



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 19 653 T2** 2008.01.03

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 435 976 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 19 653.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IS02/00016**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 777 769.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/026677**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.09.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.04.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.07.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/702** (2006.01)

A61K 31/722 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

C07H 5/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

608501 26.09.2001 IS

(73) Patentinhaber:

GENIS EHF, Reykjavik, IS

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:

**EINARSSON, Jon M., IS-101 Reykjavik, IS;
GISLASON, Johannes, IS-105 Reykjavik, IS;
PETER, Martin, 14476 Golm, DE; BÄHRKE, Sven,
14476 Golm, DE**

(54) Bezeichnung: **PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG MIT CHITO-OLIGOMEREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

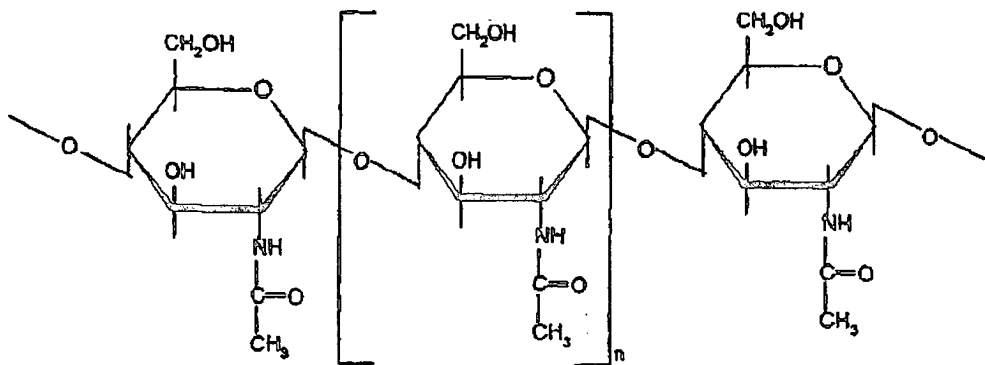
[0001] Die vorliegende Erfindung liegt innerhalb des pharmazeutischen Gebietes, speziell zur Behandlung von Gelenkerkrankungen wie rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis.

STAND DER TECHNIK

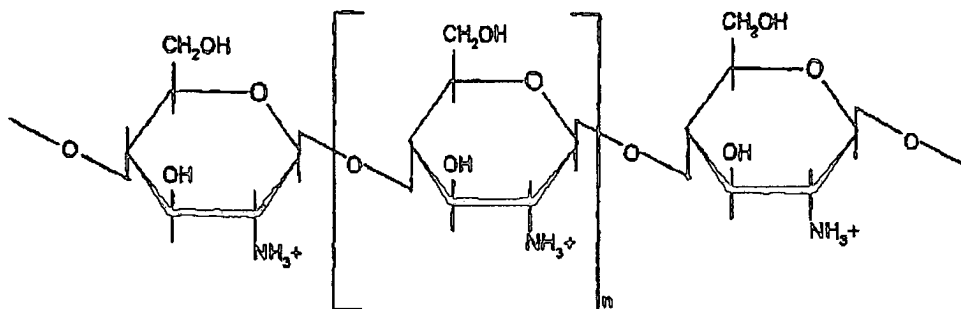
[0002] Chitin und Chitosan sind Biopolymere, die typischerweise aus dem Abfall von Krebsschalen erhalten werden, aber auch von bestimmten Pilzen erhalten werden können. Chitosan kann aus Chitin durch chemische Deacetylierung hergestellt werden. Dies wird normalerweise durch Hydrolysieren der N-Acetylbindung in Chitin mit konzentriertem Alkali (40–50% NaOH oder KOH) erreicht. Definitionsgemäß wird Chitosan generell als ein Copolymer von D-Glucosamin (GlcN) und N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc oder NAG) beschrieben, das in Wasser bei pH-Werten oberhalb von 6,2 – dem isoelektrischen Punkt der freien Aminogruppe – unlöslich ist, aber bei pH-Werten unterhalb von 6,2 sich löst (Siehe Schema 1 und 2). In Chitosan sind 65–100% der Monomereinheiten D-Glucosamin, was gewöhnlich als 65–100% deacetyliertes Chitin bezeichnet wird. Die chemischen und biologischen Eigenschaften von Chitosan werden direkt durch den Deacetylierungsgrad (DDA) und den Polymerisationsgrad (DP) beeinflusst, d.h. der Kettenlänge von dem Polymer.

[0003] In Lösung bei einem pH-Wert unterhalb von 6,2, und wenn die Amingruppen der D-Glucosaminreste protoniert sind, ist Chitosan ein positiv geladenes Polymer. Als Amin ist Chitosan eine schwache Base und kann mit Säuren, wie Carbon- und Mineralsäuren, Salze bilden. Die meisten dieser Salz sind wasserlöslich.

[0004] In seiner natürlichen Form ist Chitin in Wasser unlöslich. Es kann jedoch durch partielle Deacetylierung mittels Alkalibehandlung wasserlöslich gemacht werden [1]. Teilweise deacetyliertes Chitin mit einem DDA von 35–50 ist über einen weiten PH-Bereich in Wasser löslich. Diese Form des wasserlöslichen Chitins ist als ein exzellentes Substrat für Chitin-umwandelnde Enzyme [2, 3] aufgezeigt worden. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass die Herstellung von wasserlöslichem Chitin ein notwendiger Schritt ist, um eine hohe Ausbeute von Chito-Oligomeren bei der Verwendung von Chitinasen zu erhalten, da unlösliches Chitin sehr langsam durch Chitinasen hydrolysiert wird [1].



Schema 1. Struktur des vollständig acetylierten Chitins (Poly-N-Acetyl-D-Glucosamin).



Schema 2. Struktur des vollständig deacetylierten Chitosans (Poly-D-Glucosamin, protonierte Form bei niedrigem pH-Wert).

[0005] Chito-Oligomere (COs) und Chitin und Chitosan mit niedrigem Molekulargewicht sind kürzere Segmente, die aus den Polysacchariden mit höherem Molekulargewicht durch Hydrolyse der beta-(1,4)-Bindungen, die die Monomere verbinden, hergestellt werden. Chito-Oligomere bezeichnet hierin kurze bis mittellange Polymere, die vorzugsweise einen Polymerisationsgrad (DP) in dem Bereich von 2 bis 50 aufweisen, entsprechend einer Molekularmasse von etwa 360 bis etwa 10.000 Dalton. COs, die aus wasserlöslichem Chitin hergestellt sind (DDA 35–50%), behalten ihre Wasserlöslichkeit bei. COs werden entweder chemisch unter Verwendung starker Säuren wie Salzsäure hergestellt, was die Hydrolyse von der beta-(1,4)-Bindung bei hohen Temperaturen katalysiert, oder unter Verwendung der enzymatischen Hydrolyse [4, 5]. Die enzymatische Hydrolyse wird bevorzugt, da der Prozess einfacher zu kontrollieren ist und die Bedingungen viel milder sind und ein geringeres Risiko an Nebenreaktionen beinhalten, die in chemischen Modifikationen von dem Material resultieren.

[0006] Arthritis ist eine allgemeine Bezeichnung für Gelenkentzündung(en) und wurde ehemals verwendet, um alle Gelenkerkrankungen einzuschließen. Osteoarthritis ist die gewöhnlichste Form der Gelenkerkrankung, wobei eine Schädigung der Oberfläche des Gelenkes und eine krankhafte Reaktion in dem darunterliegenden Knochen vorliegt. Andere Begriffe, wie „Osteoarthrose“, „Arthrose“ und „degenerative Gelenkerkrankung“, werden auch verwendet, um diese Erkrankung zu beschreiben. Die Krankheit befällt hauptsächlich die Knie, Hüften und Hände (am häufigsten), sowie den Fuß und den Hals und den Rücken. Die rheumatoide Arthritis ist eine verbreitete entzündliche Erkrankung der Gelenke, die eine Entzündung der auskleidenden Membran des Gelenkes (Synovium) verursacht. Dies resultiert in einem stärkeren Anschwellen und anderen Entzündungsanzeichen als in der Osteoarthritis üblich und kann zu schwerer Schädigung von den Gelenken führen.

Bioaktivität der Chito-Oligosaccharide:

[0007] Die biologische Aktivität von Chitin und Chitosan ist mehr als reichlich in der Literatur dokumentiert. Bioaktivitätsuntersuchungen haben deutlich die Bedeutung des Polymerisationsgrades (DP) sowie des Deacetylierungsgrades (DDA) nachgewiesen [6]. In Pflanzen sind die Oligomere mit DP 5–7 mehr aktiv als mit DP 1–4 [7]. Die Ursache ist mit der Fähigkeit der sogenannten Chitinase-ähnlichen Proteine (CLPs), Chito-Oligomere zu binden, verbunden worden. Diese Proteine teilen eine hohe Sequenzhomologie und eine strukturelle Verwandtschaft mit den Chitinasen der Familie 18 [8]. Den CLPs fehlt die katalytische Aktivität aufgrund einer einzelnen Punktmutation in ihrer katalytischen Domäne, aber sie behalten ihre Fähigkeit der Oligosaccharidbindung, die normalerweise 5–7 Chitosan-Oligosaccharideinheiten einschließt.

N-Acetylglucosamin, Chito-Oligosaccharide und Hyaluronan:

[0008] Glucosamin (GN oder GlcN) ist eine modifizierte Glucose, wobei NH_2 die OH-Gruppe an dem Kohlenstoff in dem Zuckermolekül ersetzt. In tierischen Zellen wird Glucosamin nur in zwei Formen gefunden; als Glucosamin-6-phosphat (GN-6-P) und N-Acetylglucosamin (NAG oder GlcNAc). Der Aminosucker GN-6-P wird aus Glutamin und Fructose-6-phosphat (F-6-P) synthetisiert. Diese Reaktion wird durch Glucosaminsynthase katalysiert und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Biosynthese von Aminosuckern. GN-6-P ist der Vorläufer für alle Hexosamine und Hexosamin-Derivate. GN-6-P kann nachträglich durch Acetyl-Coenzym A zu N-Acetylglucosamin (NAG) acetyliert werden. NAG kann anschließend in N-Acetyl-Galactosamin oder N-Acetyl-Mannosamin umgewandelt werden. Diese drei Aminosucker sind bedeutend in der Glykosylierung von Proteinen sowie als Bausteine für Glycolipide, Glycosaminoglycane (GAG), Hyaluronan und Proteoglycane. Hyaluronan (HA), das Rückgrat von vielen Proteoglycanen, ist ein Polysaccharid (bis zu 25.000 Zuckereinheiten), das aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten von NAG und Glucuronsäure (GlcA) zusammengesetzt ist. HA wird als die früheste evolutionäre Form von GAG angesehen. HA ist nicht nur ein bedeutendes Polysaccharid in dem Knorpel, der Synovialflüssigkeit, dem Glaskörper des Auges und in der Haut von Wirbeltieren, sondern kann auch eine bedeutende Rolle in der Gewebeorganisation, der Morphogenese, der Krebsmetastasenbildung, der Wundheilung und der Entzündung spielen [9]. Es wird in großen Mengen während der Wundheilung produziert und ist ein essentieller Bestandteil der Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit), wo es als Schmiermittel dient [10]. NAG erhöht in einer dosisabhängigen Weise die Synthese von Hyaluronan durch Mesothelzellen und Fibroblasten [11]. HA wird von Zellen durch einen Enzymkomplex sezerniert, genannt HA-Synthasen (HAS), der in der Plasmamembran eingebettet ist [9]. Von diesen Enzymen wird angenommen, dass sie sich aus Chitinsynthasen oder Cellulosesynthasen entwickelt haben [9]. Eine HA-Synthase (HAST) der Maus ist in der Lage, HA in vitro zu synthetisieren, wenn sie mit UDP-GlcA und UDP-NAG versorgt wird [12]. Wenn HAS1 mit UDP-NAG alleine inkubiert wird, synthetisiert sie Chito-Oligosaccharide (COs) [12]. Ein Nachweis einer ähnlichen Aktivität von eukariotischen HA-Synthasen in vivo, würde auf neuartige Funktionen für COs in Säugern hinweisen [9]. COs werden in vivo während der Entwicklung von Wirbeltieren (Xenopus, Zebrafisch und Maus) produziert, wo die Chitinase-ähnliche DG42/HAS Unterfamilie sowohl COs als auch HA

während der Differenzierung der Zellen synthetisiert und für die COs ist gezeigt worden, dass sie für die Bildung einer normalen anterior-posterior Achse in der späten Gastrula lebensnotwendig sind [9, 12–16], Übersichtsartikel in [8].

[0009] Neueste Untersuchungen haben auf Verfahren zur Behandlung von Arthritis durch Verabreichen von Glucosamin hingewiesen. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass das Verabreichen von Glucosamin die Tendenz hat, den Knorpelmetabolismus zu normalisieren, den Abbau zu inhibieren und die Synthese von Proteoglycanen zu stimulieren, was in der aortalen Wiederherstellung der Gelenkfunktion resultiert. Die therapeutische Wirksamkeit der Behandlung mit Glucosamin ist in einer Anzahl von Tier- und Humanstudien nachgewiesen worden.

[0010] Die U.S. Patentschrift Nr. 6,117,851 [17] lehrt, dass (Poly)-N-Acetylglucosamin (poly-NAG), d.h. Chitin verwendet werden kann, um Osteoarthritis zu behandeln und/oder die Symptome davon zu lindern. Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass Chitin, das sich im Darm wie unlösliche Fasern verhält, verdaut und absorbiert wird. Des Weiteren ist es aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in dem Darmmilieu nicht wahrscheinlich, dass Chitin durch die kürzlich entdeckte saure Säugerchitinase (AMCase) [18] oder Darmbakterien wirkungsvoll hydrolysiert wird, um niedermolekulare Chitinfragmente, die für die Absorption nutzbar sind, zu produzieren. Teilweise deacetyliertes Chitin ist jedoch bei jedem pH-Wert wasserlöslich und jederzeit als Substrat für die AMCase oder die Darmflora verfügbar.

Chito-Oligomer-Aktivität bei Immunantwort und entzündlichen Reaktionen – Chondrozyten und Makrophagen:

[0011] Für Chitin und Chitosan ist vorgeschlagen worden, dass sie immunostimulatorische Aktivität in Säugetieren besitzen [19–22]. Des Weiteren sind Chitin und Chitosan in der Wundheilung und künstlichen Hautersatzstoffen für einige Jahre untersucht worden [19–22]. In diesen Untersuchungen haben Chitin und Chitosan einen signifikanten hemmenden Effekt auf die Stickstoffmonoxid- (NO) Produktion durch aktivierte Makrophagen gezeigt. Hexa-N-Acetylchitohexaose (GlcNAc)₆ und Penta-N-Acetylchitopentaose (GlcNAc)₅ hemmten auch die NO-Produktion, aber mit geringerer Wirksamkeit. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die positive Wirkung des aus Chitin bestehenden Materials auf die Wundheilung zumindest teilweise zurückzuführen ist auf die Hemmung der NO-Produktion von den aktivierten Makrophagen [23]. Es ist auch gezeigt worden, dass sowohl Glucosamin als auch N-Acetylglucosamin die NO-Produktion in normalen menschlichen Gelenkchondrozyten hemmen und das N-Acetylglucosamin einen neuartigen Mechanismus für die Hemmung von entzündlichen Prozessen aufweist [24].

[0012] Das Chitinase-ähnliche Protein YKL-40, auch menschliches Knorpel-Glycoprotein-39 (HC gp-39) genannt, ist ein Mitglied der Chitinasen der Familie 18 [25]. YK-40 wird durch Chondrozyten, Synovialzellen und Makrophagen sezerniert [26]. HC gp-39 (YKL-40) scheint in alternden Menschen und jungen Osteoarthritis-Patienten induziert zu werden [28]. Es ist berichtet worden, dass YKL-40 eine Rolle als Autoantigen in der rheumatischen Arthritis (RA) aufweist [29–31] und es in erkranktem osteoarthritischem Knorpel und in Osteophyten, aber nicht in nicht-erkranktem Gewebe exprimiert wird [32].

VERWEISE

1. Cho, Y.-W., et al., Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules*, 2000. 1(4): p. 609–614.
2. Tokuyasu, K., M. Ohnishi-Kameyama, und K. Hayashi, Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996. 60(10): p. 1598–1603.
3. Dunkel, C. und D. Knorr, Enhancement of chitin deacetylase activity in *Mucor rouxii* and *Absidia coerulea* with chitin and its detection with a nonradioactive substrate. *Food Biotechnology*, 1994. 8(1): p. 67–74.
4. Ilyina, A. V., N. Y. Tatarinova, und V. P. Varlamov, The preparation of low-molecular-weight chitosan using chitinolytic complex from *Streptomyces kurssanovii*. *Process Biochemistry*, 1999. 34(9): p. 875–878.
5. Li, T., R. Brzezinski, und C. Beaulieu, Enzymatic production of chitosan oligomers. *Plant Physiol. Biochem.*, 1995. 33(5): p. 599–603.
6. Staehelin, C., et al., N-deacetylation of *Sinorhizobium meliloti* Nod factors increases their stability in the *Medicago sativa* rhizosphere and decreases their biological activity. *Mol plant microbe interact*, 2000. 13(1): p. 72–79.
7. Kendra, D. F. und L. A. Hadwiger, Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, 1984. 8(3): p. 276–281.
8. van der Holst, P. P. G., H. R. M. Schalamán, und H. P. Spaik, Proteins involved in the production and per-

- ception of oligosaccharides in relation to plant and animal development. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001. 11: p. 608–616.
9. Lee, J. Y. und A. P. Spicer, Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin Cell Biol*, 2000. 12: p. 581–586.
10. Alberts, B., et al., *The Cell*. Third Ed. ed. 1994, New York & London: Garland Publishing, Inc. 1294.
11. Breborowicz, A., et al., The effect of N-acetylglucosamine as a substrate for in vitro synthesis of glycosaminoglycans by human peritoneal mesothelial cells and fibroblasts. *Advances in Peritoneal Dialysis*, 1998. 14: p. 31–35.
12. Yoshida, M., et al., In vitro synthesis of hyaluronan by a single protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(1): p. 497–506.
13. Semino, C. E. und M. L. Allende, Chitin oligosaccharides as candidate patterning agents in zebrafish embryogenesis. *Int J Dev Biol*, 2000. 44(2): p. 183–93.
14. Rosa, F., et al., Accumulation and decay of DG42 gene products follow a gradient pattern during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol*, 1988. 129(1): p. 114–23.
15. Semino, C. E., et al., Homologs of the *xenopus* developmental gene DG42 are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. 93: p. 4548–4553.
16. Bakkers, J., et al., An important developmental role for oligosaccharides during early embryogenesis of cyprinid fish. *Proc. natl. acad. sci. USA*, 1997. 94: p. 7982–7986.
17. Sherman, W. T. und R. W. Gracy, *Treatment of osteoarthritis by administering poly-N-acetyl-D-glucosamine* US6, 851, Editor. 2000, Lescarden Inc: USA.
18. Suzuki, M., et al., Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 2002. 50(8): p. 1081–1089.
19. Merayo-Llves, J. M., et al., Chitosan modulate corneal wound healing and increase corneal transparency in an experimental model of photorefractive keratectomy (PRK). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2000. 41 (4): p. 3621B719.
20. Sugamori, T., et al., Local hemostatic effects of microcrystalline partially deacetylated chitin hydrochloride. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000. 49(2): p. 225–232.
21. Ueno, H., et al., Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials*, 2001. 22(12): p. 1667–1673.
22. Ueno, H., et al., Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials*, 2001. 22(15): p. 2125–2130.
23. Hwang, S. M., et al., Chitinous materials inhibit nitric oxide production by activated RAW 264. 7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. 271(1): p. 229–233.
24. Shikhman, A. R., et al., N-acetylglucosamine prevents IL-1 β -mediated activation of human chondrocytes. *J. Immunol.*, 2001. 166(8): p. 5155–5160.
25. Hakala, B. E., C. White, und D. Recklies, Human Cartilage gp-39, a major Secretory Product of Articular Chondrocytes and Synovial Cells, Is a Mammalian Member of a Chitinase Protein Family. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993. 268(34): p. 25803–25810.
26. Kirkpatrick, R. B., et al., Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Experimental Cell Research*, 1997. 237(1): p. 46–54.
27. De Ceuninck, F., et al., Development of an enzymelinked immunoassay for the quantification of YKL-40 cartilage gp-39 in guinea pig serum using hen egg yolk antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 2001. 252: p. 153–161.
28. Dozin, B., et al., Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. *Matrix biology*, 2002. 21: p. 449–459.
29. Boots, A. M. H., G. F. M. Verheijden, und E. S. Bos, Proteins and novel peptides derived from autoantigen for use in immunotherapy of autoimmune diseases, in 19 pp., *Cont-in-part of U.S. 5,736,507*. 1996, Akzo Nobel N.V., Neth.: U.S.
30. Cope, A. P., et al., T cell responses to a human cartilage autoantigen in the context of rheumatoid arthritis-associated and nonassociated HLA-DR4 alleles. *Arthritis and Rheumatism*, 1999. 42(7): p. 1497–1507.
31. Volck, B., et al., YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix Protein of specific granules in human neutrophils. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 1998. 110(4): p. 351–360.
32. Connor, J., et al., Human cartilage glycoprotein 39 (HC gp-39) mRNA expression in adult and fetal chondrocytes, osteoblasts and osteocytes by in-situ hybridization *Osteoarthritis and Cartilage*, 2000. 8(2): p. 87–95.
33. Bahrke, S., et al., Sequence analysis of Chitooligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Postsource Decay Mass Spectrometry. *Biomacromolecules*, 2002. 3(4): p. 696–704.

34. Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 1959. 31(3): p. 426–428.

KURZDARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0013] Wir haben nun gefunden, dass Zusammensetzungen, die Chito-Oligomere (2- bis 50-mer) umfassen, bemerkenswert gute Ergebnisse in der Linderung der Symptome von Gelenkerkrankungen wie Arthritis bereitstellen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in dieser Beziehung die Chito-Oligomere überraschenderweise wirksamer zu sein scheinen als monomeres Glucosamin, insbesondere da die Verabreichung der Oligomere die Entzündungen wesentlich vermindert. Wir schlagen vor, dass chitinöse Liganden, d.h. Chito-Oligosaccharide (COs), durch Bindung an YKL-40 oder gleichartige Chitinase-ähnliche Proteine wirken können, ihre Expression und/oder ihre Autoantigen-Aktivität durch Maskieren oder durch Verändern ihrer Epitope zu reduzieren.

[0014] Wir haben entzündungshemmende Wirkungen in menschlichen Testpersonen, die an rheumatoider Arthritis leiden, nach der Verabreichung von Chito-Oligomeren für 3–4 Wochen beobachtet. Diese entzündungshemmenden Wirkungen könnten möglicherweise Chondrozyten, Makrophagen und möglicherweise auch Osteoblasten via YKL-40 beeinflussen.

[0015] Vorläufige Ergebnisse weisen auf die Induktion des Wachstums menschlicher Chondrozyten in vitro hin, wenn sie mit Chito-Oligomeren inkubiert werden (unveröffentlichte Daten).

[0016] Gemäß der hierin vorgestellten Hypothese stellen die Oligomer-Zusammensetzungen der Erfindung vorteilhafte oligomere Substrate bereit, die Chitinase-ähnliche Proteine blockieren, und sie stellen auch die bekannten vorteilhaften Wirkungen der monomeren NAG und GlcN bereit, wenn die Oligomere abgebaut werden.

[0017] Es ist hierin weiter postuliert, dass teilweise deacetyliertes, polymeres, wasserlösliches Chitin desgleichen entzündungshemmende Wirkungen und einen therapeutischen Effekt gegen Gelenkerkrankungen bereitstellen wird, da solche wasserlöslichen Polymere einigen Abbau durch saure Chitinase und möglicherweise chitolytische Enzyme zulassen, die durch die Darmflora bereitgestellt werden, durch die in situ Bereitstellung wasserlöslicher Chito-Oligomere und NAG- und Glucosamin-Monomeren.

[0018] In einem ersten Aspekt stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, wie in Anspruch 8 festgelegt, bereit, wobei die Oligomere Kettenlängen in dem Bereich von etwa DP 2–50 aufweisen und wobei der Deacetylierungsgrad von den Oligomeren in dem Bereich von etwa 0–70 ist.

[0019] Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt die Verwendung der Chito-Oligomere für die Herstellung von einem Arzneimittel zur Behandlung von Gelenkerkrankungen bereit, wobei die Chito-Oligomere Oligomere von N-Acetylglucosamin (NAG) und Glucosamin umfassen, wobei die Kettenlänge von den Chito-Oligomeren in dem Bereich von etwa 1–50 ist, wobei mindestens 60 Gew.-% von den Chito-Oligomeren eine Kettenlänge von 2 oder höher aufweisen und wobei der Deacetylierungsgrad von Glucosamin in dem Bereich von etwa 0–50 liegt.

[0020] Die Erfindung stellt in einem weiteren Aspekt die Verwendung von Chito-Oligomeren zur Herstellung von einem Arzneimittel für die Behandlung gegen entzündliche Aktivität in dem menschlichen Körper bereit.

LEGENDEN ZU DEN FIGUREN

[0021] [Fig. 1](#). Biogel P4 GPC-Analyse von Probe 1. DP (Polymerkettenlänge) und Homologe von jeder Kettenlänge sind in Tabelle 1 aufgeführt.

[0022] [Fig. 2](#). Homolog-Verteilung der Chito-Oligomere in Probe 1 und 2, wie durch MALDI-TOF von den gesamten Proben bestimmt. Das relative Signal von der Analyse ist durch Addition der Signale für alle Homologe von DP 2 bis DP 10 und Anpassen auf 100 kalkuliert. Das Signal für jedes Homolog ist als relatives Signal (%) wiedergegeben.

[0023] [Fig. 3](#). Kombinierte DP-Verteilung von Chito-Oligomeren von Probe 1 und 2, wie durch MALDI-TOF MS beurteilt. Homologe für jedes DP, von DP 2 bis DP 10, werden, wie in [Fig. 2](#) gezeigt, addiert und als kombinierte relative Signale (%) wiedergegeben.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0024] Die Zusammensetzung der Erfindung umfasst Oligomere von N-Acetylglucosamin (NAG) und Glucosamin, wobei die Chito-Oligomere eine Kettenlänge in dem Bereich von etwa 2–50 aufweisen und wobei der Deacetylierungsgrad von den Oligomeren in dem Bereich von etwa 30–50% ($F_A = 0,5 - 0,7$) liegt.

[0025] Die Bezeichnung Chito-Oligomere, wie sie hierin verwendet wird, bezieht sich auf Oligomere und Polymere von einem oder von beiden von N-Acetylglucosamin (NAG) und Glucosamin, d.h. Oligomerketten mit einer minimalen Kettenlänge von 2 (Dimere). Wie hierin und in den dargelegten Beispielen beschrieben, ist die Zusammensetzung insbesondere nützlich für die Verwendung als ein Arzneimittel.

[0026] Die Bezeichnung Homolog definiert gleich lange Oligomerketten mit demselben Verhältnis an Monomeren, welche eine unterschiedliche Sequenz aufweisen können, d.h. das Homolog A3D2 kann z.B. die Oligomersequenzen A-A-A-D-D und A-A-D-A-D umfassen. (A und D beziehen sich auf N-Acetylglucosamin, beziehungsweise Glucosamin).

[0027] Vorzugsweise befindet sich der Deacetylierungsgrad von den Chito-Oligomeren in dem Bereich von etwa 35–50%, wie zum Beispiel etwa 40–50%, einschließlich etwa 40% oder etwa 50%. Der Deacetylierungsgrad DDA kann auch als Acetylierungsfaktor F_A wiedergegeben werden, wo z.B. DDA von 30% einem $F_R = 0,7$ entspricht.

[0028] Vorzugsweise weisen mindestens etwa 60% von den Chito-Oligomeren eine Kettenlänge in dem Bereich von etwa 2–50 auf und insbesondere mindestens etwa 75% und noch bevorzugter mindestens etwa 85%.

[0029] Die Zusammensetzungen der Erfindung können geeigneterweise aus chitinhaltigem Rohmaterial, wie zum Beispiel Krabbenschalen, erhalten werden. Chitin wird vorteilhafterweise mit einer starken Base deacetyliert, wie zum Beispiel durch Auflösen von im Wesentlichen trockenem Chitin in einer konzentrierten Baselösung (z.B. 40–60% NaOH oder KOH), bei einer Temperatur in dem Bereich von etwa 70–100°C, einschließlich von dem Bereich von etwa 70–85°C, wie zum Beispiel etwa 70 bis 90°C, z.B. etwa 70°C, etwa 80°C oder etwa 90°C. Die Zeit der Reaktion und der Konzentration von Chitin kann abhängig von dem gewünschten Deacetylierungsgrad abgewandelt werden und kann leicht für irgendeine besondere Verarbeitungseinheit und einen besonderen erwünschten Deacetylierungsgrad optimiert werden. Die Reaktion wird durch Waschen des erhaltenen Chitin/Chitosan mit kaltem Wasser angehalten und die resultierende lösliche Chitinlösung kann einer Hydrolyse unterzogen werden, um Chito-Oligomere zu erhalten oder das Material kann mit geeigneten Trocknungsmitteln für eine nachfolgende weitere Verarbeitung oder Lagerung getrocknet werden.

[0030] Wie erwähnt, ist die enzymatische Hydrolyse von dem Chitin/Chitosan bevorzugt, um die Chito-Oligomere zu erhalten, jedoch ist die Verwendung von geeigneten Mineralsäuren zur Depolymerisation (z.B. Salzsäure oder salpetrige Säure) auch durch die gegenwärtige Erfindung umschlossen. Verschiedene Chitina-se-aktive Enzyme sind erhältlich und können in dieser Hinsicht eingesetzt werden, z.B. Chitinase (EC Nr. 3.2.1.14), erhältlich von Sigma-Aldrich, auch für Lysozym (EC Nr. 3.2.1.17) wurde gefunden, dass es Chitinase-Aktivität aufweist (siehe z. B. U.S. Patentschrift Nr. 5,262,310). Die Enzyminkubationsbedingungen (Enzym/Substrat-Verhältnis, Temperatur, pH-Wert, Reaktionszeit) können variiert werden, abhängig von der spezifischen Aktivität und den optimalen Reaktionsbedingungen von dem eingesetzten Enzym. Wie in Beispiel 2 demonstriert (siehe Probe 1 und 2; Herstellung) können die Bedingungen optimiert werden, um ein erwünschtes Verhältnis von kleinen und mittelgroßen Oligomeren zu erhalten. Längere Oligomere und Polymere (DP 30 und höher) können wahlweise von den erwünschten kurzen und mittellangen Oligomeren abgetrennt werden, entweder durch präparative Chromatographie oder durch Präzipitation bei einem hohen pH-Wert (etwa pH 9 oder höher).

[0031] Die Chito-Oligomer-Zusammensetzung kann in geeigneter Weise in einer im Wesentlichen trockenen Form bereitgestellt werden, umfassend ein Pulver, Flocken oder Fasermaterial, welches zur Einnahme verkapselt oder gelöst oder in einer wässrigen Lösung suspendiert sein kann. Solch eine Zusammensetzung kann im Wesentlichen nur aus den oben erwähnten Oligomeren bestehen, d. h. in dem Bereich von etwa 80–100 Gew.-% der Chito-Oligomere. In nützlichen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung in dem Bereich von 20–100 nach Gewicht die Oligomere, einschließlich etwa 25–95 Gew.-%, wie zum Beispiel 50–90 Gew.-%. Abhängig von dem Herstellungsverfahren kann die Zusammensetzung signifikante Mengen von Salz außer dem Salz der Oligomere enthalten, z.B. NaCl oder KCl, aber vorzugsweise ist der Gehalt von solchen Extra-Salzen minimal gehalten. Abhängig von dem Verfahren und den Bedingungen, die während der Hydrolyse von dem Rohmaterialpolymer angewendet wurden, sind normalerweise irgendeine Menge der Monomere

von Glucosamin und NAG in den Zusammensetzungen der Erfindung enthalten, wie zum Beispiel in der Menge von 0–60 Gew.-% der gesamten Saccharidmenge, wie zum Beispiel weniger als etwa 50 Gew.-%, aber vorzugsweise sind die Monomere weniger als etwa 40 Gew.-% von der gesamten Saccharidmenge und als da sind weniger als etwa 25 Gew.-%, einschließlich weniger als etwa 20 Gew.-%. Unsere Testergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass eine gewisse Menge der Monomere, insbesondere NAG, die in den Zusammensetzungen von der Erfindung vorhanden sind, einen positiven synergistischen Effekt aufweisen können.

[0032] Die Zusammensetzung kann weiterhin ein pharmazeutisch unbedenkliches Hilfsmittel oder Verdünnungsmittel, eine Geschmackssubstanz, ein Nährstoff oder einen Farbstoff umfassen.

[0033] Von den kürzeren Oligomeren wird postuliert, dass sie für die Aktivität von der Zusammensetzung der Erfindung höchst wichtig sind. In einer gebräuchlichen Ausführungsform weisen mindestens etwa 10 Gew.-% der Oligomere von der Zusammensetzung eine Kettenlänge von 2 bis 12 auf, insbesondere mindestens 15 Gew.-%, einschließlich mindestens 25 Gew.-% und sogar noch bevorzugter weisen mindestens 50 Gew.-% von den Oligomeren eine Kettenlänge von 2 bis 12 auf. In einer bestimmten Ausführungsform weisen etwa 15 bis 75 Gew.-% der Oligomere eine Kettenlänge von 2 bis 12 auf, wie etwa zum Beispiel 50 Gew.-% der Oligomere, vorzugsweise weisen etwa 15 bis 75 Gew.-% von den Oligomeren eine Kettenlänge in dem Bereich von 2 bis 9 auf. In bestimmten Ausführungsformen weisen mindestens 50 Gew.-% der Oligomere eine Kettenlänge in dem Bereich von 2 bis 15 auf, wie zum Beispiel mindestens 60 Gew.-%, einschließlich mindestens 70% oder mindestens etwa 80%.

[0034] In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, die die Oligomerzusammensetzung der Erfindung, wie hierin beschrieben, umfasst.

[0035] Die pharmazeutische Zusammensetzung soll vorzugsweise in einer Form sein, die für die orale Verabreichung geeignet ist, wie zum Beispiel als eine Trockenform, welche leicht aufgelöst werden kann, z.B. in einem Glas Wasser. Solche Formen schließen Trockenpulver-, Granulat-, Flocken-, Faser- und Pastenformen ein. Die Zusammensetzung kann jedoch auch in Pillen oder Kapseln enthalten sein.

[0036] In anderen gebräuchlichen Ausführungsformen ist die Zusammensetzung der Erfindung in einer Form, die für die systemische Verabreichung geeignet ist, wie zum Beispiel intramuskuläre, subkutane oder intravenöse Verabreichung. Solche geeigneten Formen sind Lösungsformen mit einem pharmazeutisch unbedenklichen Trägerstoff oder Hilfsstoff gemäß pharmazeutischen Standardverfahren. Die Lösungsformen sind steril und der pH-Wert ist geeignet eingestellt und gepuffert. Für die intravenöse Verwendung sollte die Gesamtkonzentration der gelösten Substanz kontrolliert werden, um die Präparation isotonisch zu machen.

[0037] Wie in den begleitenden Beispielen demonstriert, ist die pharmazeutische Zusammensetzung brauchbar gefunden worden als Behandlung von rheumatischen Gelenkerkrankungen in einer Testperson, die diese braucht, sie ist insbesondere brauchbar gefunden worden für die Behandlung von einer Gelenkerkrankung ausgewählt aus der Gruppe die Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis umfasst. In diesem Zusammenhang umschließt die Behandlung das Lindern der Symptome von der Gelenkerkrankung in einer Testperson, an welche die Zusammensetzung verabreicht wird.

[0038] In noch einem weiteren Aspekt wird eine Zusammensetzung bereitgestellt für die entzündungshemmende Behandlung und die Behandlung von Gelenkerkrankungen, die wasserlösliches teilweise deacetyliertes Chitin mit einem Deacetylierungsgrad in dem Bereich von etwa 35 bis etwa 50% umfasst. Die Wasserlöslichkeit von dem Polymer gestattet einen geringen Abbau von dem Polymer durch chitolytische Enzyme, die durch die Darmflora produziert werden, folglich stellt die Zusammensetzung, wenn sie eingenommen wird, in situ wasserlösliche Chito-Oligomere und Glucosamin-Monomere bereit, dabei mit demselben Ausmaß wie die vorhergehend diskutierten hydrolysierten Chito-Oligomere.

[0039] In noch einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung von solchen Chito-Oligomeren wie oben beschrieben für die Herstellung von einem Arzneimittel zur Behandlung von Gelenkerkrankungen wie zum Beispiel Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis bereit.

[0040] In einem weiteren Aspekt wird die Verwendung von den vorstehend beschriebenen Zusammensetzungen zur Behandlung gegen entzündliche Aktivität in dem menschlichen Körper bereitgestellt, sowie die Verwendung von den Zusammensetzungen zur Herstellung von einem Arzneimittel zur Behandlung gegen entzündliche Aktivität in Knochen- und Magergeweben.

BEISPIELE

Beispiel 1: Charakterisierung von Chito-Oligomeren: Analytische Methoden

1A: Bestimmung des Wasser- und Aschegehaltes

[0041] Eine Probe von 4–5 g sprühgetrockneter Chito-Oligomere wurde durch Gewichtsbestimmung vor und nach der Inkubation bei 105°C für 3 Stunden auf den Wassergehalt analysiert. Der Aschegehalt wurde durch vollständige Verbrennung bei 800°C für 3 Stunden bestimmt und als Gewichtsprozent des anorganischen Rückstandes auf der Basis des Trockengewichtes berechnet.

1B: Bestimmung des Deacetylierungsgrades durch direkte Titration

[0042] Chito-Oligomere (500 mg, korrigiert für Feuchtigkeit und Asche) wurden mit 125 ml 0,060 N HCl in einem abgedichteten Erlenmeyer-Kolben gemischt und über Nacht bei 22°C in einem Rotationsschüttler (150 min⁻¹) aufgelöst. Nachfolgend wurden 125 ml destilliertes Wasser hinzugefügt und die Lösung wurde weiter für mindestens 15 Minuten geschüttelt. 50,0 g der Lösung wurden in ein Becherglas überführt und mit 0,500 N NaOH-Lösung unter Verwendung einer Flussgeschwindigkeit von 1,00 ml/min (HPLC-Pumpe) titriert. Der pH-Wert wurde zwischen pH 1,8 bis 9 kontrolliert und der DDA wurde auf der Basis von dem zwischen den Wendepunkten der Titrationskurve, von pH 3,75 bis 8,0, verbrauchten Volumen NaOH unter Verwendung der Gleichung $DDA = \text{Vol. (ml) NaOH} \cdot 0,0500 / 100 \text{ mg Chitosan}$ berechnet. Jede Probe wurde in dreifacher Ausfertigung titriert.

1C: DNS-Assay zur Bestimmung des durchschnittlichen Polymerisationsgrades (DP)

[0043] Der durchschnittliche Polymerisationsgrad (DP-Wert) von der 0,50% Oligomerlösung wurde durch einen Endpunkttest der Zuckerreduzierung unter Verwendung von 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) als Reagenz und Glucose als Standard gemessen. Diese Methode ist ursprünglich durch Miller [34] beschrieben. Ein Volumen von 1,00 ml Chitosan-Oligomerlösung (5,00 mg/ml, korrigiert für Feuchtigkeit und Asche in 0,5% Essigsäure) wurde mit 2,00 ml DNS-Reagenz gemischt, für 8 Minuten gekocht, abgekühlt und bei 2.000 × g für 3 Minuten zentrifugiert. Die optische Dichte von dem Überstand wurde in einem Spektralfotometer bei 540 nm gemessen und der durchschnittliche DP-Wert wurde unter Verwendung der Absorption von 1,00 mg/ml (5,55 mM) Glucose als Standard berechnet. Wasser (1,00 ml in 2,00 ml DNS-Lösung) diente als eine Leerprobe bei 540 nm. Das Durchschnittsmolekulargewicht, das für die Berechnung von DP verwendet wurde, war 200 Da. Jede Probe wurde in zweifacher Ausfertigung getestet.

1D: BioGel-P4 Gelpermeationschromatographie-Analyse (GPC)

[0044] Zwei serielle Säulen (Pharmacia) mit BioGel-P4, feine Qualität (BioRad, München, Deutschland), wurden unter Verwendung von 0,05 M Ammoniumacetat-Puffer als mobile Phase, eingestellt auf pH 4,2 mit 0,23 M Essigsäure, äquilibriert. Die Flussgeschwindigkeit betrug 27,7 ml/Std. Der Nachweis wurde mit einem Shimadzu RID 6A Brechungsindex-Detektor durchgeführt. Die Fraktionen wurden gesammelt, entsprechend vereinigt und vor der MALDI-TOF MS-Analyse lyophilisiert.

1E: MALDI-TOF Massenspektrometrie-Analyse

[0045] Probenaufbereitung: Lösungen von den Proben in H₂O (1 µL) wurden auf das Target aufgetragen und mit 1 µL einer 5%-igen Lösung von THAP oder DHB in MeOH gemischt. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurde die Probe in 1 µL MeOH wieder aufgelöst, um eine dünne Schicht von sehr feinen Kristallen zu ergeben, wenn sie bei Raumtemperatur getrocknet wurde.

[0046] Die Massenspektren wurden mit einem Bruker Reflex II Instrument (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) aufgenommen, wie weiter ausführlich beschrieben in [34].

Beispiel 2: Herstellung von Chito-Oligomeren (COs), die für die orale Verabreichung gegen Arthritis verwendet wurden.

Herstellung von Probe 1 (G000823-1K):

[0047] Natriumhydroxid, 25 kg, wurde in 25 kg Wasser in einem 80-L Mixgerät aufgelöst und auf 70°C erhitzt.

Krabbenchitin (Primex ehf.), 2,5 kg, wurden hinzugefügt und für 20 Minuten gerührt (15 min^{-1}). Die Aufschläm-mung wurde dann mit Wasser gekühlt, durch einen Baumwollbeutel ($200 \times 40 \text{ cm}$) filtriert und für 10–15 Minuten gewaschen. Das Chitin-Gel wurde zurück in das Mixgerät überführt, der pH-Wert auf 4 durch Hinzufügen von 30 HCl eingestellt und Wasser hinzugefügt, um ein Volumen von 80 L zu ergeben. Chitinase-Lösung, 380 g (750 U/g), wurden hinzugefügt und das Gel für 16 Stunden bei 30°C gerührt. Das Enzym wurde durch Einstellen des pH-Wertes auf 7 und Erhitzen der Lösung auf 70°C für 10 Minuten denaturiert. Nach dem Abkühlen wurde die Oligomerlösung durch ein Sieb mit $280 \mu\text{m}$ Maschenweite gegossen. Die Lösung wurde einer Sprühtrocknung unter Verwendung eines rotierenden Zerstäubungstrockner-Gerätes bei einer Luftereinlass-temperatur von $190 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Luftaustrittstemperatur von 80°C unterzogen. Die Rotorgeschwindigkeit des Trockners betrug 20.000 min^{-1} . Das feine weiße Chitosanpulver, 2,0 kg, bezeichnet als Probe 1, wurde gesammelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Analyse von Probe 1

[0048] Die sprühgetrocknete Chito-Oligomer-Probe wurde auf Wasser- und Aschegehalt analysiert. Der Aschegehalt betrug 53,7% (w/w) und Wasser 5,4% (w/w). Chito-Oligomere und Monomere betrugen 40,9% (w/w). Der Deacetylierungsgrad (DDA) betrug 42,3% \pm 0,1% (SD). Biogel-P4 GPC ([Fig. 1](#)) gefolgt durch MALDI-TOF-Analyse (Tabelle 1) zeigte, dass das Monomer (DP 1) hauptsächlich N-Acetylglucosamin (GlcNAc) ist, mit einem geringfügigen Vorkommen von N-Glucosamin (GlcN). Die Dimere (DP 2) waren eine Gemisch aus (GlcNAc) und (GlcNAc)(GlcN). Die Trimere (DP 3) enthielten (GlcNAc)₂(GlcN) als Hauptprodukt und (GlcNAc)₃ als ein Nebenprodukt. Die Sequenz von dem hauptsächlich Trimerprodukt wurde bestimmt als GlcN-GlcNAc-GlcNAc oder D-A-A. Längere Oligomere (DP 4 bis DP 20) wurden in kleineren Mengen gefunden, wie nach der Biogel-P4 Analyse zu urteilen. Die Existenz von mittellangen Oligomeren wurde sowohl durch Biogel-P4 und MALDI-TOF MS-Analyse bestätigt.

Tabelle 1. MALDI-TOF MS von Biogel-P4 GPC-Höchstwerten aus Probe 1, wie in Figur 1 gezeigt. Jeder nummerierte Höchstwert wurde gesammelt und durch MALDI-TOF MS analysiert. Die Tabelle zeigt die Fraktionsnummer und die berechneten Oligomere und Homologe von jeder Fraktion.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
D8A4	D6A3	D4A3	D3A3	D2A3	D1A3	D2A2	D1A2	A2	A2	A
D7A5	D5A4	D3A4		D3A3	D3A2	D1A3		D1A2		
D6A6	D4A5	D2A5		D4A2	D2A3					
	D7A3									
	D6A4									
	D5A5									
A = GlcNAc und D = GlcN.										

Herstellung von Probe 2 (G010430-1K):

[0049] Diese Probe wurde im Wesentlichen durch dasselbe Protokoll hergestellt wie für Probe 1 beschrieben, abgesehen von der Enzyminaktivierung (pH-Wert eingestellt auf 8,0 durch 10% NaOH) und dem Sieben, die Lösung wurde geklärt durch Verwendung von einer Alfa-Laval Durchflusszentrifuge (Type: LAPX) bei 9.800 min^{-1} . Der Flüssigkeitsstrom betrug 520 ml/Min. und der Rotor wurde alle 3–5 Minuten entleert. Das Pellet wurde verworfen und die klare Oligomerlösung wurde wie in Beispiel 2 sprühgetrocknet. Die Produktausbeute betrug 1,74 kg Pulver.

Analyse von Probe 2

[0050] Der Aschegehalt dieser Probe wurde mit 48,3% (w/w) gemessen, wobei der NaCl-Gehalt 47,0% betrug. Der Wassergehalt betrug 5,0% (w/w). Chito-Oligomere und Monomere betrugen 46,7% (w/w). Der Deacetylierungsgrad (DDA) betrug 38,7% \pm 0,9.

[0051] Die MALDI-TOF MS-Analysen von Probe 1 und 2 sind in [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) gezeigt. [Fig. 2](#) lässt die Homologverteilung der Chito-Oligomere von DP 2 bis DP 10 erkennen. Die Homologverteilung ist zwischen den zwei Proben ein bisschen verschieden. Durch Hinzufügen der unterschiedlichen Homologen für dasselbe DP ist es offensichtlich, dass die DP-Verteilung für beide Proben ähnlich ist, wie in [Fig. 3](#) gezeigt. Es ist von großer

Wichtigkeit zu berücksichtigen, dass die Intensitätssignale für die unterschiedlichen Oligomere in der MAL-DI-TOF-Analyse qualitative Signale sind, und nicht quantitative, und insbesondere dass die Höchstwerte der höheren Oligomere mit relativ niedriger Intensität als die Höchstwerte der niederen Oligomeren auftreten können.

Beispiel 3: Orale Verabreichung von Chito-Oligomeren (COs)

[0052] Testpersonen, die an Arthritis leiden, nahmen täglich Dosen von 3,0 g (1 Teelöffel; 5,0 ml, 1223 mg COs) des sprühgetrockneten Chito-Oligomer-Pulvers von Probe 1, aufgelöst in Wasser, für mindestens 5 Wochen bis zu zwei Jahren ein. Zwei von diesen Patienten unterbrachen die Verabreichung für die Dauer von 5–6 Wochen nach einer durchgehenden Einnahme und starteten dann mit der Einnahme von 2,9 g von Probe 2 (1 Teelöffel; 5,0 ml, 1331 mg COs).

Ergebnisse der Verabreichung

Testperson 1: Behandlung von rheumatoider Arthritis

[0053] Eine weibliche Testperson, Alter 55 Jahre, litt an rheumatoider Arthritis. Die Gelenke von beiden Händen waren stark geschwollen. Die Finger waren steif und ihre Bewegung verursachte Schmerzen. Die Testperson nahm 3 g des Chito-Oligomer-Pulvers von Probe 1 täglich ein. Die Testperson bemerkte eine signifikante Verbesserung nach 4 bis 5 Wochen. Es war eine bemerkenswerte Linderung der Symptome vorhanden, die Entzündung ließen nach und die Gelenke der Finger erschienen wieder normal. Es gab eine Linderung der Schmerzen und die Testperson konnte ihre Finger freier bewegen, was es ihr ermöglichte, schwierige Arbeit wieder zu tun. Nach etwa 2 Monaten unterbrach sie die Einnahme des Chito-Oligomer-Pulvers für 5–6 Wochen. Nach 3 bis 4 Wochen kamen die Arthritis-Symptome schrittweise wieder zurück. Zwei bis drei Wochen nach dem Einstellen startete sie die tägliche Verabreichung wieder unter Verwendung von 2,9 g von Probe 2 (1331 mg COs), was in der berichteten Linderung in 4 bis 5 Wochen nach dem zweiten Start von der Verabreichung resultierte. Die Testperson hat eine tägliche Dosis von Probe 1, 2 und gleichartiger Chito-Oligomer Produktion ohne Entzündung und Schmerzen für etwa 21 Monate eingenommen.

Testpersonen 2–4: Behandlung von rheumatoider Arthritis

[0054] Die Testpersonen litten an rheumatoider Arthritis. Sie nahmen 3,0 g des Chito-Oligomer-Pulvers von Probe 2 täglich ein. Nach einem Monat berichteten die Testpersonen eine signifikante Linderung der RA-Symptome. Die Entzündung (geschwollene Gelenke) war gelindert und die Gelenke waren weniger steif.

Testpersonen 5–14: Behandlung von Osteoarthritis

[0055] Zehn Testpersonen, die an Osteoarthritis leiden, nahmen jeweils täglich 3,0 g von Probe 1, 2,9 g von Probe 2 und gleichartiger Chito-Oligomer Produktion. Nach 2 bis 4 Wochen berichteten 8 Testpersonen positive Ergebnisse, die Entzündung und der Schmerz waren vermindert. Zwei Testpersonen berichteten keine Linderung der Symptome.

[0056] Für alle untersuchten Testpersonen wurde kein signifikanter Unterschied in der Linderung der Symptome zwischen Probe 1 und 2 gefunden. Variationen in der Probenherstellung, verschieden zu Probe 1 und 2 (höherer DDA, höherer DP) haben nicht zu einer Verbesserung in der Anti-Arthritis-Aktivität geführt, wie durch die Testpersonen beurteilt. Weitergehende Untersuchungen sind im Gange.

Patentansprüche

1. Verwendung wasserlöslicher Chito-Oligomere von N-Acetylglucosamin (NAG) und Glucosamin zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen ausgewählt aus der Gruppe, die Gelenkerkrankungen einschließlich Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis, entzündliche Erkrankungen und andere rheumatische Zustände umfasst, wobei sich die Kettenlänge der Chito-Oligomere im Bereich von etwa 2–50 befindet und wobei sich der Deacetylierungsgrad im Bereich von etwa 0–70% befindet.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei sich der Deacetylierungsgrad der Chito-Oligomere im Bereich von etwa 30–50% befindet.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei mindestens etwa 10 Gew.% der Chito-Oligomere eine Kettenlänge

von 2 bis 12 aufweisen.

4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei etwa 15–75 Gew.% der Chito-Oligomere eine Kettenlänge von 2 bis 12 aufweisen.

5. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Gelenkerkrankung ausgewählt aus der Gruppe, die Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis umfasst.

6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Behandlung die Symptome der Gelenkerkrankung bei der Testperson lindert.

7. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Arzneimittel zur oralen Verabreichung bestimmt ist.

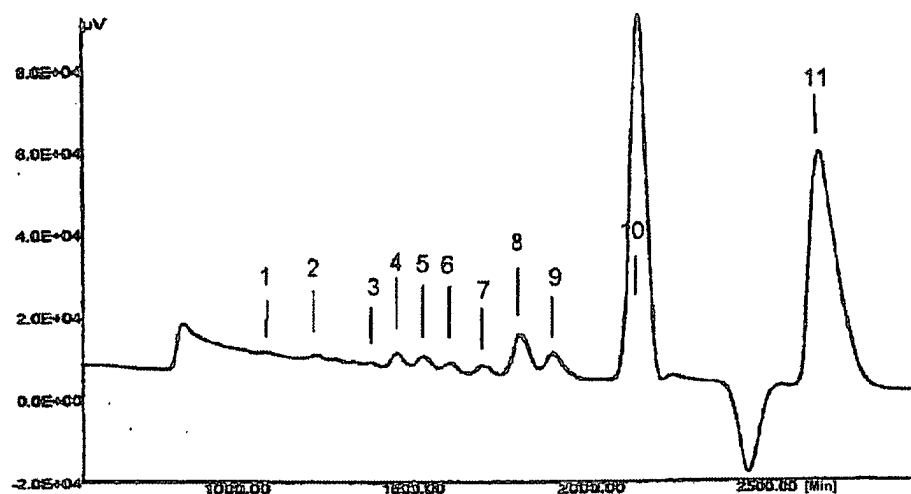
8. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen ausgewählt aus der Gruppe, die Gelenkerkrankungen einschließlich Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis, entzündliche Erkrankungen und anderer rheumatische Zustände umfasst, welche wasserlösliche Chito-Oligomere von N-Acetylglucosamin (NAG) und Glucosamin umfasst, wobei sich die Kettenlänge der Chito-Oligomere im Bereich von etwa 2–50 befindet und wobei sich der Deacetylierungsgrad im Bereich von 30–50% befindet.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei mindestens etwa 10 Gew.% der Chito-Oligomere eine Kettenlänge von 2 bis 12 aufweisen.

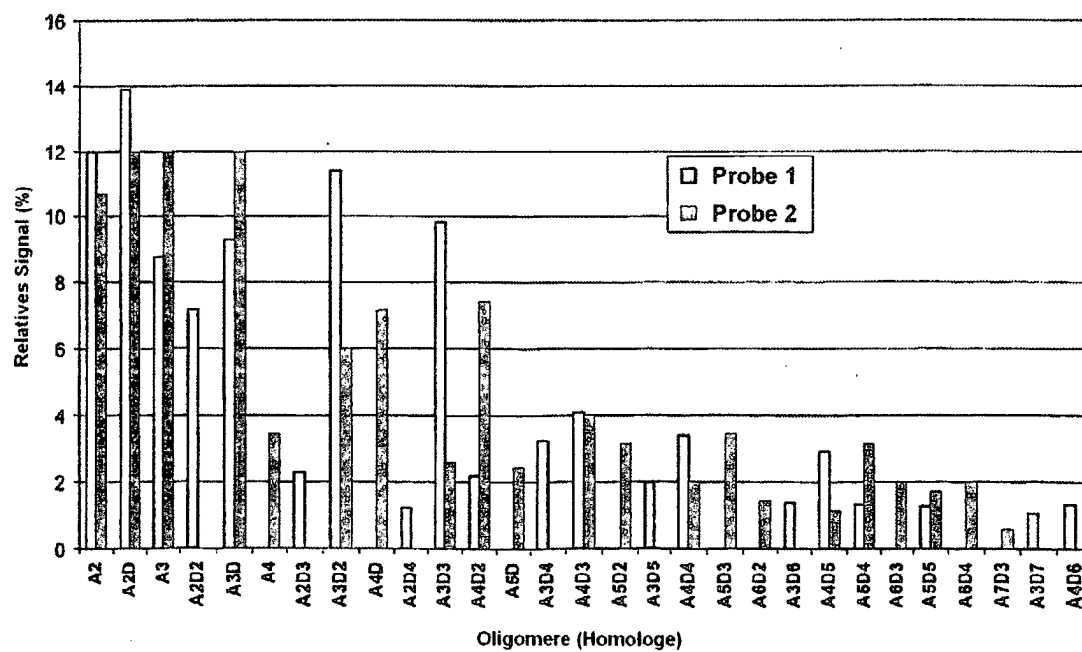
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei etwa 15 bis 75 Gew.% der Chito-Oligomere eine Kettenlänge von 2 bis 12 aufweisen.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung gegen Entzündungen und zur Behandlung von Gelenkerkrankungen, die wasserlösliches, teilweise deacetyliertes Chitin mit einem Deacetylierungsgrad im Bereich von etwa 35 bis etwa 50% umfasst.

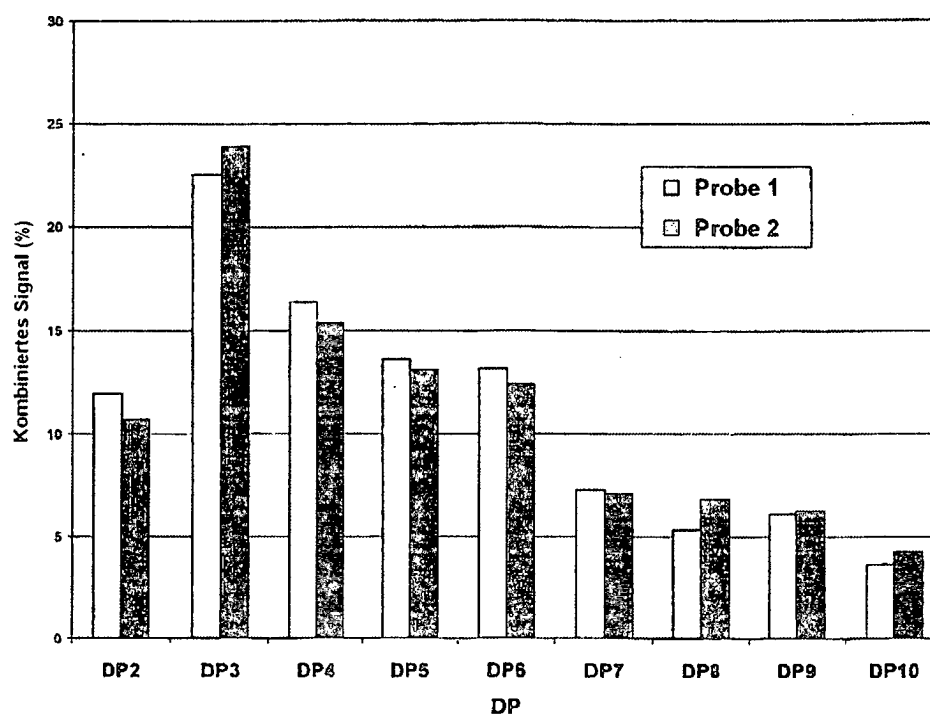
Es folgen 2 Blatt Zeichnungen



Figur 1



Figur 2



Figur 3