

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.02.11	(73) Titular(es): BIOIBERICA, S.A.	
(30) Prioridade(s): 2004.02.27 ES 200400464	7, PLAZA FRANCESC MACIA 08029	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.05.07	BARCELONA	ES
(45) Data e BPI da concessão: 2010.10.13 237/2010	(72) Inventor(es): FRANCISCO JAVIER VILA PAHI RAMON RUHI ROURA JOSEP ESCAICH FERRER AUGUST LODEWIJK VERBRUGGEN JOSEP VERGES MILANO	ES ES ES ES ES
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **SULFATO DE INULINA PARA O TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO À UTILIZAÇÃO DE UM POLISSACÁRIDO SULFATADO NA FORMA ÁCIDA OU DE UM SEU SAL ACEITÁVEL SOB O PONTO DE VISTA FISIOLÓGICO, ESCOLHIDO NO GRUPO CONSTITUÍDO POR SULFATO DE INULINA, SULFATO DE GELANO, SULFATO DE PULULANO, SULFATO DE CURDLANO, SULFATO DE ÁCIDO ALGÍNICO, SULFATO DE LAMINÁRIA, E SULFATO DE PECTINA NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO OU A PROFILAXIA DE ARTROSE EM UM MAMÍFERO. PREFERIVELMENTE, O POLISSACÁRIDO SULFATADO É O SULFATO DE INULINA, MAIS PREFERIVELMENTE O SAL DE SÓDIO DE POLISSULFATO DE INULINA. A PRESENTE INVENÇÃO DIZ IGUALMENTE RESPEITO À UTILIZAÇÃO DE UM OLIGOSSACÁRIDO SULFATADO DERIVADO DE UM POLISSACÁRIDO ESCOLHIDO NO GRUPO CONSTITUÍDO POR INULINA, GELANO, PULULANO, CURDLANO, ÁCIDO ALGÍNICO, LAMINÁRIA, E PECTINA, NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO OU A PROFILAXIA DE ARTROSE EM UM MAMÍFERO.

RESUMO

"SULFATO DE INULINA PARA O TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE"

A presente invenção diz respeito à utilização de um polissacárido sulfatado na forma ácida ou de um seu sal aceitável sob o ponto de vista fisiológico, escolhido no grupo constituído por sulfato de inulina, sulfato de gelano, sulfato de pululano, sulfato de curdlano, sulfato de ácido algínico, sulfato de laminária, e sulfato de pectina na preparação de um medicamento para o tratamento ou a profilaxia de artrose em um mamífero. Preferivelmente, o polissacárido sulfatado é o sulfato de inulina, mais preferivelmente o sal de sódio de polissulfato de inulina. A presente invenção diz igualmente respeito à utilização de um oligossacárido sulfatado derivado de um polissacárido escolhido no grupo constituído por inulina, gelano, pululano, curdlano, ácido algínico, laminária, e pectina, na preparação de um medicamento para o tratamento ou a profilaxia de artrose em um mamífero.

DESCRIÇÃO

"SULFATO DE INULINA PARA O TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE"

Campo técnico da invenção

A presente invenção refere-se à utilização de um polissacárido sulfatado na preparação de um medicamento para o tratamento ou a profilaxia de osteoartrite.

Descrição do estado anterior da arte

A osteoartrite, também conhecida como artrose, é uma doença degenerativa das articulações que afecta a maioria das pessoas com idade superior a 65 anos, caracterizada por uma degradação progressiva do tecido cartilaginoso, juntamente com a presença de inflamação e de dor. A inflamação aparece principalmente quando a doença se apresenta em estágio avançado e tem uma natureza diferente da inflamação observada na artrite reumatóide, constituindo geralmente apenas um componente minoritário da doença artrósica. A osteoartrite pode definir-se como a degeneração da cartilagem hialina das articulações. Um efeito secundário consiste também na afectação da membrana sinovial e do osso subcondral, assim como na formação de novo osso nas margens das superfícies das articulações. A etiologia da artrose é desconhecida e sua evolução é lenta.

A cartilagem permite que os ossos se movam, deslizando uns sobre os outros. Absorve também o stresse produzido pelo movimento físico. Na osteoartrite, a superfície da cartilagem degenera e desgasta-se, fazendo com que os ossos se movam uns contra os outros, o que leva à fricção, à dor, à tumefacção e

à perda do movimento articular. Conforme o tempo passa, a articulação pode deformar-se.

Como um auxiliar no diagnóstico de osteoartrite, utilizam-se principalmente duas técnicas: raios X, que é o processo mais simples para identificar as alterações ósseas na articulação, e a ressonância magnética nuclear (RMN), que, contrariamente ao anterior, torna possível a visualização simultânea de todos os componentes da articulação.

Sob condições normais, a renovação da cartilagem é um processo muito lento, que consiste em uma síntese constante (anabolismo) e degradação (catabolismo) dos componentes da matriz extracelular. O condrócito é a célula responsável por esse metabolismo, que deve ser coordenado.

Sob condições patológicas, esse processo altera-se, porque a renovação da cartilagem é acelerada, o que leva a uma regeneração precoce do tecido cartilaginoso induzida por um desequilíbrio entre os programas anabólico e catabólico do condrócito, o que acarreta necessariamente a degradação da cartilagem. A reacção de regeneração é o resultado de uma hiperproliferação de condrócitos, em conjunto com o incremento da síntese dos componentes da matriz extracelular da cartilagem por essas células (D. Hamermam *et al.* N. Engl. J. Med., 320, 1322-1330 (1989)). Por conseguinte, existe um equilíbrio entre síntese e degradação da cartilagem que controla a reacção homeostática mencionada e que depende de hormonas sistémicas e de factores de crescimento cujas secreções diminuem com a idade. A degradação da cartilagem é regulada por enzimas e radicais livres produzidos pelos tecidos adjacentes, mas também pelo próprio condrócito.

Vamos destacar os seguintes tratamentos farmacológicos actuais da osteoartrite:

Substâncias de acção sintomática que têm uma acção rápida, como analgésicos, fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINE), corticóides e inibidores da ciclooxigenase 2 (COX-2).

Substâncias de acção sintomática que actuam de forma mais lenta, conhecidas por SYSADOA [(Symptomatic Slow Acting Drug for Osteoarthritis) fármacos sintomáticos de acção lenta na osteoartrose] (M.G. Lequesne, Rev. Rhum. (Eng./Ed.), 61, 69-73 (1994)), que incluem o ácido hialurónico, o sulfato de condroitina e o sulfato de glucosamina. Esse grupo caracteriza-se pelo facto do efeito começar 2 a 3 semanas depois do tratamento e persistir durante 2 a 6 meses após a administração cessar.

Na bibliografia encontraram-se documentos sobre outras utilizações dos polissacáridos sulfatados da presente invenção:

R. V. Jones (Patente de invenção norte-americana N° 2 686 779) divulga um método para preparar sais de sulfato de inulina com metais alcalinos. Na mencionada patente salienta-se que os sais alcalinos de sulfato de inulina com diversos graus de sulfatação têm sido utilizados na indústria química como espessantes de pastas, adesivos e aditivos para lamas utilizados na perfuração de poços de petróleo.

Foi descrito que o sulfato de inulina apresenta actividade anticoagulante (Arkiv for Kemi, mineralogi o.

geologi., Bd 24B (5), 1-4 (1946)) e antilipémica (Arch. Int. Pharmacodyn, XCIX, 334 (1954)).

V.G. Nair et al. (Patente de invenção norte-americana N° 4 021 545) revelam que os sais de polissulfato de inulina (completamente sulfatada) exibem actividade de inibição do complemento, pelo que, segundo os inventores, eles poderiam utilizar-se no tratamento de doenças como a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistémico, alguns tipos de vasculite, etc.

G. Franz et al. (Bioactive Carbohydrate Polymers, 47-58, Kluwer Academic Publishers, Holanda, 2000) descrevem a actividade anticoagulante e antitrombótica do sulfato de pululano.

C.C. Lee (Patente de invenção europeia EP499 164) reivindica, embora sem descrevê-la em um qualquer exemplo, uma composição injectável que pode conter carrageninas a fim de completar os fluidos de lubrificação naturais. No documento citado não mencionam o polissulfato de carrageninas.

T. Kanamaru et al. (Patente de invenção norte-americana N° 5 135 920) divulgam que o sulfato de curdlano é um agente angiostático. S. Alban et al. (Thromb. Res. 78 (3), 201-10 (1995)) descrevem que o mesmo composto actua como um agente anticoagulante e antitrombótico.

T. Hata et al. (Patente de invenção JP 04257509) apresentam a aplicação de sulfato de ácido algínico como um agente hidratante em preparações cosméticas. L. Lange et al. (Patente de invenção ES 2 064 736) descrevem a utilização de sulfato de alginato para inibir o colesterol pancreático.

E. Besterman (Brit. Med. J., 310 (1957, I)) descreve que o sulfato do polissacárido laminária apresenta actividade antilipémica. H. Q. Miao et al. (Int. J.

Cancer, 83 (3), 424--31 (1999)) mostram a actividade antimetastática do sulfato de laminária.

P. Bohlen et al. (Patente de invenção internacional WO 03/006645) descrevem que o sulfato do polissacárido laminária inibe a actividade da heparanase, que, como eles reivindicam, está associada, entre outros, a processos inflamatórios, diabetes ou artrite.

L. Lange et al. (Patente de invenção ES 2 064 736) revelam que o sulfato do polissacárido pectina é útil no tratamento de elevados níveis de colesterol no sangue.

Até agora, não se encontrou nenhuma descrição relativa à utilização de sulfato de inulina no tratamento ou na profilaxia de osteoartrite.

A partir de todos os antecedentes podemos concluir que o fornecimento de um fármaco útil para o tratamento da osteoartrite constitui ainda um problema terapêutico.

Descrição da invenção

O problema a resolver pela presente invenção é fornecer polissacáridos sulfatados alternativos para utilizar no tratamento ou na profilaxia de osteoartrite. A solução conforme o primeiro objectivo da presente invenção refere-se à utilização de sulfato de inulina na forma ácida ou sob a forma de um seu sal aceitável sob o ponto de vista fisiológico, na preparação de um medicamento para o tratamento ou a profilaxia de osteoartrite em um mamífero.

Em uma forma de realização preferida, o sulfato de inulina é totalmente ou parcialmente salificado com um metal alcalino ou alcalino terroso. De preferência, o metal

alcalino é o sódio e o polissacárido preferido é o sal de sódio do sulfato de inulina

O sal de sódio do sulfato de inulina com um grau de sulfatação entre 25% e 62%, em relação ao produto anidro, é o mais preferido.

O sal de sódio do sulfato de inulina com um grau de sulfatação entre 55% e 62%, em relação ao produto anidro, é ainda mais preferido.

Em uma outra forma de realização igualmente preferida, o sulfato de inulina é parcialmente hidrolisado.

Em uma outra forma de realização igualmente preferida, o polissacárido sulfatado é o polissulfato de inulina, de preferência o sal de sódio do polissulfato de inulina.

Em uma forma de realização particularmente preferida, adapta-se o medicamento para administração oral.

Da mesma forma, em uma forma de realização especialmente preferida, adapta-se o fármaco para administração intra-articular.

Os polissacáridos sulfatados são bem conhecidos, e podem preparar-se por sulfonação parcial ou total dos grupos hidroxil livres presentes na estrutura dos polissacáridos: inulina, gelano, pululano, curdlano, ácido algínico, laminária, e pectina.

A sulfonação de um grupo hidroxil dá origem ao grupo sulfato correspondente.

Quando falamos na presente invenção sobre o grau de sulfatação, referimo-nos à % de grupos sulfato relativamente à base anidra (em relação à molécula).

Quando na descrição detalhada da presente invenção falamos de polissacáridos sulfatados, isso refere-se a um polissacárido sulfatado com qualquer grau de sulfatação. Na bibliografia, um polissacárido sulfatado com um elevado grau de sulfatação designa-se normalmente por polissacárido polissulfatado e, naturalmente, quando o polissacárido é totalmente sulfatado designa-se também por polissacárido polissulfatado. Consequentemente, a presente invenção inclui um polissacárido polissulfatado, isto é o polissulfato de inulina.

Os polissacáridos sulfatados podem preparar-se por sulfonação parcial ou total dos grupos hidroxil livres nos polissacáridos comerciais citados antes, por meio de procedimentos descritos na bibliografia, como, por exemplo, por meio de ácido clorossulfónico/piridina (T. Astrup *et al.* *Acta Physiol. Scand.*, 8, 215-226 (1944)), ou de outro modo por meio de ácido clorossulfónico/dimetilformamida (P. Vongchan, *Carbohydrate Research*, 337, 1239-1242 (2002)), ou de outro modo utilizando ácido piperidina-N-sulfónico (N. Kinzo *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 21, 420-426 (1972)), ou de outro modo utilizando o complexo trióxido de enxofre/piridina (C. Mähner *et al.* *Carbohydr. Res.*, 331, 203-208 (2001)).

A fim de produzir diversos graus de sulfatação, os procedimentos mencionados antes podem modificar-se (alterando as concentrações dos reagentes, a temperatura reaccional, os tempos reaccionais, etc.). Além disso, se assim for desejado, podem sulfonar-se selectivamente diferentes grupos hidroxil,

por meio de protecção/desprotecção dos grupos hidroxí do polissacárido.

Se o peso molecular médio do polissacárido inicial for muito alto, pode-se, se assim for desejado, hidrolisar-se parcialmente antes ou depois da sulfonação.

Os oligossacáridos sulfatados podem preparar-se por hidrólise enzimática ou química (procedimentos que estão perfeitamente estabelecidos na bibliografia) do polissacárido comercial, seguida por sulfonação, ou de outro modo directamente por hidrólise enzimática ou química do polissacárido sulfatado. Podem preparar-se também por síntese química.

Quando na descrição detalhada da presente invenção falamos sobre um sal aceitável sob o ponto de vista fisiológico, referimo-nos a um sal de um metal alcalino, como por exemplo de sódio ou de potássio, um sal de um metal alcalino terroso, como por exemplo de cálcio ou de magnésio, ou ainda a um sal orgânico, como por exemplo um sal derivado da trimetilamina, da trietilamina, ou de um aminoácido, como por exemplo lisina, arginina, prolina, glicina, ou serina.

A salificação do polissacárido sulfatado pode realizar-se por simples processos químicos bem conhecidos.

Para utilização no tratamento ou na prevenção de osteoartrite, formula-se o sulfato de inulina da presente invenção, quer na forma ácida quer sob a forma de um seu sal aceitável sob o ponto de vista fisiológico, incluindo-o em composições farmacêuticas adequadas, utilizando técnicas e excipientes ou veículos convencionais, tais como as descritas

em Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., Nova Iorque, EUA.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem administrar-se ao doente nas doses necessárias. Pode proceder-se à administração dessas composições utilizando diversas vias de administração como, por exemplo, a via oral, intravenosa, intraperitoneal, intra-articular, subcutânea, intramuscular, tópica, sublingual, intradérmica, ou intranasal. As composições farmacêuticas da presente invenção incluem uma quantidade eficaz sob o ponto de vista terapêutico dos polissacáridos sulfatados da mesma invenção, na forma ácida ou sob a forma de um seu sal aceitável sob o ponto de vista fisiológico, dependendo a mencionada quantidade de muitos factores, tais como por exemplo, a situação física do paciente, a idade, o sexo, o composto específico, a via de administração, e outros factores bem conhecidos na técnica. Além disso, entende-se que a referida dosagem do princípio activo pode administrar-se em doses unitárias simples ou múltiplas a fim de proporcionar os efeitos terapêuticos desejados. Se assim for desejado, podem utilizar-se outros agentes terapêuticos conjuntamente com os fornecidos pela presente invenção.

Na generalidade, as preparações farmacêuticas da presente invenção apresentar-se-ão na forma sólida ou líquida, ou sob a forma de um gele. As preparações farmacêuticas sob a forma sólida que se podem preparar de acordo com a presente invenção incluem pós, microgrânulos ("pellets"), comprimidos ou cápsulas ("pills") grânulos dispersíveis, supositórios, e outras formas galénicas sólidas. Preparações sob a forma líquida incluem soluções, suspensões, emulsões, e microesferas. Consideram-se também

preparações sob a forma sólida que, imediatamente antes de serem utilizadas, podem converter-se em preparações líquidas para administração oral, parentérica, ou intra-articular. As formas líquidas referidas incluem soluções, suspensões, e emulsões.

Breve descrição da figura

A Figura 1 representa um Western Blot. A seta superior indica a área de agrecano intacto e a seta inferior indica a área de fragmentos de agrecano marcados com anticorpo NITGE G1. No primeiro dos poços semeou-se uma amostra de controlo (sem qualquer tratamento); no segundo, uma amostra tratada com interleucina-1 (IL-1 α), no terceiro, uma amostra tratada com 100 μ g/ml de polissulfato de inulina no Exemplo Químico 1, e, no quarto, uma amostra tratada com IL-1 α e 100 μ g/ml de polissulfato de inulina no Exemplo Químico 1.

Descrição detalhada da invenção

Os exemplos seguintes são simplesmente explicativos e não representam qualquer limitação para o âmbito da presente invenção.

Exemplos Químicos

Exemplo 1: Preparação do sal de sódio do polissulfato de inulina

Exemplo 1-A: Preparação do sal de sódio do polissulfato de inulina utilizando ácido clorossulfónico/piridina

Sob agitação constante, a uma temperatura inferior a 6 °C, adicionaram-se, gota a gota, 88 ml (1,32 mol; 1,8 eq/OH) de ácido clorossulfônico a 580 ml (7,20 mol) de piridina anidra. Aqueceu-se a mistura resultante até à temperatura de 75 °C e, posteriormente, adicionaram-se 40 g (0,25 mol) de inulina (Fibruline Padrão, comercializado por Trades S.A.). A agitação e o aquecimento até 100 °C continuaram durante 5 horas. Uma vez decorrido esse tempo, a mistura reaccional arrefeceu aproximadamente até 50 °C e adicionaram-se 50 ml de água desionizada a fim de destruir o excesso de ácido clorossulfônico. Durante essa fase, a temperatura ambiente aumentou ligeiramente e apareceram duas fases.

Deixou-se repousar o produto reaccional bruto até se atingir a temperatura ambiente. Separou-se a fase superior (piridina) por sucção, enquanto a fase oleosa inferior se verteu sobre uma solução a 10% de acetato de sódio em metanol. Deixou-se sedimentar o precipitado que se formou. Separou-se o sobrenadante por decantação e rejeitou-se.

O tratamento com a solução metanólica de acetato de sódio repetiu-se duas vezes e, na última fase, separou-se o sólido por filtração sob vazio utilizando um filtro de profundidade do tipo k-100 (Pall Corporation. Seitz-k-100).

Dissolveu-se o produto retido no filtro (sólido castanho) em água destilada e filtrou-se a solução resultante sob vazio utilizando um filtro de profundidade do tipo k-100 para eliminar da reacção a restante matéria insolúvel.

O filtrado resultante da fase anterior apresentou-se como uma solução de cor âmbar escuro que se tratou com amónio quaternário (Quartamin). Como consequência, formou-se um

sólido muito abundante que se isolou por filtração sob vazio utilizando uma pré-camada de terra Hyflo (100 g). Lavou-se o filtro abundantemente com água destilada.

O complexo polissulfato de inulina-Quartamin foi cuidadosamente separado das terras de filtração e tratado com uma solução aquosa a 20% de NaCl, à temperatura de 80 °C, durante duas horas.

Uma vez decorridas duas horas de reacção, interrompeu-se o aquecimento, e quando a temperatura ambiente atingiu 60 °C adicionou-se isopropanol. Manteve-se a agitação durante 30 minutos e, em seguida, verteu-se a mistura para um funil de decantação a fim de separar a fase aquosa da orgânica.

Rejeitou-se a fase orgânica (isopropanol+amónio quaternário). Filtrou-se a fase aquosa sob vazio a fim de eliminar os restos da terra Hyflo.

Verteu-se uma mistura de metanol/acetona sobre a fase aquosa. Deixou-se sedimentar o precipitado castanho que se formou. Separou-se o sobrenadante por decantação e rejeitou-se. Lavou-se o sedimento com metanol e dissolveu-se posteriormente em água desionizada.

Ajustou-se o pH da solução resultante entre 10,5 e 11 com NaOH a 10%. Aqueceu-se a solução até à temperatura de 50 °C e tratou-se com H₂O₂ durante 15 minutos. Finalmente, interrompeu-se o aquecimento e ajustou-se o pH do meio até 5,5 com uma solução de ácido acético a 2%.

Quando a solução descorada atingiu a temperatura ambiente, verteu-se sobre ela metanol a 10%/solução de

acetato de sódio. Formou-se imediatamente um precipitado branco ou ligeiramente amarelo que se deixou sedimentar.

Separou-se o sobrenadante por decantação e desidratou-se o sedimento abundantemente com metanol.

Separou-se o sulfato de inulina por filtração sob vácuo utilizando uma placa porosa N° 3 e secou-se em um aquecedor a vácuo à temperatura de 30 °C até a concentração de metanol ser igual ou inferior a 0,3%.

O produto apresentou-se sob a forma de um pó fino, amorfo, branco ou ligeiramente amarelo.

Determinação do grau de sulfatação (sulfatos orgânicos) no sal de sódio do polissulfato de inulina produzido

Pesaram-se exactamente 150 mg do produto, dissolveram-se em água, e levou-se a solução resultante até 250 ml com o mesmo solvente. Com uma pipeta retiraram-se 5 ml dessa solução, transferiram-se para um copo de vidro de boca larga de 50 ml, e adicionaram-se 25 ml de água. Avaliaram-se por fotometria a 420 nm, utilizando uma solução de cloreto de N-cetilpiridínio (CPC) a 0,1% (0,00279 M).

O teor em sulfato calculou-se utilizando a equação seguinte:

$$\%SO_4 = \frac{V \times 0.00279 \times 96 \times 100}{5 \times (100 - PPS) \times W} = \frac{13.392 \times V \times 100}{100 - PPS} \times W$$

Em que:

V: Volume consumido da solução de CPC a 0,1% em ml.

W: Peso da amostra, em mg.

PPS: A perda de peso por desidratação do produto (105 °C, 4 horas), em %.

Grau de sulfatação produzido: 58,0%, expresso em relação ao produto anidro, o que corresponde a uma molécula de inulina totalmente sulfatada (sulfonação de todos os grupos hidroxí)

Piridina residual livre e piridina sob a forma de um sal: 127 ppm (o limite permitido é 200 ppm)

Sulfatos livres: 0,08%

IV (KBr) cm^{-1} : 2900(C-O-H), 1247(S=O), 800(C-S-O)

Exemplo 1-B: Preparação do sal de sódio do polissulfato de inulina utilizando ácido clorossulfônico/dimetilformamida (DMF)

A um reactor de três tubuladuras (2 l), com um termómetro e dois funis de adição, adicionaram-se 1.000 ml de DMF anidra sob uma corrente de azoto. Arrefeceu-se o solvente até uma temperatura inferior a 6 °C, e adicionaram-se, gota a gota, 112 ml (1,68 mol; 1,8 eq/OH) de ácido clorossulfónico sob agitação constante.

Deixou-se a temperatura do reactor atingir 15 °C e, posteriormente, adicionou-se uma solução de 52,6 g de inulina em 400 ml de DMF anidra. Manteve-se a reacção à temperatura ambiente durante menos de 3 horas.

Uma vez decorrido esse tempo, verteu-se a reacção sobre água fria. O pH da solução resultante aumentou até 7 a 8 com NaOH a 30% e, posteriormente, verteu-se a solução sobre uma outra a 10% de acetato de sódio em metanol. Deixou-se sedimentar o sólido que precipitou e separou-se do sobrenadante.

Separou-se o sólido por filtração sob vazio através de um funil de Büchner. Dissolveu-se em 1500 ml de "água de processo" e tratou-se a solução com 350 ml de amónio quaternário (Quartamin). O sólido branco formado isolou-se por filtração sob vazio utilizando uma pré-camada de terra Hyflo (100 g).

Os sólidos retidos no filtro, em conjunto com a pré-camada de terra Hyflo, transferiram-se para um reactor provido de refrigeração e agitação mecânica, ao qual se adicionaram 3 000 ml de uma solução de NaCl a 20%. Agitou-se a mistura durante 6 horas à temperatura de 80 °C e posteriormente filtrou-se sob vazio a quente, utilizando papel de filtro. Guardou-se o filtrado (A), e transferiu-se o sólido retido no funil de Büchner novamente para o reactor a fim de repetir a complexa fase de "breakdown" exactamente nas mesmas condições. O filtrado (B) que foi produzido a partir dessa repetição foi misturado com (A), tendo-se rejeitado o sólido residual.

Verteram-se 3,3 volumes de uma mistura metanol/acetona sobre a solução obtida a partir da reunião dos filtrados (A) e (B). Deixou-se sedimentar o sólido que precipitou e isolou-se mediante filtração por sucção do sobrenadante. Lavou-se o sedimento com metanol, drenou-se sob vazio através de um funil de Büchner, e dissolveu-se em água de processo. Determinou-se o teor em NaCl nessa solução e ajustou-se para 10% (w/V).

Repetiu-se a etapa de precipitação utilizando metanol/acetona, e dissolveu-se o sólido depositado no fundo do recipiente em água desionizada.

Ajustou-se a concentração de cloreto de sódio nessa solução até 2% (w/V) e, posteriormente, adicionaram-se 2 volumes de metanol. Deixou-se a mistura em repouso. Depositou-se o produto no fundo do recipiente. Separou-se o sobrenadante mediante filtração por sucção e dissolveu-se o produto em água de processo a fim de obter uma solução com uma concentração aproximada de 5% (w/V). Diafiltrou-se [Diafiltração (Processo de ultrafiltração onde o retido é diluído com água e recirculado)] essa solução através de uma membrana de celulose regenerada MWCO [Molecular weight cut-off (Peso molecular de corte)]=5000 a 1000 Da. Durante essa etapa analisou-se periodicamente o permeado obtido com AgNO_3 . Considerou-se concluída a diafiltração quando o doseamento do cloreto forneceu um resultado negativo.

Liofilizou-se a solução diafiltrada. Pulverizou-se o liofilizado obtido e peneirou-se. O sal de sódio do polissulfato de inulina obteve-se sob a forma de um pó amorfo, branco ou ligeiramente amarelo.

Exemplos farmacológicos

A resistência da cartilagem e a sua capacidade de regeneração determinam-se através de proteoglicanos da matriz extracelular, especialmente dos agrecanos. A síntese desses agrecanos pelos condrócitos articulares, e sua qualidade, diminui com a idade, que constitui um dos principais factores implicados no desenvolvimento de osteoartrite.

Exemplo 1: Avaliação dos efeitos *in vitro* de polissulfato de inulina sobre a síntese de agrecanos extracelulares em uma cultura primária de condrócitos humanos

1A: Níveis de agrecanos determinados através da incorporação de ^{35}S

Materiais e processos

Isolaram-se condrócitos articulares humanos seguindo os processos descritos por W.T. Green Jr. (Clin. Orthop., 75, 248-260 (1971)) e K.E. Kuettner et al. (J. Cell. Biol., 93, 743-750 (1982)).

Cultivaram-se esses condrócitos em um gele de agarose seguindo o processo descrito por P. D. Benya et al. (Cell, 30, 215-224, (1982)), e modificado por G. Verbruggen et al. (Clin. Exp. Rheumatol., 8, 371-378 (1990)) e por M. Cornelissen et al. (J. Tiss. Cult. Meth., 15, 139-146 (1993)).

Pesquisou-se a síntese de agrecanos mediante a incorporação de ^{35}S , utilizando sulfato de sódio marcado $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ como precursor radioactivo. Após duas semanas de cultura, introduziram-se 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de precursor radiomarcado no meio de cultura durante 48 horas, da mesma forma que o composto a ensaiar (polissulfato de inulina no Exemplo Química 1), em diferentes concentrações (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 $\mu\text{g/ml}$).

Os agrecanos ^{35}S sintetizados acumularam-se parcialmente uma vez mais na matriz intercelular de agarose ou então foram libertados no meio de incubação.

Uma vez terminado o período de incubação, desagregou-se mecanicamente o gel de agarose e submeteu-se posteriormente a um processo de digestão utilizando 3 ml de uma solução de

agarose a 50 U/ml em um tampão de fosfato 0,067M, a pH 6,0, na presença de inibidores de proteinases.

Centrifugou-se a suspensão assim obtida; o sobrenadante contendo os agrecanos ^{35}S da matriz interterritorial e o meio de incubação contendo os metabolitos de agrecanos ^{35}S libertados na matriz extracelular foram posteriormente reunidos por técnicas cromatográficas.

O resíduo, que continha os condrócitos e os agrecanos ^{35}S associados, foi tratado durante 48 horas com 1 ml de uma solução de cloreto de guanídio 4,0M em um tampão de acetato 0,05M a pH 5,8 contendo os inibidores das proteases.

O objectivo desse processo é extrair os agrecanos ^{35}S associados às células. Centrifugou-se a solução obtida a fim de separar as células do sobrenadante, o qual foi posteriormente separado por processos cromatográficos. Os processos cromatográficos para as diferentes fracções obtidas realizaram-se sobre gele Sephadex G25 em um tampão de fosfato pH 6,8 contendo Na_2SO_4 0,01M, a fim de separar os agrecanos ^{35}S do Na_2SO_4 livre.

A radioactividade de cada um dos eluentes macromoleculares obtidos foi avaliada e relacionada com o número de condrócitos contido na cultura inicial, expressa em pg de $^{35}\text{SO}_4$ incorporado nos agrecanos, por milhão de condrócitos por hora.

Resultados

Apresentam-se nos Quadros 1, 2 e 3.

Os quadros mostram a importante eficácia do polissulfato de inulina no Exemplo Químico 1, na produção total de agrecanos sintetizados por repetição (Quadro 3). O polissulfato de inulina no Exemplo Químico 1 também é capaz de aumentar a produção de agrecanos na matriz interterritorial da (Quadro 1) bem como dos agrecanos associados às células (Quadro 2).

A actividade óptima observa-se em uma concentração próxima de 0,5 mg/ml.

Quadro 1

pg $^{35}\text{S}/10^6$ células/hora	Variação %	Total %	IPS ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
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
Quantidade de enxofre marcado radioactivamente incorporado nos agrecanos da matriz interterritorial, por milhão de células por hora. Variação em % = Variação percentual em relação ao controlo não tratado (IPS=0,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). % Total = Percentagem relativa à quantidade total de agrecanos. IPS: dose de polissulfato de inulina no Exemplo Químico 1 anexado. *p <0,05 em relação ao controlo não tratado			

Quadro 2

pg $^{35}\text{S}/10^6$ células/hora	Variação %	Total %	IPS ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
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
Quantidade de enxofre marcado radioactivamente incorporado nos agrecanos da matriz interterritorial associada às células, por milhão de células por hora. Variação em % = Variação percentual em relação ao controlo não tratado (IPS=0,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). % Total = Percentagem relativa à quantidade total de agrecanos. IPS: dose de polissulfato de inulina no Exemplo Químico 1 anexado. P* <0,05 em relação ao controlo não tratado			

Quadro 3

pg $^{35}\text{S}/10^6$ células/hora	Variação %	Total %	IPS ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
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
Quantidade de enxofre marcado radioativamente incorporado nos agrecanos sintetizados por repetição, por milhão de células por hora. Variação em % = Variação percentual em relação ao controle não tratado (IPS=0,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). % Total = Percentagem relativa à quantidade total de agrecanos. IPS: dose de polissulfato de inulina no Exemplo Químico 1 anexado. *p <0,05 em relação ao controle não tratado			

1B: Concentração de agrecanos determinada por técnicas de imunocitoquímica

Materiais e processos

Isolaram-se os condrócitos articulares humanos e cultivaram-se seguindo os processos descritos anteriormente.

Após uma semana de cultura, determinou-se a acumulação de agrecanos associados aos condrócitos por meio da técnica de imunocitoquímica descrita por L. Wang et al. (Osteoarthritis Cart., 9, 248-260 (2001)). Trataram-se os condrócitos com interleucina-1 (IL-1) a fim de simular uma situação de inflamação e catabolismo. Em conjunto com a IL-1 adicionou-se o polissulfato de inulina do Exemplo Químico 1.

Uma vez concluído o período de incubação, libertaram-se os condrócitos a partir do gel de agarose seguindo o processo descrito. Os condrócitos e os agrecanos associados estudaram-se por técnicas de citometria de fluxo utilizando anticorpos

monoclonais dirigidos especificamente contra a fracção proteica dos agrecanos.

Resultados

Apresentam-se no Quadro 4.

Esse quadro confirma a eficácia do polissulfato de inulina do Exemplo Químico 1 sobre a produção de agrecanos associados às células.

Além disso, pode-se observar que existe uma relação dose-efeito, uma vez que, com doses muito maiores do composto, há um aumento importante da produção de agrecanos associados às células.

Quadro 4

	Dador M32		Dador F45	
	M±SD	Variação %	M±SD	Variação %
Controlo	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 µg/ml)	----	----	20,4±0,2*	112,7*
IL-1+IPS (1,0 µg/ml)	20,8±1,2*	116,2*	26,6±0,1*	147,0*
IL-1+IPS (2,5 µg/ml)	21,6±1,1*	120,7*	39,0±0,2*	215,5*
IL-1+IPS (5,0 µg/ml)	25,0±1,4*	139,7*	----	----
A intensidade média de fluorescência dos condrócitos após marcação dos agrecanos com anticorpos conjugados com fluoresceína. M±SD = média ± desvio padrão. Variação em % = Variação percentual em relação ao grupo tratado com IL-1, IL-1 = Interleucina-1, IPS = polissulfato de inulina do Exemplo Químico 1, *p <0,05 em relação ao grupo tratado com IL-1.				

Exemplo 2: Determinação da capacidade do polissulfato de inulina para inibir a degradação dos agrecanos induzida pela IL-1α

Materiais e processos

Os ensaios realizaram-se em culturas de condrócitos a partir de uma linha celular de condrossarcoma murina designada LTC (Chondrosarcoma Tissue Line).

As células da LTC foram mantidas em uma cultura em monocamada em meio de DMEM Gibco (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) (contendo 4,5 g/l de glucose) suplementado com bicarbonato de sódio (3,7 g/l), glutamina (2mM), ácido ascórbico (50 mg/l), gentamicina (50 mg/l) e soro fetal bovino Hyalone (10%), a pH 7,4.

As culturas de células LTC confluentes foram tripsinizadas e 40 000 células por 0,5 ml de cultura foram semeadas em microplacas de 48 poços. Mantiveram-se durante cinco dias, período durante o qual depositaram 15 a 30 µg de glicosaminoglicanos (GAGs) em cada poço.

Separou-se o meio, lavaram-se as membranas celulares mediante a adição de 5 x 1 ml de um meio catabólico {DMEM + 4,5 g/l de glucose suplementado com bicarbonato de sódio (3,7 g/l), glutamina (2 mM), e 10 ng/ml de IL-1 α (Interleucina-1 α) a pH 7,4}. Posteriormente, mantiveram-se as culturas em 200 µl desse meio, suplementado ou não com sal de sódio de polissulfato de inulina do Exemplo Químico 1, durante quatro dias, sem alterar o meio, à temperatura de 37 °C.

A fim de verificar o efeito do sal de sódio do polissulfato de inulina na degradação dos agrecanos, realizou-se um ensaio de Western Blot.

Para o ensaio de Western Blot, adicionaram-se a cada poço 20 µl de Tris-acetato 50 mM a pH 7,3. As culturas (meio + membrana celular) foram desglicosiladas com 50 mU de condroitinase ABC à temperatura de 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, extraíram-se as amostras de cada poço e centrifugaram-se a 1 460 g durante 10 minutos. Separaram-se fracções do sobrenadante de 25 µl por electroforese (gradiente em gel de SDS-PAGE 8 a 12%) e analisaram-se por técnicas de Western Blot utilizando o anticorpo G1 anti-agre-canos. G1 é o produto da actividade da agrecanase, também verificada por imunorreactividade com o anticorpo específico para um neo-epitopo anti-NITGE. O anti-soro utilizou-se na diluição de 1:5 000 e a anti-(IgG de coelho) produzida em cabra conjugada com a enzima peroxidase detectou-se utilizando o Kit ECL Amersham.

Resultados

Apresentam-se na Figura 1, na qual se mostra claramente uma técnica de Western Blot que representa o resultado dos diversos tratamentos utilizados em uma cultura de condrócitos murinos de condrossarcoma. Na mencionada figura, pode observar-se que o tratamento dos condrócitos com IL-1 α é responsável por um aumento da degradação dos agrecanos, de tal forma que a banda de fragmentos de agrecanos marcados com o anticorpo NITGE G1 se torna mais espessa. Pelo contrário, quando a cultura é tratada com polissulfato de inulina do Exemplo Químico 1, na presença ou não de IL-1 α , a degradação de agrecanos é inibida, de tal forma que a banda mencionada antes estreita até quase desaparecer. Por conseguinte, o polissulfato de inulina é capaz de reduzir a degradação dos agrecanos em uma cultura de condrócitos, razão pela qual

também irá parar a degradação da matriz extracelular no caso de pacientes com osteoartrite.

Lisboa, 2 de Dezembro de 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de sulfato de inulina sob a forma ácida ou de um seu sal aceitável sob o ponto de vista fisiológico, na preparação de um medicamento para o tratamento ou a profilaxia de osteoartrite em um mamífero.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1., na qual se converte o sulfato de inulina, totalmente ou parcialmente, em um sal por meio de um metal alcalino ou alcalino terroso.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 2., na qual o metal alcalino é o sódio e o sulfato de inulina consiste no sal de sódio do sulfato de inulina.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 3., na qual o sal de sódio do sulfato de inulina apresenta um grau de sulfatação entre 25% e 62%, em uma base anidra.
5. Utilização de acordo com a reivindicação 4., na qual o grau de sulfatação se situa entre 55% e 62%, em uma base anidra.
6. Utilização de acordo com a reivindicação 1., na qual o sulfato de inulina se apresenta parcialmente hidrolisado.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 1. ou 6., na qual o sulfato de inulina é um polissulfato de inulina
8. Utilização de acordo com a reivindicação 7., na qual o polissulfato de inulina consiste no sal de sódio do polissulfato de inulina.

9. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8., em que se adapta o medicamento para administração oral.

10. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8., em que se adapta o medicamento para administração intra-articular.

Lisboa, 2 de Dezembro de 2010.



Cavidades: 1 2 3 4
ou
Poços