfatado. También se pueden obtener por síntesis química.

Cuando en la memoria de la presente invención se habla de una sal fisiológicamente aceptable se refiere a una sal de metal alcalino, como por ejemplo sodio o potasio, una sal de metal alcalinotérreo, como por ejemplo

calcio o magnesio, o bien una sal orgánica, como por ejemplo sal con trimetilamina, con trietilamina, o con un aminoácido, como por ejemplo lisina, arginina, prolina, glicina o serina.

La salificación del polisacárido sulfatado se puede llevar a cabo a través de procedimientos químicos sencillos bien conocidos.

Para utilizar en el tratamiento o prevención de la osteoartritis, los polisacáridos sulfatados de la invención, en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, se formulan en composiciones farmacéuticas adecuadas, recurriendo a técnicas y excipientes o vehículos convencionales, como los descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook*, Mack Pub. Co., N.Y., USA.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse al paciente en dosis requeridas. La administración de las composiciones puede efectuarse por diferentes vías, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intraarticular, subcutánea, intramuscular, tópica, sublingual, intradermal o intranasal. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz del polisacárido sulfatado de la presente invención, en forma ácida o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, dependiendo dicha cantidad de muchos factores, como por ejemplo, el estado físico del paciente, edad, sexo, compuesto particular, vía de administración y de otros factores bien conocidos en la técnica. Además, se entenderá que dicha dosificación de compuesto activo puede administrarse en unidades de dosis única o múltiple para proporcionar los efectos terapéuticos deseados. Si se desea, pueden emplearse otros agentes terapéuticos junto con los proporcionados por la presente invención.

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

intraarticular. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

Breve descripción de la figura

5 La Figura 1 representa un Western Blot. La flecha superior indica la zona de agrecano intacto y la flecha inferior indica la zona de fragmentos de agrecano marcados con el anticuerpo NITGE G1. En el primero de los pocillos se sembró una muestra control (sin tratamiento), en el segundo una muestra tratada con interleuquina-1 (IL-1 α), en el tercero una muestra tratada con 100 μ g/mL de
10 inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 y en el cuarto una muestra tratada con IL-1 α y 100 μ g/mL de inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1.

Descripción detallada de la invención

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

Ejemplos Químicos

Ejemplo 1: Preparación de inulina polisulfato de sodio

Ejemplo 1-A: Preparación de la sal inulina polisulfato de sodio utilizando
20 ácido clorosulfónico/piridina

Con agitación constante y a una temperatura < de 6 °C, se añadieron gota a gota 88 mL (1,32 mol; 1,8 eq /OH) de ácido clorosulfónico sobre 580 mL (7,20 mol) de piridina seca. La mezcla resultante se calentó a 75 °C y posteriormente se adicionaron 40 g (0,25 mol) de inulina (Fibruline Standar,
25 comercializada por Trades S.A.). Se continuó la agitación y el calentamiento a 100 °C por espacio de 5 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta aproximadamente 50 °C y se adicionaron 50 mL de agua desionizada para destruir el exceso de ácido clorosulfónico. Durante este paso la temperatura del medio se elevó ligeramente y aparecieron dos fases.

30 El crudo de reacción se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente. La fase superior (piridina) se separó por succión, mientras que la fase inferior oleosa se vertió sobre una solución al 10 % de acetato de sodio en metanol. El precipitado que se formó se dejó sedimentar. El sobrenadante se separó por decantación y se descartó.

El tratamiento con la solución metanólica de acetato de sodio se repitió dos veces y en el último paso el sólido se separó por filtración a vacío con un filtro de profundidad tipo k-100 (Pall Corporation. Seitz-k-100).

5 El filtro obtenido (sólido marrón) se disolvió en agua destilada y la solución resultante se filtró a vacío por un filtro de profundidad k-100 para eliminar restos de materia insoluble procedentes de la reacción.

10 El filtrado procedente del paso anterior era una solución de color ámbar oscuro que se trató con amonio cuaternario (Quartamin). Como consecuencia, se formó un sólido muy abundante que se aisló por filtración a vacío utilizando una pre-capa de tierras Hyflo (100 g). El filtro se lavó abundantemente con agua destilada.

El complejo inulina polisulfato-Quartamin se separó cuidadosamente de las tierras de filtración y se trató con una solución acuosa de NaCl 20 %, a 80 °C, durante dos horas.

15 Transcurridas las dos horas de reacción se detuvo el calentamiento, y cuando la temperatura del medio alcanzó 60 °C se adicionó isopropanol. La agitación se mantuvo por espacio de 30 min. y luego la mezcla se vertió en un embudo de decantación para separar la fase acuosa de la orgánica.

20 La fase orgánica (isopropanol + amonio cuaternario) se desechó. La fase acuosa se filtró a vacío para eliminar los restos de tierras Hyflo.

Sobre la fase acuosa se vertió una mezcla de metanol / acetona. El precipitado marrón que se formó se dejó sedimentar. El sobrenadante se separó por decantación y se desechó. El sedimento se lavó con metanol y posteriormente se disolvió en agua desionizada.

25 El pH de la solución resultante se ajustó entre 10,5-11 con NaOH 10 %. La solución se calentó a 50 °C y se trató durante 15 min. con H₂O₂. Finalmente se detuvo el calentamiento y el pH del medio se ajustó a 5,5 con una solución de ácido acético al 2 %.

30 Cuando la solución decolorada alcanzó la temperatura ambiente, se vertió sobre ella una solución de metanol / acetato de sodio 10 %. Inmediatamente se formó un precipitado blanco o ligeramente amarillo que se dejó sedimentar.

El sobrenadante se separó por decantación y el sedimento se anhidrificó abundantemente con metanol.

La inulina sulfato se separó por filtración a vacío con placa porosa N° 3 y se secó en estufa de vacío a 30 °C hasta que la concentración de metanol fue igual o inferior a 0,3 %.

El producto se obtuvo como un polvo fino, amorfo, de color blanco o ligeramente amarillo.

Determinación del grado de sulfatación (sulfatos orgánicos) de la sal inulina polisulfato de sodio obtenida

Se pesaron exactamente 150 mg de producto, se disolvieron en agua y la solución resultante se llevó hasta 250 mL con el mismo disolvente. Se pipetearon 5 mL de esta solución, se transfirieron a un vaso de precipitados de 50 mL y se añadieron 25 mL de agua. Se valoró fotométricamente a 420 nm con una solución de cloruro de *N*-cetilpiridinio (CPC) al 0,1 % (0,00279 M).

Se calculó el contenido en sulfatos mediante la siguiente ecuación:

$$\%SO_4 = \frac{V \times 0,00279 \times 96 \times 100}{\frac{5 \times (100 - PPS) \times P}{250 \times 100}} = \frac{13,392 \times V \times 100}{\frac{100 - PPS}{100} \times P}$$

Donde:

V: Volumen consumido de la solución de CPC 0,1% en mL.

P: Peso de muestra en mg.

PPS: Pérdida de peso por desecación del producto (105 °C, 4 h) en %.

Grado de sulfatación obtenido: 58,0% expresado sobre base anhidra, lo cual corresponde a una molécula de inulina completamente sulfatada (sulfonación de todos los hidroxilos)

Piridina residual libre y en forma de sal: 127 ppm (el límite permitido es 200 ppm)

Sulfatos libres: 0,08%

IR (KBr) cm⁻¹: 2900 (C-O-H), 1247 (S=O), 800 (C-S-O)

Ejemplo 1-B: Preparación de inulina polisulfato de sodio utilizando ácido clorosulfónico/dimetilformamida (DMF)

En un reactor de tres bocas (2 L) provisto de termómetro y dos embudos de adición, se añadieron, bajo corriente de nitrógeno, 1000 mL de DMF seca. El disolvente se enfrió a una temperatura < de 6 °C, y se añadieron gota a gota y con agitación constante 112 mL (1,68 mol; 1,8 eq /OH) de ácido clorosulfónico.

Se dejó que la temperatura del reactor alcanzara los 15 °C, y a continuación se adicionó una solución de 52,6 g de inulina en 400 mL de DMF seca. La reacción se dejó a temperatura ambiente durante un tiempo inferior a 3 h.

5 Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre agua fría. El pH de la solución resultante se aumentó hasta 7-8 con NaOH 30 % y seguidamente la solución se vertió sobre una solución al 10 % de acetato de sodio en metanol. El sólido que precipitó se dejó sedimentar y se separó del sobrenadante.

10 El sólido se separó por filtración a vacío a través de büchner. Se disolvió en 1500 mL de agua de proceso y la solución se trató con 350 mL de amonio cuaternario (Quartamin). El sólido blanco que se formó se aisló filtrando a vacío utilizando una pre-capa de tierras Hyflo (100 g).

El sólido retenido en el filtro, junto con la pre-capa de tierras Hyflo, se trasvasó a un reactor provisto de refrigerante y agitación mecánica, en el que se añadieron 3000 mL de una solución de NaCl al 20 %. La mezcla se agitó a 80 °C durante 6 h y luego se filtró a vacío y en caliente, empleando papel de filtro. El filtrado (A) se guardó, y el sólido retenido en el büchner se trasvasó nuevamente al reactor para repetir el paso de ruptura del complejo exactamente en las mismas condiciones. El filtrado (B) que se obtuvo de esta repetición se mezcló con (A), y el sólido residual se descartó.

20 Sobre la solución obtenida de la unión de los filtrados (A) y (B) se vertieron 3,3 volúmenes de una mezcla metanol / acetona. El sólido que precipitó se dejó sedimentar y se aisló mediante succión del sobrenadante. El sedimento se lavó con metanol, se escurrió a vacío a través de büchner y se disolvió en agua de proceso. Se determinó el contenido de NaCl de esta solución y se ajustó al 10 % (p/V).

Se repitió el paso de precipitación con metanol / acetona y el sólido que se depositó en el fondo del recipiente se disolvió en agua desionizada.

30 La concentración de cloruro de sodio en esta solución se ajustó a un 2 % (p/V) y luego se adicionaron 2 volúmenes de metanol. La mezcla se dejó en reposo. El producto se depositó en el fondo del recipiente. El sobrenadante se separó por succión y el producto se disolvió en agua de proceso para obtener una solución con una concentración aproximada del 5 % (p/V). Esta solución se diafiltró a través de una membrana de celulosa regenerada de MWCO=5.000-

35

1000 Da. El permeado que se generó durante este paso se ensayó periódicamente con AgNO_3 . La diafiltración se consideró finalizada cuando el ensayo de cloruros dió negativo.

La solución diafiltrada se liofilizó. El liofilizado que se obtuvo se molió y se tamizó. La inulina polisulfato de sodio se obtuvo como un polvo amorfo de color blanco o ligeramente amarillo.

Ejemplos farmacológicos

La resistencia del cartílago y su capacidad de reparación está determinada por los proteoglicanos de la matriz extracelular, y especialmente por los agrecanos. La síntesis de estos agrecanos por los condrocitos articulares y su calidad disminuyen con la edad, lo que constituye uno de los factores principales implicados en el desarrollo de la osteoartritis.

Ejemplo 1: Evaluación de los efectos *in vitro* de inulina polisulfato sobre la síntesis de agrecanos extracelulares en un cultivo primario de condrocitos humanos

1A: Niveles de agrecanos determinados mediante la incorporación de ^{35}S

Materiales y métodos

Los condrocitos articulares humanos se aislaron según los métodos descritos por W.T. Green Jr. (*Clin. Orthop.*, 75, 248-260 (1971)) y K.E. Kuettner *et al.* (*J. Cell. Biol.*, 93, 743-750 (1982)).

Estos condrocitos se cultivaron en un gel de agarosa según el método descrito por P.D. Benya *et al.* (*Cell*, 30, 215-224, (1982)), y modificado por G. Verbruggen *et al.* (*Clin. Exp. Rheumatol.*, 8, 371-378 (1990)) y por M. Cornelissen *et al.* (*J. Tiss. Cult. Meth.*, 15, 139-146 (1993)).

La síntesis de agrecanos se determinó mediante la incorporación de ^{35}S , utilizando como precursor radioactivo sulfato de sodio marcado $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$. Después de dos semanas de cultivo, se introdujeron 10 $\mu\text{Ci/mL}$ de precursor radiomarcado en el medio de cultivo durante 48 h, así como también el compuesto a ensayar (inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1) a diferentes concentraciones (0,0, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0 $\mu\text{g/mL}$).

Los ^{35}S agrecanos sintetizados de nuevo se acumularon parcialmente en la matriz de agarosa intercelular o bien se liberaron en el medio de incubación.

Finalizado el periodo de incubación, el gel de agarosa se rompió mecánicamente y después se digirió mediante 3 mL de una solución de agarosa de 50 U/mL en un tampón fosfato 0,067 M de pH 6,0, en presencia de inhibidores de proteinasa.

5 La suspensión así obtenida se centrifugó, el sobrenadante que contenía los ^{35}S agrecanos de la matriz interterritorial, y el medio de incubación que contenía los metabolitos de ^{35}S agrecanos liberados en la matriz extracelular se reunieron posteriormente por cromatografía.

10 El residuo, que contenía los condrocitos y los ^{35}S agrecanos asociados, se trató durante 48 horas con 1 mL de una solución de cloruro de guanidinio 4,0 M en un tampón acetato 0,05 M de pH 5,8 que contenía los inhibidores de proteinasa.

15 El objetivo de esta operación es la extracción de los ^{35}S agrecanos asociados a las células. La solución obtenida se centrifugó para separar las células del sobrenadante que se separó posteriormente por cromatografía. Las operaciones de cromatografía de las diferentes fracciones obtenidas se llevaron a cabo sobre gel de Sephadex G25 en un tampón fosfato pH 6,8 que contenía 0,01 M de Na_2SO_4 , para separar los ^{35}S agrecanos del $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ libre.

20 La radioactividad de cada uno de los eluyentes macromoleculares obtenidos se midió y se relacionó con el número de condrocitos contenidos en el cultivo inicial y se expresó en pg de $^{35}\text{SO}_4$ incorporados en los agrecanos, por millón de condrocitos y por hora.

Resultados

25 Se presentan en las Tablas 1, 2 y 3.

30 Las tablas muestran la eficacia remarcable de la inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1, en la producción total de agrecanos sintetizados de nuevo (Tabla 3). La inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 también es capaz de aumentar la producción de agrecanos tanto en la matriz interterritorial (Tabla 1) como los asociados a las células (Tabla 2).

La actividad óptima se encuentra a una concentración alrededor de 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 1

pg $^{35}\text{S}/10^6$ cels/h	% cambio	% Total	IPS ($\mu\text{g/mL}$)
7.710		67,4	0,0
7.818	1,4	66,2	0,1
12.383	60,6	70,7	0,5
10.887*	41,2*	70,7	1,0
8.340	8,2	67,9	5,0

Cantidad de azufre marcado radioactivamente incorporado en los agregados de la matriz interterritorial, por millón de células y por hora. % Cambio= Porcentaje de cambio respecto al control no tratado (IPS= 0,0 $\mu\text{g/mL}$). % Total= Porcentaje respecto a la cantidad total de agregados. IPS: dosis de inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 añadida. * $p<0,05$ respecto al control no tratado.

5

Tabla 2

pg $^{35}\text{S}/10^6$ cels/h	% cambio	% Total	IPS ($\mu\text{g/mL}$)
2.378		20,9	0,0
2.737	15,1	23,5	0,1
3.064*	28,8*	18,4	0,5
2.662	11,9	17,9	1,0
2.041	14,2	17,4	5,0

Cantidad de azufre marcado radioactivamente incorporado en los agregados de la matriz extracelular asociada a las células, por millón de células y por hora. % Cambio= Porcentaje de cambio respecto al control no tratado (IPS= 0,0 $\mu\text{g/mL}$). % Total= Porcentaje respecto a la cantidad total de agregados. IPS: dosis de inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 añadida. * $p<0,05$ respecto al control no tratado.

10

Tabla 3

pg $^{35}\text{S}/10^6$ cels/h	% cambio	% Total	IPS ($\mu\text{g/mL}$)
11.429		100	0,0
11.756	2,9	100	0,1
17.312*	51,5*	100	0,5
15.281*	33,7*	100	1,0
12.106	3,0	100	5,0

Cantidad total de azufre marcado radioactivamente incorporado en los agregados sintetizados de nuevo, por millón de células y por hora. % Cambio= Porcentaje de cambio respecto al control no tratado (IPS= 0,0 $\mu\text{g/mL}$). % Total= Porcentaje respecto a la cantidad total de agregados. IPS: dosis de inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 añadida. * $p<0,05$ respecto al control no tratado.

15

Ejemplo 1B: Niveles de agrecanos determinados mediante inmunocitoquímica

Materiales y métodos

Los condrocitos articulares humanos se aislaron y se cultivaron según los métodos descritos anteriormente.

La acumulación de agrecanos asociados a los condrocitos se midió, después de una semana de cultivo, mediante la técnica de inmunocitoquímica descrita por L. Wang *et al.* (*Osteoarthritis Cart.*, 9, 248-260 (2001)). Los condrocitos fueron tratados con interleuquina-1 (IL-1) para simular una situación de inflamación y catabolismo. La inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 se adicionó conjuntamente con IL-1.

Finalizado el periodo de incubación, los condrocitos se liberaron del gel de agarosa según el método descrito. Los condrocitos y los agrecanos asociados se estudiaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la parte proteica de los agrecanos.

Resultados

Se presentan en la Tabla 4.

Esta Tabla confirma la eficacia de la inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1 sobre la producción de agrecanos asociados a las células.

Además se puede observar que existe una relación dosis-efecto, ya que a mayor dosis de compuesto se produce un aumento mayor de la producción de agrecanos asociados a las células.

Tabla 4

	Donante M32		Donante F45	
	M±SD	%Cambio	M±SD	%Cambio
Control	18,9±0,2	105,6	36,5±0,2	201,7
IL-1	17,9±0,3	100,0	18,1±0,2	100,0
IL-1+IPS (0,5 □g/mL)	-----	-----	20,4±0,2*	112,7*
IL-1+IPS (1,0 □g/mL)	20,8±1,2*	116,2*	26,6±0,1*	147,0*
IL-1+IPS (2,5 □g/mL)	21,6±1,1*	120,7*	39,0±0,2*	215,5*
IL-1+IPS (5,0 □g/mL)	25,0±1,4*	139,7*	-----	-----
Intensidad de fluorescencia media en los condrocitos después de un marcaje de agrecano con anticuerpos conjugados con fluoresceína. M±SD= media ± desviación estándar. % Cambio= Porcentaje de cambio respecto al grupo tratado con IL-1. IL-1 = Interleuquina-1. IPS= inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1. * p<0,05 respecto al grupo tratado con IL-1.				

Ejemplo 2: Determinación de la capacidad de inulina polisulfato para inhibir la degradación de agrecano inducida con IL-1□

Materiales y métodos

5 Los ensayos se realizaron sobre cultivos de condrocitos de una línea celular de condrosarcoma de rata denominada LTC.

Las células LTC se mantuvieron en cultivo monocapa en medio Gibco DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) (conteniendo 4,5 g/L de glucosa) suplementado con bicarbonato sódico (3,7 g/L), glutamina (2mM), ácido
10 ascórbico (50 mg/L), gentamicina (50 mg/L) y sérum fetal bovino Hyalone (10 %), a pH 7,4.

Los cultivos confluentes de células LTC fueron tripsinizados y se sembraron 40.000 células por 0,5 mL de cultivo en placas de 48 pocillos. Se mantuvieron durante 5 días, tiempo en el cual depositaron 15-30 □g de
15 glicosaminoglicanos (GAG) en cada pocillo.

Se separó el medio, las membranas celulares se lavaron por adición de 5 x 1 mL de medio catabólico {DMEM + 4,5 g/L glucosa suplementada con bicarbonato sódico (3,7 g/L), glutamina (2 mM), y 10 ng/ml de IL-1α (interleuquina-1□) a pH 7,4}. Después, los cultivos fueron mantenidos en 200 □L
20 de este medio, suplementado o no con inulina polisulfato de sodio del Ejemplo Químico 1, durante 4 días sin cambio de medio, a 37 °C.

Para comprobar el efecto de inulina polisulfato de sodio sobre la degradación del agrecano, se realizó un Western Blot.

Para el Western Blot, se añadieron a cada pocillo 20 □L de tris acetato
25 50 mM a pH 7,3. Los cultivos (medio + membrana celular) fueron deglicosilados con 50 mU de condroitinasa ABC a 37 °C durante 4 horas. A continuación se recuperaron las muestras de cada pocillo y se centrifugaron a 1.460 g durante 10 minutos. Se separaron por electroforesis fracciones de sobrenadante de 25 □L (gradiente de gel 8-12 % SDS PAGE) y se analizaron por Western Blot
30 usando anticuerpo anti-agrecano G1. G1 es el producto de la actividad agrecanasa, también verificado por inmunoreactividad con el anticuerpo neo-epítipo-específico anti-NITGE. El antisérum se usó a dilución 1:5.000 y el "peroxidase-conjugated goat anti-(rabbit IgG) (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo peroxidasa conjugado) se detectó con el Kit ECL de Amersham.

Resultados

Se presentan en la Figura 1, donde se representa un Western Blot resultado de los distintos tratamientos aplicados a un cultivo de condrocitos de condrosarcoma de rata. En dicha figura puede observarse como el tratamiento de los condrocitos con IL-1 α provoca un aumento de la degradación de
5 agrecano, por lo que la banda de fragmentos de agrecano marcados con el anticuerpo NITGE G1 se hace más gruesa. Por el contrario, cuando el cultivo es tratado con inulina polisulfato del Ejemplo Químico 1, en presencia o no de IL-
10 1 α , se inhibe la degradación de agrecano, por lo que la banda anteriormente mencionada se estrecha hasta casi desaparecer. Así pues, la inulina polisulfato es capaz de disminuir la degradación de agrecanos en un cultivo de condrocitos, por lo que también frenará la degradación de la matriz extracelular en casos de pacientes con osteoartritis.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de inulina sulfato en forma ácida o una sal fisiológicamente
5 aceptable de la misma para la preparación de un medicamento para el
tratamiento o profilaxis de la osteoartritis en un mamífero.

2.- Uso según la reivindicación 1, en el que la inulina sulfato se encuentra
total o parcialmente salificada con un metal alcalino o alcalinotérreo.
10

3.- Uso según la reivindicación 2, en el que el metal alcalino es sodio y la
inulina sulfato es la sal inulina sulfato de sodio.

4.- Uso según la reivindicación 3, en el que la sal inulina sulfato de sodio
15 presenta un grado de sulfatación comprendido entre el 25 % y el 62 %, sobre
base anhidra.

5.- Uso según la reivindicación 4, en el que el grado de sulfatación está
comprendido entre el 55 % y el 62 %, sobre base anhidra.
20

6.- Uso según la reivindicación 1, en el que la inulina sulfato se encuentra
parcialmente hidrolizada.

7.- Uso según la reivindicación 1 u 6, en el que la inulina sulfato es inulina
25 polisulfato.

8.- Uso según la reivindicación 7, en el que la inulina polisulfato es la sal
inulina polisulfato de sodio.

9.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el
30 medicamento se adapta para administración oral.

10.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el
medicamento se adapta para administración intraarticular.
35

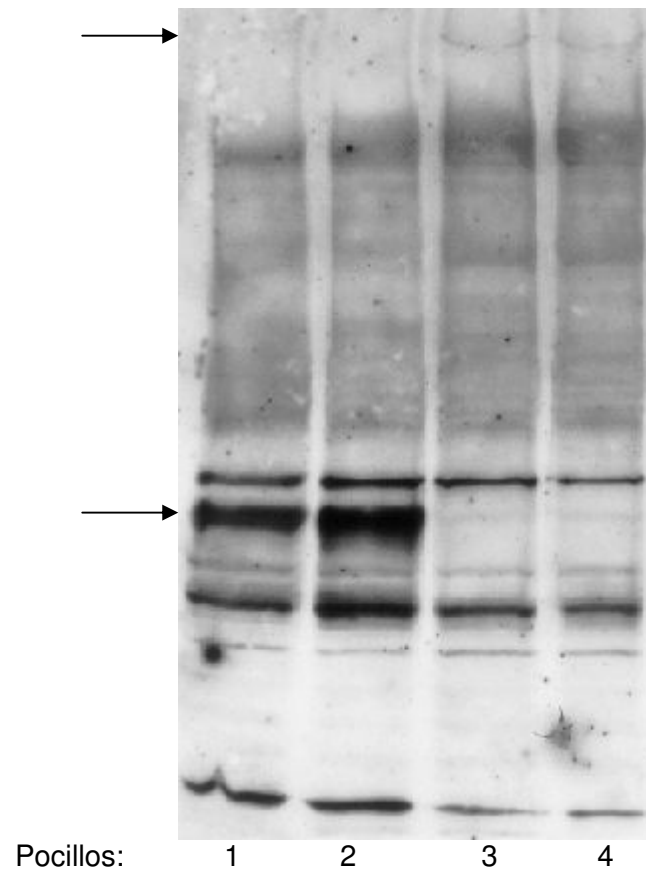


FIGURA 1