

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 639**

51 Int. Cl.:

A61K 31/353 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2019** **PCT/EP2019/051622**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2019** **WO19145356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2019** **E 19700956 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024** **EP 3743062**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de condrodisplasia relacionada con FGFR3**

30 Prioridad:

24.01.2018 EP 18305053

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

06.11.2024

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LARECHERCHE MÉDICALE) (20.0%)

101 rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

UNIVERSITÉ PARIS CITÉ (20.0%);

FONDATION IMAGINE (20.0%);

ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS

(APHP) (20.0%) y

UNIVERSIDAD DE GRANADA (20.0%)

72 Inventor/es:

LEGEAI-MALLET, LAURENCE;

SEGURA CARRETERO, ANTONIO y

CADIZ GURREA, MARIA DE LA LUZ

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 985 639 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de condrodisplasia relacionada con FGFR3

5 **Campo**

La presente invención se refiere a una (-)-epicatequina sustancialmente pura para su uso en el tratamiento de una condrodisplasia relacionada con FGFR3 en un paciente que lo necesita.

- 10 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una (-)-epicatequina sustancialmente pura como principio activo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en un método de tratamiento de una condrodisplasia relacionada con FGFR3 en un paciente que lo necesita, en la que la composición farmacéutica no es un extracto de Theobroma cacao.

15 **Antecedentes**

- Las "enfermedades raras" son enfermedades con una prevalencia particularmente baja. De esta manera, la Unión Europea considera que las enfermedades son raras cuando afectan a no más de 5 por cada 10.000 personas (Rodwell y Ayme, 2014a). Como ejemplo, la acondroplasia presenta una prevalencia estimada de 2,6 por cada 100.000 personas en la UE (Orphanet, 2014). En este sentido, las enfermedades raras se definieron por primera vez en el reglamento de la UE (CE) N°141/2000 (Reglamento (CE) N°141/2000 - del Parlamento Europeo y del Consejo del 16 de diciembre de 1999 sobre medicamentos huérfanos). En general, los pacientes con enfermedades raras están particularmente aislados y son psicológica, social, económica y culturalmente vulnerables, con una falta de políticas de salud específicas para estas enfermedades y escasez de experiencia, lo que se traduce en un diagnóstico retardado y acceso difícil a cuidados, tratamientos inadecuados o incluso dañinos y pérdida de confianza en el sistema de atención sanitaria (Orphanet, n.d.; Rodwell y Ayme, 2014b).

- Las tirosina cinasas receptoras (RTK) son receptores de la superficie celular que contribuyen a la señalización celular, pero algunas mutaciones en estos receptores están asociadas a enfermedades raras específicas. Las RTK desempeñan papeles fundamentales en el desarrollo, la reparación de tejidos y la homeostasis celular normal, así como en la mediación de las respuestas celulares a una amplia gama de señales extracelulares implicadas en la regulación de la proliferación, la migración, la diferenciación y la señalización de supervivencia celulares. Este tipo de RTK desempeña un papel esencial en la regulación de la homeostasis del cartilago, por ejemplo, diferenciación, proliferación y apoptosis de condrocitos, y se requiere para el desarrollo esquelético normal, así como para la regulación tanto de la osteogénesis como de la mineralización ósea posnatal por osteoblastos (UniProt, n.d.). La acondroplasia, una forma no mortal de la condrodisplasia, es el tipo más común de enanismo. Se debe principalmente a la mutación de nueva aparición y tiene una herencia autosómica dominante (Rousseau et al., 1994; Di Rocco et al., 2014). La mutación, que produce un aumento de la función de FGFR3, afecta a muchos tejidos, más sorprendentemente a la placa de crecimiento cartilaginoso y al hueso en el esqueleto en crecimiento, conduciendo a una variedad de manifestaciones y complicaciones. Como otras RTK, la unión del ligando, es decir, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), conduce a dimerización y transautofosforilación, lo que da como resultado la estimulación de su actividad tirosina cinasa (Huete et al., 2011). A niveles moleculares, pueden estar implicadas cuatro rutas de señalización principales para FGFR3: transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), fosfolipasa C γ (PLC γ) y fosfatidilinositol fosfato-3-cinasa-serina/treonina cinasa (PI3K-AKT; proteína cinasa B), y otras (Horton et al., 2007; Ornitz DM y Legeai-Mallet L 2017).

- El cacao (Theobroma cacao) es un cultivo internacional principal y económicamente importante que se ha vinculado con varios beneficios nutricionales, incluyendo una alta capacidad antioxidante. Estas propiedades saludables se han asociado con la fracción fenólica (Andújar et al., 2012; Cádiz-Gurrea et al., 2015). La subclase principal de flavonoides que se encuentran en el cacao son los flavanoles, particularmente los monómeros de (epi)catequinas, y sus oligómeros, también conocidos como procianidinas que varían de dímeros a decámeros (Cádiz-Gurrea et al., 2014). Se ha notificado que este extracto muestra un efecto inhibitorio tanto de FGFR3 activado con ligando de FGF2 como de la cascada de fosforilación relacionada con la señalización de FGFR3 (Legeai-Mallet y Segura-Carretero, 2015 y documento WO2016046375).

Sumario

- 60 Tal como se define por las reivindicaciones, la presente invención se refiere a una (-)-epicatequina sustancialmente pura para su uso en el tratamiento de una condrodisplasia relacionada con FGFR3 en un paciente que lo necesita.

- 65 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una (-)-epicatequina sustancialmente pura como principio activo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en un método de tratamiento de una condrodisplasia

relacionada con FGFR3 en un paciente que lo necesita, en la que la composición farmacéutica no es un extracto de Theobroma cacao.

Descripción detallada

5

Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o a los métodos de diagnóstico in vivo de la descripción y los ejemplos deben interpretarse como referencias a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

10

La presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de una condrodisplasia relacionada con FGFR3 en un paciente que lo necesita que consiste en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una (-)-epicatequina sustancialmente pura.

15

La presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una (-)-epicatequina sustancialmente pura para su uso en un método de tratamiento de una condrodisplasia relacionada con FGFR3 en un paciente que lo necesita.

20

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "condrodisplasia relacionada con FGFR3" signifique una enfermedad esquelética que está provocada por una activación aumentada anómala de FGFR3, en particular por la expresión de un mutante constitutivamente activo del receptor FGFR3, en particular un mutante constitutivamente activo del receptor FGFR3 tal como se describe más adelante. Tal como se usa en el presente documento, los términos "FGFR3", "tirosina cinasa receptora FGFR3" y "receptor FGFR3" se usan indistintamente a lo largo de la memoria descriptiva y se refieren a la totalidad de las isoformas de FGFR3 que se producen de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "variante de receptor FGFR3 constitutivamente activa", "mutante constitutivamente activo de FGFR3" o "FGFR3 mutante que presenta una actividad constitutiva" se usan indistintamente y se refieren a un mutante de dicho receptor que muestra una actividad biológica (es decir, que desencadena la posterior señalización) y/o que muestra una actividad biológica que es superior a la actividad biológica del receptor de tipo natural correspondiente en presencia de ligando FGF. Una variante de FGFR3 constitutivamente activa según la divulgación se elige en particular del grupo que consiste en (los residuos se enumeran según su posición en el precursor de la isoforma 1 del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3, 806 aminoácidos de longitud): un mutante en el que el residuo de serina en la posición 84 se sustituye por lisina (nombrado a continuación en el presente documento S84L); un mutante en el que el residuo de arginina en la posición 248 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento R200C); un mutante en el que el residuo de arginina en la posición 248 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento R248C); un mutante en el que el residuo de serina en la posición 249 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento S249C); un mutante en el que el residuo de prolina en la posición 250 se sustituye por arginina (nombrado a continuación en el presente documento P250R); un mutante en el que el residuo de asparagina en la posición 262 se sustituye por histidina (nombrado a continuación en el presente documento N262H); un mutante en el que el residuo de glicina en la posición 268 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento G268C); un mutante en el que el residuo de tirosina en la posición 278 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento Y278C); un mutante en el que el residuo de serina en la posición 279 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento S279C); un mutante en el que el residuo de glicina en la posición 370 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento G370C); un mutante en el que el residuo de serina en la posición 371 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento S371C); un mutante en el que el residuo de tirosina en la posición 373 se sustituye por cisteína (nombrado a continuación en el presente documento Y373C); un mutante en el que el residuo de glicina en la posición 380 se sustituye por arginina (nombrado a continuación en el presente documento G380R); un mutante en el que el residuo de valina en la posición 381 se sustituye por glutamato (nombrado a continuación en el presente documento V381E); un mutante en el que el residuo de alanina en la posición 391 se sustituye por glutamato (nombrado a continuación en el presente documento A391E); un mutante en el que el residuo de asparagina en la posición 540 se sustituye por lisina (nombrado a continuación en el presente documento N540K); un mutante en el que el codón de terminación se elimina debido a sustituciones de bases, en particular el mutante en el que el codón de terminación se muta para dar un codón de arginina, cisteína, glicina, serina o triptófano (nombrado a continuación en el presente documento X807R, X807C, X807G, X807S y X807W, respectivamente); un mutante en el que el residuo de lisina en la posición 650 se sustituye por otro residuo, en particular por metionina, glutamato, asparagina o glutamina (nombrado a continuación en el presente documento K650M, K650E, K650N y K650Q). Normalmente, una variante de FGFR3 constitutivamente activa según la divulgación es el mutante K650M, K650E o Y373C.

60

En particular, las enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3 son condrodisplasias relacionadas con FGFR3 y craneosinostosis relacionada con FGFR3. En particular, las osteocondrodisplasias esqueléticas relacionadas con FGFR3 corresponden a una enfermedad hereditaria o a una enfermedad esporádica. Tal como se usa en el presente documento, el término "displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3" incluye, pero no se limita a, displasia tanatofórica de tipo I, displasia tanatofórica de tipo II, hipocondroplasia, acondroplasia y SADDAN (acondroplasia grave con retraso del desarrollo y acantosis pigmentaria). En particular, la

65

osteochondrodisplasia esquelética relacionada con FGFR3 está provocada por la expresión en el sujeto de una variante de receptor FGFR3 constitutivamente activa tal como se definió anteriormente. En particular, la condrodisplasia relacionada con FGFR3 es una acondroplasia provocada por la expresión del mutante constitutivamente activo G380R del receptor FGFR3. En particular, la condrodisplasia relacionada con FGFR3 es una hipocondroplasia provocada por la expresión del mutante constitutivamente activo N540K, K650N, K650Q, S84L, R200C, N262H, G268C, Y278C, S279C, V381E del receptor FGFR3. En particular, la condrodisplasia relacionada con FGFR3 es una displasia tanatofórica de tipo I provocada por la expresión de un mutante constitutivamente activo del receptor FGFR3 elegido del grupo que consiste en receptores FGFR3 R248C, S248C, G370C, S371C; Y373C, X807R, X807C, X807G, X807S, X807W y K650M. En particular, la condrodisplasia relacionada con FGFR3 es una displasia tanatofórica de tipo II provocada por la expresión del mutante constitutivamente activo K650E del receptor FGFR3. En particular, la condrodisplasia relacionada con FGFR3 es una acondroplasia grave con retraso del desarrollo y acantosis pigmentaria provocada por la expresión del mutante constitutivamente activo K650M del receptor FGFR3. En particular, la craneosinostosis relacionada con FGFR3 corresponde a una enfermedad hereditaria o a una enfermedad esporádica. En particular, la craneosinostosis relacionada con FGFR3 es síndrome de Muenke provocado por la expresión del mutante constitutivamente activo P250R del receptor FGFR3 o síndrome de Crouzon con acantosis pigmentaria provocado por la expresión del mutante constitutivamente activo A391E del receptor FGFR3.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” o “tratar” se refiere tanto al tratamiento profiláctico o preventivo como al tratamiento curativo, que mejora la afección del paciente, o tratamiento que modifica la enfermedad, incluyendo el tratamiento del paciente en riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que ha contraído la enfermedad, así como pacientes que están enfermos o se les ha diagnosticado que padecen una enfermedad o afección médica, e incluye la supresión de la recaída clínica. El tratamiento se administra a un sujeto que tiene un trastorno médico o que en última instancia adquiere el trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar la aparición de, reducir la gravedad de o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento. Por “régimen terapéutico” se entiende el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación usado durante la terapia. Un régimen terapéutico incluye un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. La expresión “régimen de inducción” o “periodo de inducción” se refiere a un régimen terapéutico (o a la parte de un régimen terapéutico) que se usa para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel de fármaco a un paciente durante el periodo inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción emplea (en parte o en su totalidad) un “régimen de carga”, que incluye administrar una dosis mayor del fármaco que la que emplearía un médico durante un régimen de mantenimiento, administrar un fármaco con más frecuencia con la que un médico administraría el fármaco durante un régimen de mantenimiento, o ambos. La expresión “régimen de mantenimiento” o “periodo de mantenimiento” se refiere a un régimen terapéutico (o a la parte de un régimen terapéutico) que se usa para el mantenimiento de un paciente durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al paciente en remisión durante largos periodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento emplea terapia continua (por ejemplo, administrar un fármaco a intervalos regulares, por ejemplo, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente, etc.) o terapia intermitente (por ejemplo, tratamiento interrumpido, tratamiento intermitente, tratamiento en la recaída o tratamiento al lograr un criterio predeterminado particular [por ejemplo, manifestación de la enfermedad, etc.]).

Tal como se usa en el presente documento, el término “(-)-epicatequina” tiene su significado general en la técnica y se refiere a (2R,3R)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromen-3,5,7-triol. El experto conoce bien los métodos de producción o extracción de (-)-epicatequina.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente pura” se refiere a la ausencia total o a la ausencia casi total de impurezas, tales como impurezas relacionadas con la sustancia. Por ejemplo, cuando se dice que una composición de (-)-epicatequina es sustancialmente pura, o bien no hay impurezas relacionadas con la sustancia detectables, o bien si se detecta una única impureza relacionada con la sustancia, está presente en una cantidad no mayor del 0,1 % en peso, o bien si se detectan múltiples impurezas relacionadas con la sustancia, están presentes, en conjunto, en una cantidad no mayor del 0,6 % en peso.

Por consiguiente, al paciente se le administra una composición farmacéutica que comprende la (-)-epicatequina sustancialmente pura como principio activo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, los términos “principio activo” o “componente activo” se usan indistintamente. El principio activo se usa para aliviar, tratar o prevenir una enfermedad o afección médica. En el presente documento, por el término “excipiente farmacéuticamente aceptable” se entiende un medio portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del/de los componente(s) activo(s) y que no es excesivamente tóxico para el huésped a la concentración a la que se administra. Dichos excipientes se seleccionan, dependiendo de la forma farmacéutica y del método de administración deseado, de los excipientes habituales conocidos por un experto en la técnica. En particular, la composición farmacéutica de la presente divulgación no comprende un segundo principio activo. Por consiguiente, en particular, la composición farmacéutica de la presente divulgación no es un extracto de Theobroma cacao tal como se describe en el documento WO 2016046375. En particular, la composición farmacéutica no comprende una cantidad de flavonoles, swerósido y

hexenil-5-xilopiranosil-glucopiranosido. En particular, la composición farmacéutica de la presente divulgación no comprende una cantidad de procianidina, catequina, cinchonaina y derivados de las mismas. En particular, la composición farmacéutica no comprende una cantidad de 3,4-N-fenilpropenoil-L-aminoácido o derivado del mismo elegido de N-cafeoil-L-aspartato, ácido L-aspartico, N-[3-(4-hidroxifenil)-1-oxo-2-propenilo], ácido L-aspartico, N-[3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-oxo-2-propenilo], trans-clovamida (N-[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propen-1-il]-3-hidroxi-L-tirosina), desoxiclovamida (N-[(2E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propen-1-il]-L-tirosina) y derivados de los mismos. En particular, la composición farmacéutica de la presente divulgación no comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en quercetina, glucurónido de quercetina, hexosa de quercetina, arabinósido de quercetina e isómeros de los mismos y/o dicha al menos una procianidina, catequina, cinchonaina y derivado de las mismas elegido de proantocianidina A, (epi)catequina, hexosa de dímero de (epi)catequina, arabinopiranosil-(epi)catequin-(epi)catequina, (epi)galocatequina, glucopiranosido de (epi)catequina, diglucopiranosido de catequina, cinchonaina I, tetrámero de (epi)catequina, pentámero de (epi)catequina, hexámero de (epi)catequina, dímero metílico de (epi)catequina, dímero etílico de (epi)catequina, procianidina A, procianidina B, procianidina C e isómeros de los mismos. En particular, la composición farmacéutica no comprende una cantidad de procianidina B; tetrámero de (epi)catequina; pentámero de (epi)catequina; hexenil-xilopiranosil-glucopiranosido; hexosa de dímero de (epi)catequina; arabinopiranosil-(epi)catequin-(epi)catequina; procianidina C; proantocianidina A; dímero etílico de (epi)catequina; quercetina; hexosa de quercetina; cinchonaina I; procianidina A; y swerósido.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" de la (-)-epicatequina sustancialmente pura tal como se describió anteriormente se entiende una cantidad suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de la (-)-epicatequina sustancialmente pura lo decidirá el médico responsable dentro del alcance del juicio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de varios factores, incluyendo el trastorno que esté tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, se encuentra dentro de la habilidad de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo de desde 0,01 hasta 1.000 mg por adulto al día. Normalmente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del componente activo para el ajuste sintomático de la dosificación para el sujeto que va a tratarse. Un medicamento contiene normalmente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del componente activo, o desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del componente activo. Habitualmente se administra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal al día.

La divulgación se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y estas figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la presente divulgación.

Figuras

Figura 1. Los diferentes perfiles de fracciones de Sep-Pak mediante HPLC-ESI-TOF-EM fueron: fracciones de a) PA, b) PC, c) MN, d) OL y e) PL.

Figura 2. Cromatogramas semipreparativos mediante HPLC-UV con recogida y TOF-EM.

Figura 3 (A, B, C). BPC de once fracciones obtenidas de la fracción de Sep-Pak de PC mediante HPLC-ESI-TOF-EM.

Figura 4. Espectro de ^1H -RMN en DMSO- d_6 de F5 procedente de extracto de cacao.

Figura 5. Estructura química de (-)-epicatequina.

Figura 6. Inhibición relacionada con la dosis de la fosforilación de Erk1/2 en líneas de condrocitos de TD usando FGF2 (100 ng/ml) y fracción 5 (50-100-200 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 7. Datos representativos de tratamientos de líneas de condrocitos humanos de TD usando FGF2 (100 ng/ml) y fracción 5 (100 $\mu\text{g/ml}$). $p^* 0,0212$

Figura 8. Datos representativos de tratamientos de líneas de condrocitos humanos de ACH usando FGF2 (100 ng/ml) y fracción 5 (100 $\mu\text{g/ml}$). $p^{**} 0,0038$

Figura 9. Imagen representativa de fémures tratados con fracción 5 (10 µg/ml).

Figura 10. Representación gráfica de longitud de fémur y % de crecimiento de los fémures tratados con F5 (10 µg/ml).

Figura 11. Imagen representativa de fémures tratados con (-)-epicatequina (10 µg/ml).

Figura 12. Representación gráfica de longitud de fémur y % de crecimiento de los fémures tratados con (-)-epicatequina (10 µg/ml).

Figura 13. Representación gráfica de longitud de fémur y % de crecimiento de los fémures tratados con (-)-epicatequina (1 µg/ml).

Figura 14. Alargamiento de cilios primarios por (-)-epicatequina en condrocitos E16.5 antenatales.

Ejemplo

Métodos

1. Productos químicos y reactivos.

Todos los productos químicos fueron de calidad para HPLC-EM y se usaron según se recibieron. El ácido acético y el metanol para HPLC y HPLC semipreparativa se adquirieron de Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y Lab-Scan (Gliwice, Sowinski, Polonia), respectivamente. El dietil éter y el metanol para la extracción se adquirieron de Fisher (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ), el acetato de etilo de Lab-Scan (Gliwice, Sowinski, Polonia), el etanol y la acetona de AnalaR Normapur (VWR International, Inc., Darmstadt, Alemania) y el dimetilsulfóxido (DMSO) se adquirió de Panreac (Barcelona, España) para los ensayos analíticos. La (-)-epicatequina se adquirió de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.). El agua se purificó mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EE. UU.). Los disolventes deuterados tales como el dimetilsulfóxido se adquirieron de Eurisotop (Francia). Para el análisis mediante RMN, se disolvió la muestra en dimetilsulfóxido-d6 y se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm secado al horno para el análisis espectral.

Se usaron cartuchos Waters Sep-Pak C18 Plus de 5 g (Mildford, EE. UU.) como minicolumnas de extracción en fase sólida para la purificación y la concentración.

2. Preparación de muestras.

En este estudio se usó un extracto de T. cacao concentrado (Molteoleder, España). Los polifenoles de la totalidad de la matriz de cacao se caracterizaron analíticamente usando una disolución de extracto de cacao de 10 mg/ml en DMSO.

Para la purificación de los cartuchos, se preparó una disolución madre de 0,1 g/ml disolviendo la cantidad apropiada de extracto de cacao en DMSO. Se sometió la muestra a sonicación durante 5 min, se agitó con vórtice durante 1 min y luego se centrifugó durante 5 min a 7700 g antes de la purificación de los cartuchos.

Para la purificación mediante HPLC semipreparativa, se preparó una disolución madre de 75 mg/ml disolviendo la fracción de PC de cartuchos Sep-Pak C18 en DMSO. Se sometió la muestra a sonicación durante 5 min, se agitó con vórtice durante 1 min y luego se centrifugó durante 5 min a 7700 g antes del análisis mediante HPLC semipreparativa.

Se filtró cada muestra obtenida a través de un filtro de 0,25 µm antes del análisis mediante HPLC preparativa.

3. Instrumentación.

Se sometieron a fraccionamiento los polifenoles de la fracción de PC procedente de la purificación de los cartuchos Sep-Pak usando un sistema de HPLC preparativa Gilson (Gilson Inc., Middleton, WI, EE. UU.) equipado con una bomba binaria (modelo 331/332), soluciones para la manipulación de líquidos automatizadas (modelo GX-271) y un detector UV-Vis (modelo UV-Vis 156).

Se caracterizaron analíticamente las fracciones de T. cacao y las fracciones aisladas usando un sistema de CL de resolución rápida de la serie Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) equipado con una bomba binaria, un inyector automático y un detector de matriz de diodos (DAD). Se acopló el sistema de HPLC con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con una interfaz de ionización por electropulverización (ESI) (modelo G1607A de Agilent Technologies, Palo Alto,

CA).

4. Fraccionamiento de polifenoles para la obtención de (-)-epicatequina a partir de extracto de T. cacao

4.1. Mediante cartuchos Sep-Pak C18.

Se sometió a fraccionamiento el extracto de T. cacao preparado tal como se describió anteriormente en la sección de preparación de muestras mediante cartuchos Waters Sep-Pak C18 siguiendo el método descrito por Sun et al. (Sun et al., 2006) y Monagas et al. (Monagas et al., 2003) con algunas modificaciones. Se obtuvieron cinco fracciones diferentes: ácidos fenólicos (fracción de PA), flavan-3-oles monoméricos y oligoméricos (fracción de PC), proantocianidinas poliméricas (fracción de PP), monómeros (fracción de MN) y oligómeros (fracción de OL).

Los experimentos se realizaron por triplicado para garantizar la repetibilidad del fraccionamiento mediante los cartuchos.

Se evaporaron hasta sequedad las cinco fracciones obtenidas a vacío en el dispositivo Speed Vac. Se pesó el residuo de cada una y se disolvió en DMSO a 100 µg/ml. Después de eso, se filtraron a través de un filtro de 0,25 µm para analizarlos mediante HPLC-ESI-TOF-EM.

4.2. Mediante la combinación de Sep-Pak y HPLC semipreparativa.

Se sometieron a fraccionamiento los compuestos de la fracción de PC procedente de los cartuchos C18 según Cádiz-Gurrea et al. (Cádiz-Gurrea et al., 2014). Finalmente, se recogieron un total de 11 fracciones y se evaporó el disolvente a vacío. Se pesó el residuo de cada fracción y se disolvió con un volumen apropiado de DMSO al nivel de concentración de 100 µg/ml. Finalmente, se filtraron todas las fracciones a través de un filtro de 0,25 µm antes del análisis mediante HPLC.

5. Condiciones cromatográficas y detección por ESI-TOF-EM.

Se separaron los compuestos de las fracciones de T. cacao siguiendo el método descrito por Cádiz-Gurrea et al. (Cádiz-Gurrea et al., 2014) con estas modificaciones: se acopló el sistema de HPLC con un espectrómetro de masas de TOF equipado con una interfaz de ESI que funcionaba en modo de iones negativos usando una tensión capilar de +3,5 kV. Los demás valores óptimos de los parámetros de fuente fueron: temperatura del gas de secado, 200 °C; flujo del gas de secado, 10 l/min; y presión del gas de nebulización, 2,3 bar. La detección se realizó teniendo en cuenta un intervalo de masas de 50-1200 m/z.

Las muestras se inyectaron por triplicado para garantizar la repetibilidad del análisis.

6. Condiciones de RMN.

Los espectros de RMN se registraron a $293 \pm 0,1$ K en un espectrómetro Bruker Avance III 600 que funcionaba a una frecuencia de protón de 600,13 MHz usando una criosonda de gradiente de campo de pulso de resonancia de cuadrupolo QCI de 5 mm. Las multiplicidades observadas se indican como s = singlete; d = doblete; dd = doblete de dobletes; t = triplete; m = multiplete; y s a = singlete ancho. Se midió la muestra, sin rotación y usando 8 barridos ficticios antes de los 128 barridos. Los parámetros de adquisición se han establecido de la siguiente manera: tamaño de la FID = 64K, anchura espectral = 20,5 ppm, tiempo de adquisición = 2,73 s, retardo de relajación = 10 s, ganancia del receptor = 20,2, resolución de la FID = 0,25 Hz. Se usó una secuencia de pulso de presaturación (Bruker 1D noesygprr1d) para suprimir la señal de H₂O residual mediante irradiación de la frecuencia de H₂O durante los retardos de tiempo de reciclado y mezclado. Se sometió el espectro resultante al ajuste de fase automáticamente, se corrigió con respecto a la línea de base y se calibró con respecto a la señal de TSP a 0,0 ppm. Se estableció el tiempo t₁ en 4 µs y el tiempo de mezclado (d8) en 10 ms. Se bloqueó el transmisor del espectrómetro a la frecuencia del DMSO-d₆. La adquisición y el procesamiento de los espectros se llevaron a cabo con el software TOPSPIN (versión 3.1). La espectroscopia de correlación total ¹H-¹H (TOCSY), coherencia cuántica simple heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC), coherencia de enlaces múltiples heteronuclear ¹H-¹³C (HMBC) se registraron usando secuencias de Bruker convencionales. El espectro TOCSY se obtuvo aplicando un retardo de relajación de 2,0 s, una anchura espectral en ambas dimensiones de 7194,25 Hz y una ganancia del receptor de 64,0. El espectro TOCSY se procesó usando la función de ventana de campana sinusoidal (SSB = 2,0). El espectro HSQC se adquirió usando un retardo de relajación de 1,0 s, una anchura espectral de 7211,54 Hz en F2 y 24900,71 Hz en F1. Se usó la función de ventana sinusoidal cuadrática (SSB = 2,0) para el espectro HSQC. El espectro HMBC se registró con los mismos parámetros usados en el espectro HSQC excepto por una anchura espectral en F1 de 37729,71 Hz. Se fijó la constante de acoplamiento para el experimento de HSQC a 145 Hz, mientras que el experimento de HMBC se obtuvo usando constantes de acoplamiento fijas de 145 y 8 Hz (intervalo largo).

7. Evaluación de la eficacia de F5 con líneas de condrocitos humanos que expresan mutaciones de ganancia de

función de FGFR3.

Se evaluó in vitro F5 del extracto de cacao usando líneas de condrocitos que expresan mutaciones de ganancia de función de FGFR3 humano. Se estudiaron dos líneas de condrocitos humanos, expresando la primera de ellas la mutación heterocigótica de acondroplasia (ACH) (Gly380Arg) y la otra de ellas la mutación heterocigótica de displasia tanatofórica (TD) (Tyr373Cys) (Benoist-Lasselin C. et al. FEBS Lett. 2007).

Se agotaron las células durante 24 horas, se sometieron a prueba diversas concentraciones (50, 100, 200 µg/ml) de F5 procedente de cacao. Se añadió la fracción de cacao al medio, luego se estimularon las células con un ligando del receptor, es decir, FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos). Se evaluó la eficacia de la fracción procedente de cacao en la activación de FGFR3 mediante inmunotransferencia de tipo Western (n = 3). Se evaluó el nivel de fosforilación de Erk1/2, dos proteínas de la ruta canónica de cinasas MAP.

Los niveles de Erk1/2 fosforilada y Erk1/2 se midieron usando la tecnología Li-Cor e Imager.

8. Evaluación de la eficacia de la fracción 5 procedente de extracto de cacao y (-)-epicatequina en cultivos de fémur ex vivo aislados de ratones *Fgfr3^{Y367C/+}*.

Se usaron ratones *Fgfr3^{Y367C/+}* heterocigóticos que expresan ubicuamente la mutación Y367C y que muestran un enanismo grave (Pannier et al., *Biochim Biophys Acta*, 1792: 140-147, 2009, Pannier S et al. *Bone* 47: 905-915, 2010). Se realizaron varios conjuntos de experimentos ex vivo tal como se describió previamente (Jonquoy et al., *Hum Mol Genet*, 21: 841-851, 2012). Se usaron embriones de fémur del día E16.5 procedentes de ratones *Fgfr3^{+/+}* (n = 23) y *Fgfr3^{Y367C/+}* (n = 16) y se incubaron durante 6 días en medio DMEM con antibióticos y BSA al 0,2 % (Sigma) complementado con F5 procedente de cacao o (-)-epicatequina (Sigma-0394-05-90) o DMSO (como control) a una concentración de 10 y 30 µg/ml. Para establecer el efecto de los inhibidores, se cultivó el fémur izquierdo en medio complementado y se comparó con el derecho cultivado en medio de control. Se midió la longitud del hueso al comienzo (antes del tratamiento) y al final del transcurso temporal. Se determinó el genotipo de ratones *Fgfr3^{+/+}* y *Fgfr3^{Y367C/+}* mediante PCR de ADN de la cola tal como se describió previamente (Pannier et al., *Biochim Biophys Acta*, 1792: 140-147, 2009). Todos los protocolos y procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de cuidado y uso de animales.

9. Evaluación de la eficacia de la fracción 5 procedente de extracto de cacao y (-)-epicatequina en cartílago de placa de crecimiento.

Con el fin de apreciar el impacto del tratamiento en el cartílago de placa de crecimiento, se realizaron estudios histológicos e inmunohistológicos. Se seleccionaron marcadores específicos del cartílago, SOX9 y colágeno tipo X, se sometió a prueba la expresión de la proteína FGFR3 y también se evaluó la expresión de las proteínas Erk1/2 fosforiladas de la señalización de cinasas MAP y activadas por FGFR3.

Se fijaron explantes de extremidades después del cultivo en paraformaldehído al 4 % a 4 °C y se incorporaron en parafina. Se tiñeron cortes de 5 µm en serie con hematoxilina-eosina usando protocolos convencionales para el análisis histológico o se sometieron a tinción inmunohistoquímica.

Para la inmunohistoquímica, se tiñeron los cortes con anticuerpos específicos de FGFR3 (dilución 1:100; Sigma), anticuerpo anti-colágeno tipo X (dilución 1:50; Quartett), anticuerpo anti-SOX9 (dilución 1:1000; Abcam), anticuerpo anti-Erk1/2 fosforilada (dilución 1:100; Cell Signaling) usando el kit de sistema Dako Envision. Las imágenes se capturaron con un microscopio Olympus PD70-IX2-UCB.

10. Inmunocitoquímica.

Se fijaron condrocitos cultivados procedentes de *Fgfr3^{Y367C/+}* a temperatura ambiente durante 10 min en metanol (enfriado a -20 °C) y luego se lavaron con PBS. Se permeabilizaron las muestras durante 10 min con PBS que contenía Triton-X100 al 0,1 % (Sigma-Aldrich), luego se lavaron tres veces durante 5 min. Se incubaron las muestras con PBS que contenía suero de cabra al 10 % (Biowest) durante 60 min a temperatura ambiente. Se incubaron anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: IgG1 de ratón anti-γ-tubulina (Sigma-Aldrich #T6557, 1:1000) y anticuerpo de conejo anti-Arl13b (Proteintech #177111-AP, 1:500). Se lavaron las células con PBS y luego se incubaron con los anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG1 de ratón acoplado con AlexaFluor 488 (Life Technologies, 1:1000) y de cabra anti-IgG de conejo acoplado con AlexaFluor 647 (Life Technologies, 1:1000) durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron a fondo las muestras y se montaron con una disolución de DAPI-Fluoromount G (SouthernBiotech) que contenía DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) para la tinción nuclear.

La adquisición de imágenes se realizó usando un microscopio confocal de disco giratorio. El sistema está compuesto por un escáner de disco giratorio Yokogawa CSU-X1 acoplado a un microscopio invertido Zeiss Observer Z1 y controlado por el software Zen Blue. Se adquirieron imágenes en mosaico con un objetivo de inmersión en aceite Plan Apochromat 63x (NA 1,46) mediante una cámara Hamamatsu Orca Flash 4.0 sCMOS.

Con el fin de comparar los datos medidos, todos los experimentos confocales que muestran longitud de PC se adquirieron en las mismas condiciones usando un grosor de corte de 0,20 μm y un tamaño de píxel de 60 nm. Se realizaron análisis posteriores al tratamiento con los software FIJI (Fiji Is Just ImageJ; NIH) e Imaris v8.3 (Bitplane). Se obtuvieron 25 imágenes por apilamiento Z y se logró una proyección Z con intensidad máxima. A continuación se midieron en 2D las longitudes de PC mediante el software IMARIS (Bitplane).

Resultados

1. Caracterización exhaustiva de las fracciones mediante HPLC-ESI-TOF-EM.

La figura 1 muestra los diferentes perfiles (cromatogramas de picos de base y compuestos caracterizados), que se obtuvieron mediante los cartuchos Sep-Pak C18. Este método propuesto permitió la separación de los compuestos fenólicos a partir del extracto T. cacao completo en diversas fracciones diferentes, que eran menos complejas, lo que permitió su uso con el fin de lograr fracciones puras de los compuestos de interés. Además, se obtuvieron once fracciones mediante la combinación de extracción en fase sólida mediante cartuchos Sep-Pak C18 y aislamiento por HPLC semipreparativa con el fin de obtener fracciones purificadas de PA monoméricos y oligoméricos (figura 2). La composición de cada una se estableció por la HPLC-ESI-TOF-EM detallada (figura 3 A, B y C). Sólo en F1 pudo encontrarse (+)-catequina (al comparar con el patrón comercial) y (-)-epicatequina (m/z 289). En F2 y F3, hay un dímero de tipo B o PC y (-)-epicatequina, estando presente esta última con alta intensidad en F3. Además, apareció un trímero de PC en las fracciones 4 a 7 (m/z 865). Las fracciones menos purificadas fueron F7, F8 y F10 con cuatro o más compuestos. Sin embargo, en F9 se detectó un dímero de tipo B de PC, que es la fracción más purificada.

Después de pruebas biológicas preliminares de las fracciones obtenidas, se seleccionó F5 como candidato para los experimentos biológicos en el modelo de acondroplasia.

2. Identificación por RMN de los compuestos procedentes de F5 seleccionada.

La figura 4 muestra el espectro de ^1H -RMN en DMSO- d_6 para F5, donde el compuesto más abundante correspondía a (-)-epicatequina (figura 5).

La tabla 1 contiene los datos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN obtenidos en este trabajo para (-)-epicatequina en F5 procedente de la muestra de cacao. La identificación de sustancias similares a (+)-catequina y (-)-epicatequina se llevó a cabo basándose en los datos espectroscópicos de los protones alifáticos H-3(C) y H-2(C). Altos valores de la constante de acoplamiento $^3J_{2,3}$ (8-10 Hz) indican la presencia de (+)-catequina, mientras que valores de $^3J_{2,3}$ alrededor de 2 Hz o un singlete ancho demuestran la presencia de (-)-epicatequina en la presente fracción de cacao.

Tabla 1. Datos de desplazamientos químicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para (-)-epicatequina de F5 en DMSO- d_6 .

Anillo	Posición	^{13}C	^1H		
		δ (ppm)	δ (ppm)	multiplicidad	Datos de constantes de acoplamiento (Hz)
A	6	94,54	5,71	d	2,3
A	8	95,52	5,89	d	2,3
B	5'	115,21	6,66	d	8,0
B	6'	118,41	6,65	dd	1,6; 8,0
B	2'	115,36	6,89	d	1,6
C	2	78,52	4,73	s (a)	-
C	3	65,37	4,00	m	-
C	4	28,67	2,67	dd	4,6; 16,5
C	4	28,67	2,47	dd	3,5; 16,5

d = doblete, dd = doblete doble; s (a) = singlete ancho; m = multiplete

3. Evaluación de la eficacia de F5 en las rutas de cinasas MAP usando líneas de condrocitos humanos que expresan mutaciones de ganancia de función de FGFR3.

Se evaluó el nivel de fosforilación de la proteína Erk1/2, dos proteínas específicas de la ruta de cinasas MAP, mediante ensayos in vitro usando líneas de condrocitos humanos de TD y F5 (50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) y Fgf2 (100 ng/ml). Teniendo en cuenta los datos obtenidos (figura 6), se decidió tratar las líneas de TD y ACH con 100 $\mu\text{g/ml}$ de F5.

El tratamiento de las líneas de condrocitos de TD con F5 (100 µg/ml) mostró una fuerte reducción del nivel de fosforilación de Erk1/2 (figura 7). También se sometió a prueba F5 (100 µg/ml) con líneas de condrocitos de ACH. Se observó una reducción significativa de la fosforilación de Erk1/2 para esta fracción en células ACH (figura 8).

4. Evaluación de la eficacia de F5 procedente de extracto de cacao y (-)-epicatequina en cultivos de fémur ex vivo aislados de ratones $Fgfr3^{Y367C/+}$ que imitan la acondroplasia.

En cuanto a los datos obtenidos in vitro y los datos de los análisis por RMN, se sometieron a prueba F5 y (-)-epicatequina en cultivos de fémur.

F5 se ha evaluado para una concentración de 10 µg/ml. El porcentaje de crecimiento de fémur fue más importante en ratones $Fgfr3^{Y367C/+}$ que en ratones $Fgfr3^{+/+}$. F5 aumentó significativamente la longitud de los fémures en $Fgfr3^{Y367C/+}$ en comparación con los fémures en $Fgfr3^{+/+}$ (figura 9). F5 no alteró el crecimiento de los fémures en $Fgfr3^{+/+}$ (figura 10).

Teniendo en cuenta los datos de RMN, se evaluó la eficacia de (-)-epicatequina en el crecimiento óseo usando dos concentraciones diferentes: 1 y 10 µg/ml.

(-)-Epicatequina (10 µg/ml) aumentó significativamente la longitud (+10 %) de los fémures en $Fgfr3^{Y367C/+}$ en comparación con los fémures en $Fgfr3^{+/+}$ (figura 11). El porcentaje de crecimiento de fémur fue más importante en ratones $Fgfr3^{Y367C/+}$ que en ratones $Fgfr3^{+/+}$. (-)-Epicatequina (10 µg/ml) no alteró el crecimiento de los fémures en $Fgfr3^{+/+}$ (figura 12).

Los datos obtenidos con (-)-epicatequina con una concentración más baja (1 µg/ml) no mejoraron el tamaño de los fémures para $Fgfr3^{Y367C/+}$ ni para $Fgfr3^{+/+}$ (figura 13).

5. Evaluación de la eficacia de F5 procedente de extracto de cacao y (-)-epicatequina en el cartilago de placa de crecimiento.

Los análisis inmunohistológicos mostraron una ligera modificación de la expresión de colágeno tipo X en fémures proximales y distales tratados con F5. Se observó una expresión decreciente de FGFR3 y SOX9. No hubo ninguna modificación obvia de la expresión de Erk1/2 fosforilada en los fémures distales y proximales. Los análisis del fémur tanto proximal como distal no mostraron ninguna modificación obvia del tamaño de la epífisis.

Estudiando la tinción con H&E, se observó que el tratamiento con (-)-epicatequina mejoró todo el cartilago de placa de crecimiento. Se observó un aumento en el tamaño de la epífisis (datos no mostrados). La ganancia de crecimiento se marca con flechas rojas. En la parte distal de los fémures, la mejora del tamaño de la epífisis fue más obvia (datos no mostrados). Se aumentaron las zonas de reserva, proliferativas y prehipertróficas del cartilago de placa de crecimiento.

La expresión de colágeno tipo X no se modificó en fémures proximales y distales, mientras que las expresiones de FGFR3 y Sox9 disminuyeron fuertemente en fémures proximales y distales. Curiosamente, la expresión de Erk1/2 fosforilada disminuyó ligeramente en fémures proximales y distales tratados con (-)-epicatequina.

6. Alargamiento de cilios primarios por (-)-epicatequina en condrocitos E16.5 antenatales.

La figura 14 muestra una representación gráfica de la longitud de condrocitos de cilios primarios promedio en $Fgfr3^{Y367C/+}$ con y sin tratamiento con (-)-epicatequina ($n > 100$). Los datos representan media $\pm$ EEM, prueba de la t bilateral para datos independientes. ns, no significativo; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. n es el número de cilios primarios medidos, N es el número de condrocitos cultivados analizados, A es el promedio de la longitud del cilio primario. Los valores obtenidos y observados fueron $N = 3$ y $n = 127$ y $n = 113$ para condrocitos en $Fgfr3^{Y367C/+}$ tratados sin y con (-)-epicatequina, respectivamente. El promedio de cilios primarios observado fue de $A = 2,10 \pm 0,06$ y $A = 2,45 \pm 0,09$ para condrocitos en $Fgfr3^{Y367C/+}$ tratados sin y con (-)-epicatequina, respectivamente. La adición de (-)-epicatequina conduce a un alargamiento del cilio primario.

Referencias

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta divulgación.

Andújar, I., Recio, M.C., Giner, R.M., Ríos, J.L., 2012. Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 1-23. doi:10.1155/2012/906252

Benoist-Lasselín C, Gibbs L, Heuertz S, Odent T, Munnich A, Legeai-Mallet L. 2007 Human immortalized

chondrocytes carrying heterozygous FGFR3 mutations: an in vitro model to study chondrodysplasias. *FEBS Lett.* 12 de junio de 2007;581(14):2593-8. DOI:10.1016/j.febslet.2007.04.079

Borrego, E., Farrington, D.M., Downey, F.J., 2014. Novedades en displasias óseas. *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.* doi:10.1016/j.recot.2013.12.001

Cádiz-Gurrea, M. de la L., Fernández-Arroyo, S., Joven, J., Menéndez, J.A., Micol, V., Segura-Carretero, A., 2015. Proanthocyanidins in Agro-Industrial By-Products: Health Benefits, in: Motohashi, N. (Ed.), *Occurrences, Structure, Biosynthesis, and Health Benefits Based on Their Evidences of Medicinal Phytochemicals in Vegetables and Fruits*. Volumen 3, págs. 63-114.

Cádiz-Gurrea, M. de la L., Lozano-Sánchez, J., Contreras-Gámez, M. del M., Legeai-Mallet, L., Fernández-Arroyo, S., Segura-Carretero, A., 2014. Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of Theobroma cacao extract. *J. Funct. Foods* 10, 485-498. doi: 10.1016/j.jff.2014.07.016

Di Rocco, F., Duplan, M.B., Heuzé, Y., Kaci, N., Komla-Ebri, D., Munnich, A., Mugniery, E., Benoist-Lasselin, C., Legeai-Mallet, L., 2014. FGFR3 mutation causes abnormal membranous ossification in achondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2914-2925. doi:10.1093/hmg/ddu004

He, F., Pan, Q.-H., Shi, Y., Duan, C.-Q., 2008. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules* 13, 2674-2703.

Horton, W.A., Hall, J.G., Hecht, J.T., 2007. Achondroplasia. *Lancet* 370, 162-172. doi:10.1016/S0140-6736(07)61090-3

Huete, F., Guzman-Aranguez, A., Ortín, J., Hoyle, C.H. V, Pintor, J., 2011. Effects of diadenosine tetraphosphate on FGF9-induced chloride flux changes in achondroplastic chondrocytes. *Purinergic Signal.* 7, 243-249. doi:10.1007/s11302-011-9234-y

Jonquoy A, Mugniery E, Benoist-Lasselin C, Kaci N, Le Corre L, Barbault F, Girard AL, Le Merrer Y, Busca P, Schibler L, Munnich A, Legeai-Mallet L. A novel tyrosine kinase inhibitor restores chondrocyte differentiation and promotes bone growth in a gain-of-function Fgfr3 mouse model. *Hum Mol Genet.* 15 de febrero de 2012;21(4):841-51. doi: 10.1093/hmg/ddr514

Lanaud, C., Motamayor, J.-C., Sounigo, O., 2003. Cacao, in: Hamon et al., P. (Ed.), *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*. Sci. Publisher, Inc. and Cirad, USA, págs. 125-156.

Legeai-Mallet, L., Segura-Carretero, A., 2015. Theobroma cacao extract for use in the treatment or prevention of receptor tyrosine kinases related disorders. Documento WO2016046375 A1.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo Da Silva, J.M., 2003. Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from Vitis vinifera L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6475-6481. doi:10.1021/jf030325+

Ornitz, DM., Legeai-Mallet, L; Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Dev Dyn.* Abril de 2017;246(4):291-309. doi: 10.1002/dvdy.24479.

Orphanet, 2014. Prevalence of rare diseases : Bibliographic data. OrphanetRep. Ser. 1-29.

Orphanet, n.d. :: About Rare Diseases What is a rare disease ? [WWW Document]. URL http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutRareDiseases.php?Ing=EN#

Pannier S, Couloigner V, Messaddeq N, Elmaleh-Bergès M, Munnich A, Romand R, Legeai-Mallet L. Activating Fgfr3 Y367C mutation causes hearing loss and inner ear defect in a mouse model of chondrodysplasia. *Biochim Biophys Acta.* Febrero de 2009;1792(2):140-7. doi: 10.1016/j.bbdis.2008.11.010.

Pannier S, Mugniery E, Jonquoy A, Benoist-Lasselin C, Odent T, Jais JP, Munnich A, Legeai-Mallet L. delayed bone age due to a dual effect of FGFR3 mutation in achondroplasia. *Bone.* Noviembre de 2010;47(5):905-15. doi: 10.1016/j.bone.2010.07.020

Reglamento (CE) N°141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo del 16 de diciembre de 1999 sobre medicamentos huérfanos, n.d.

Rodwell, C., Ayme, S., 2014a. 2014 Report on the State of the Art of Rare Disease Activities in Europe: 2014 Report on the State of the Art of Rare Disease Activities in Europe 1-68.

Rodwell, C., Ayme, S., 2014b. 2014 Report on the state of the art of the rare disease activities in Europe - Par I: overview of rare disease activities in Europe 1-68.

5 Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, Le Merrer M, Munnich A. Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in achondroplasia. *Nature*. 15 de septembre de 1994;371(6494):252-4.

10 Sun, B., Leandro, M.C., de Freitas, V., Spranger, M.I., 2006. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1128, 27-38. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.026

UniProt, n.d. P22607 - FGFR3 HUMAN [WWW Document]. URL <http://www.uniprot.org/uniprot/P22607>

REIVINDICACIONES

1. (-)-Epicatequina sustancialmente pura para su uso en el tratamiento de una condrodisplasia relacionada con FGFR3 en un paciente que lo necesita, en la que sustancialmente pura significa que o bien no hay impurezas relacionadas con la sustancia detectables, o bien si se detecta una única impureza relacionada con la sustancia, está presente en una cantidad no mayor del 0,1 % en peso, o bien si se detectan múltiples impurezas relacionadas con la sustancia, están presentes, en conjunto, en una cantidad no mayor del 0,6 % en peso.
5
2. (-)-Epicatequina sustancialmente pura para su uso según la reivindicación 1, en la que las enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3 se seleccionan del grupo que consiste en displasia tanatofórica de tipo I, displasia tanatofórica de tipo II, hipocondroplasia, acondroplasia, acondroplasia grave con retraso del desarrollo y acantosis pigmentaria, e hipocondroplasia.
10
3. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una (-)-epicatequina sustancialmente pura como principio activo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en un método de tratamiento de una condrodisplasia relacionada con FGFR3 en un paciente que lo necesita, en la que la composición farmacéutica no es un extracto de Theobroma cacao y en la que sustancialmente pura significa que o bien no hay impurezas relacionadas con la sustancia detectables, o bien si se detecta una única impureza relacionada con la sustancia, está presente en una cantidad no mayor del 0,1 % en peso, o bien si se detectan múltiples impurezas relacionadas con la sustancia, están presentes, en conjunto, en una cantidad no mayor del 0,6 % en peso.
15
20

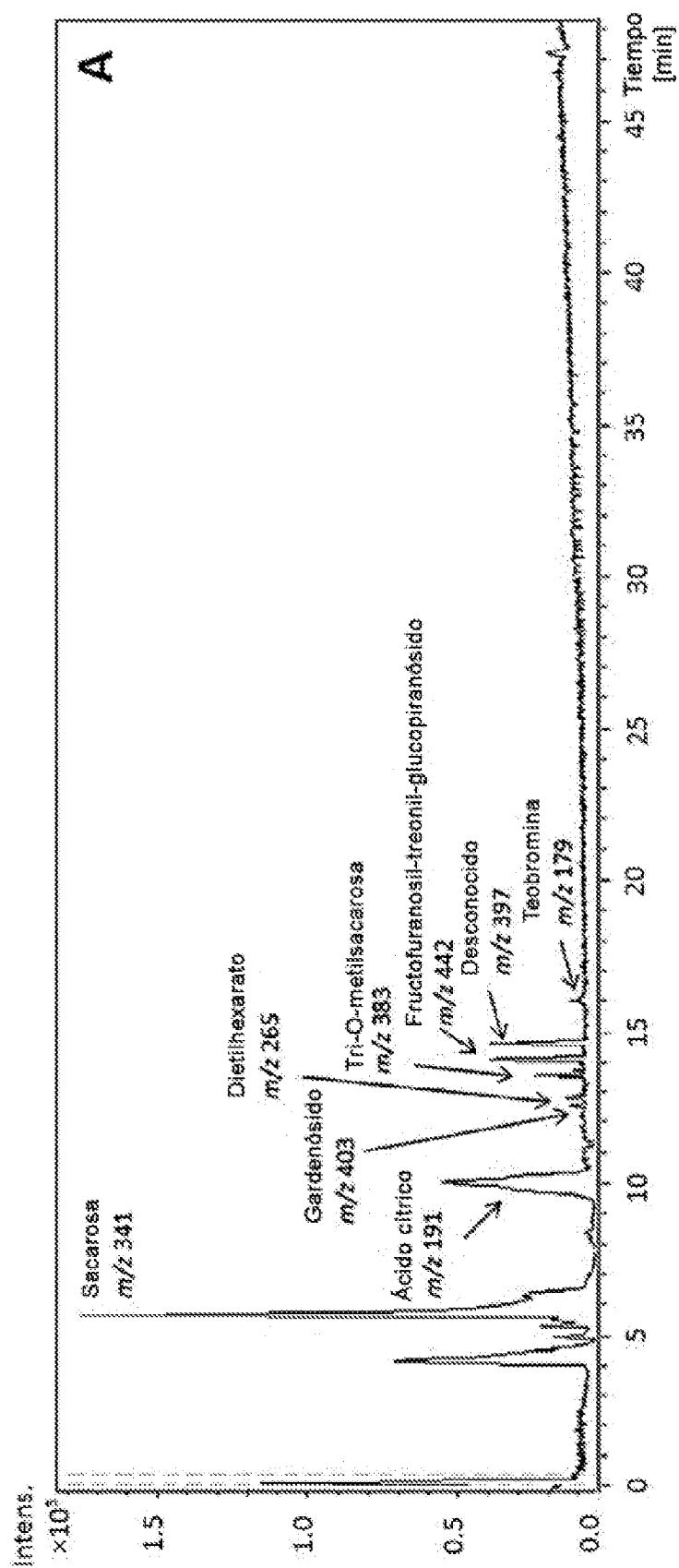


Figura 1A

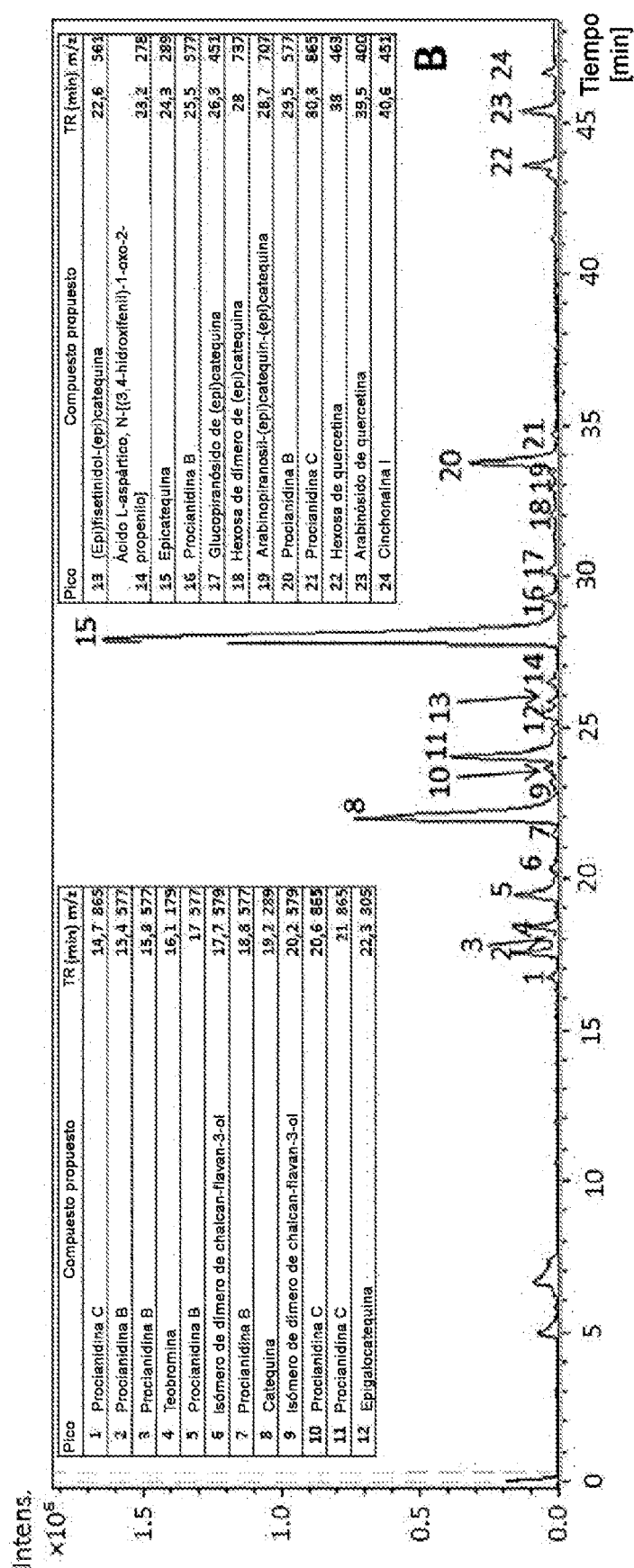


Figura 1B

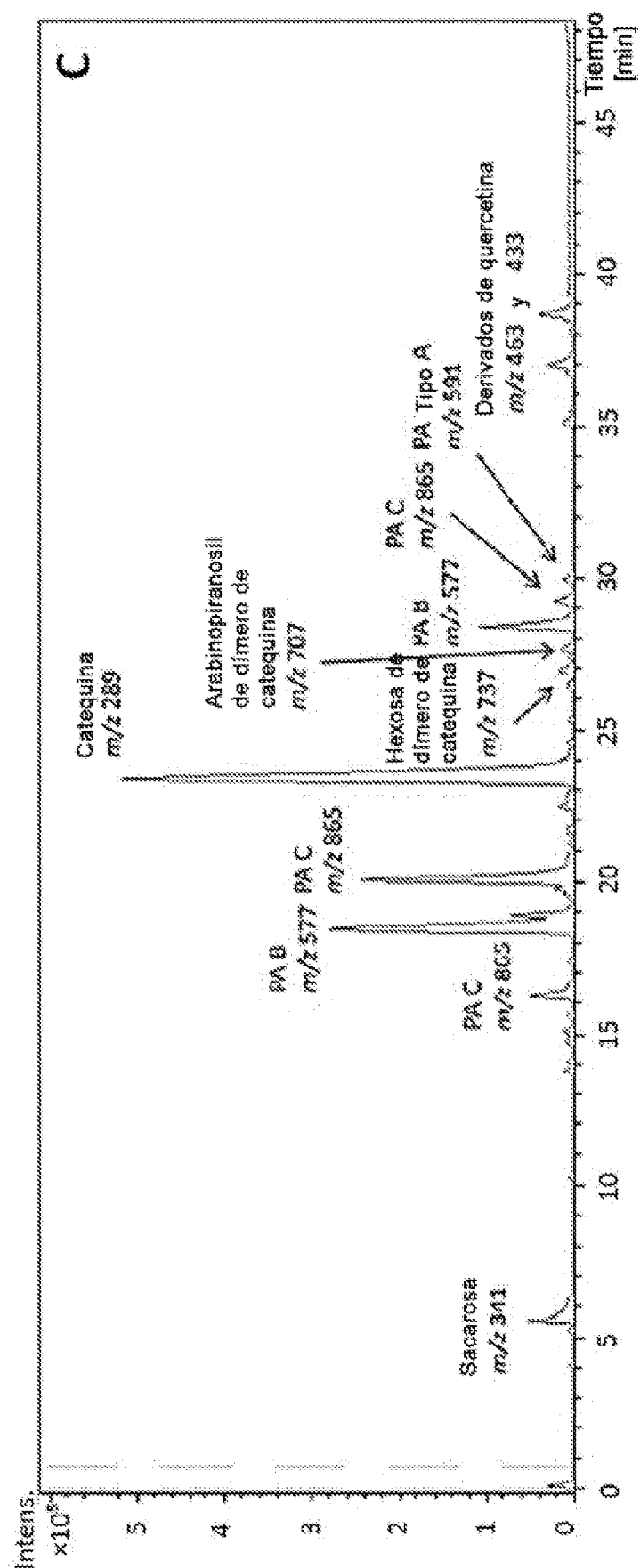


Figura 1C

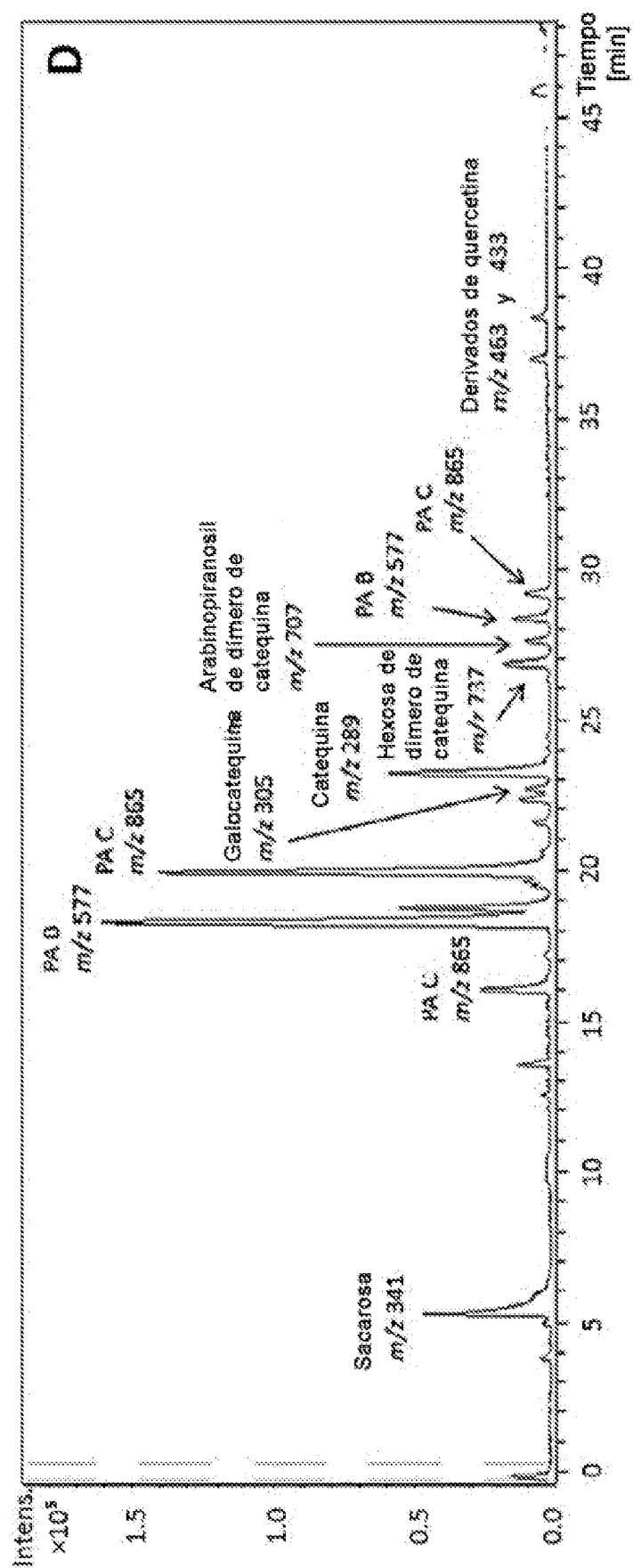


Figura 1D

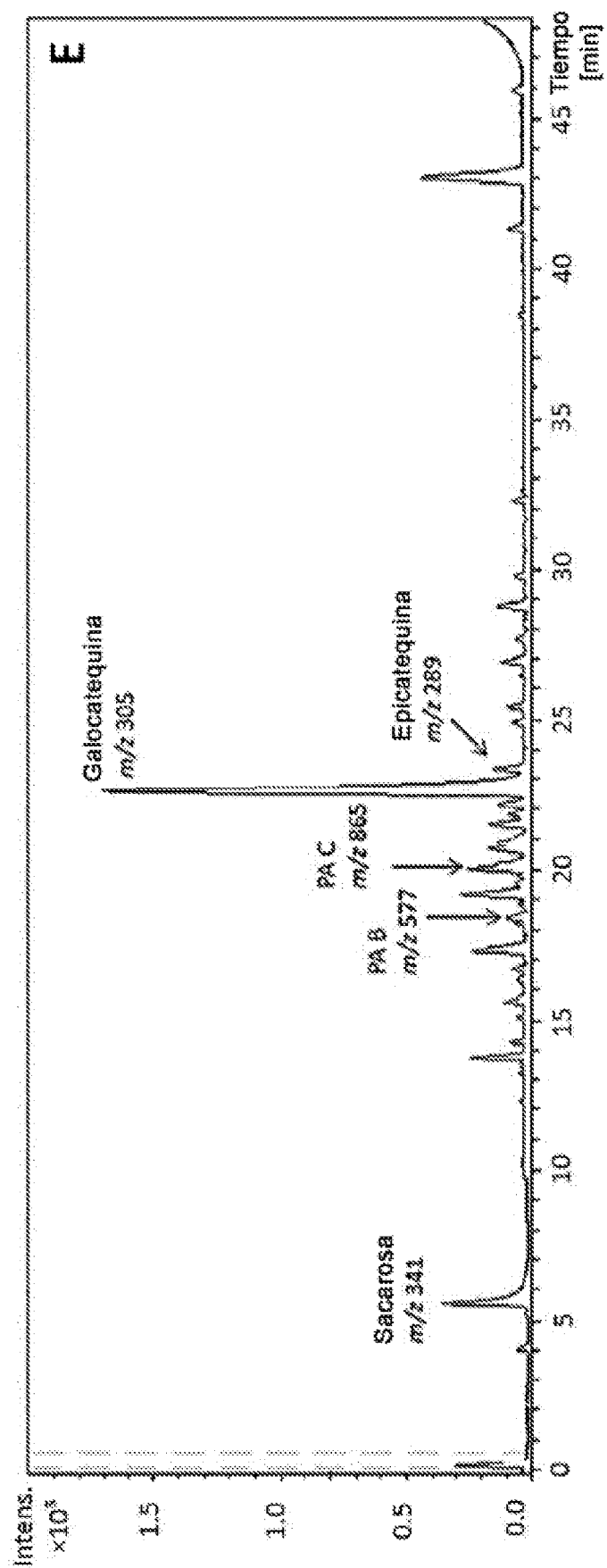


Figura 1E

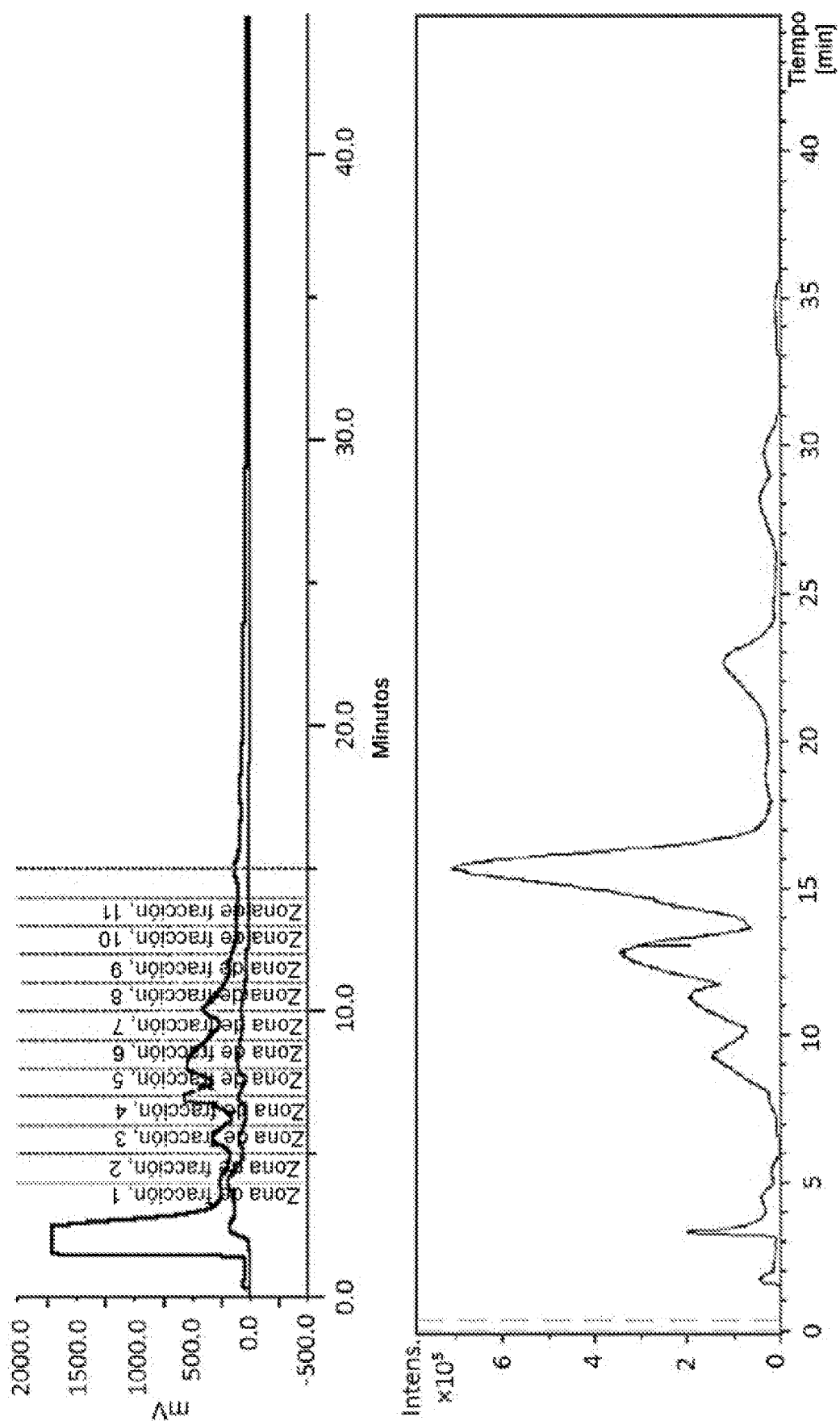


Figura 2

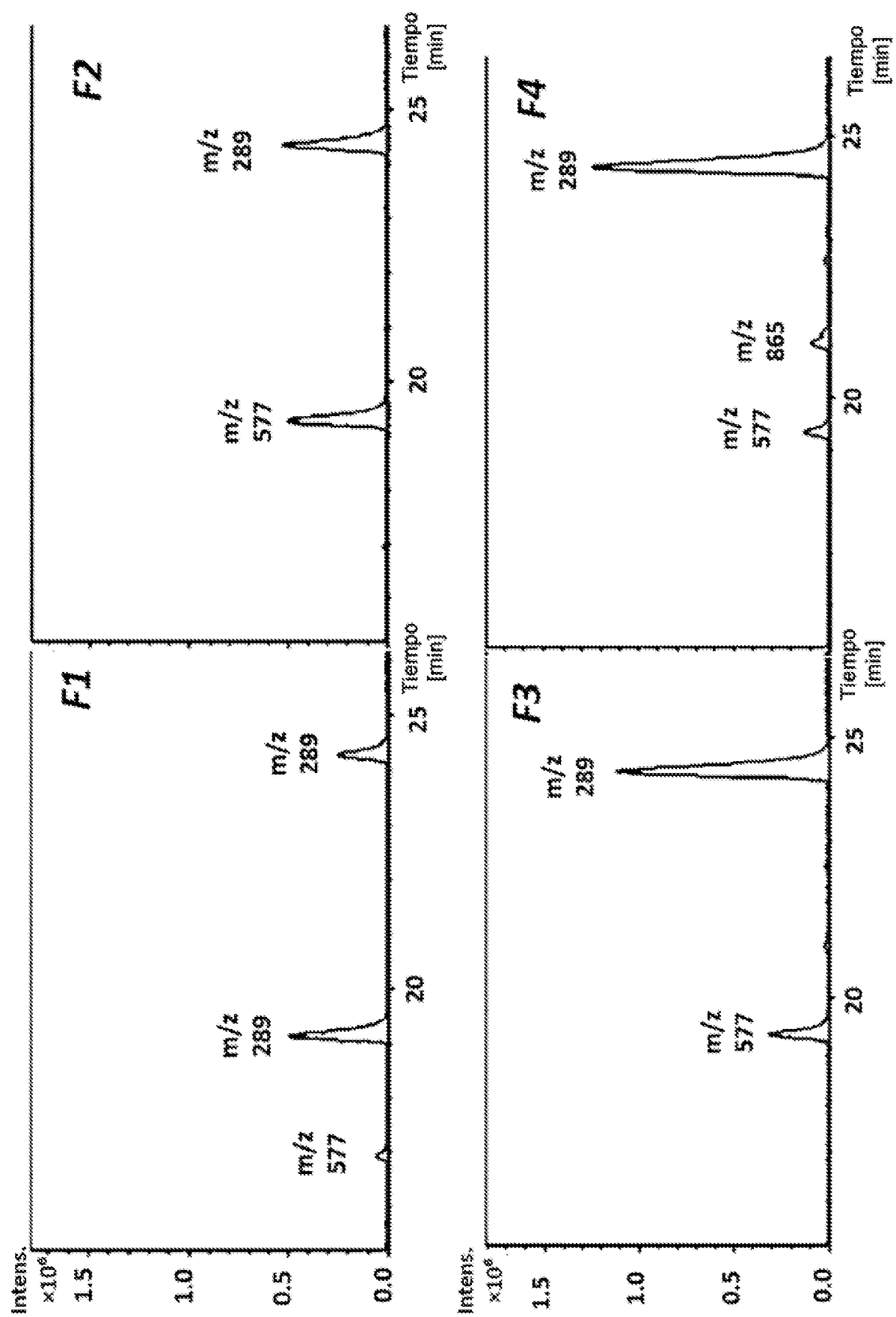


Figura 3A

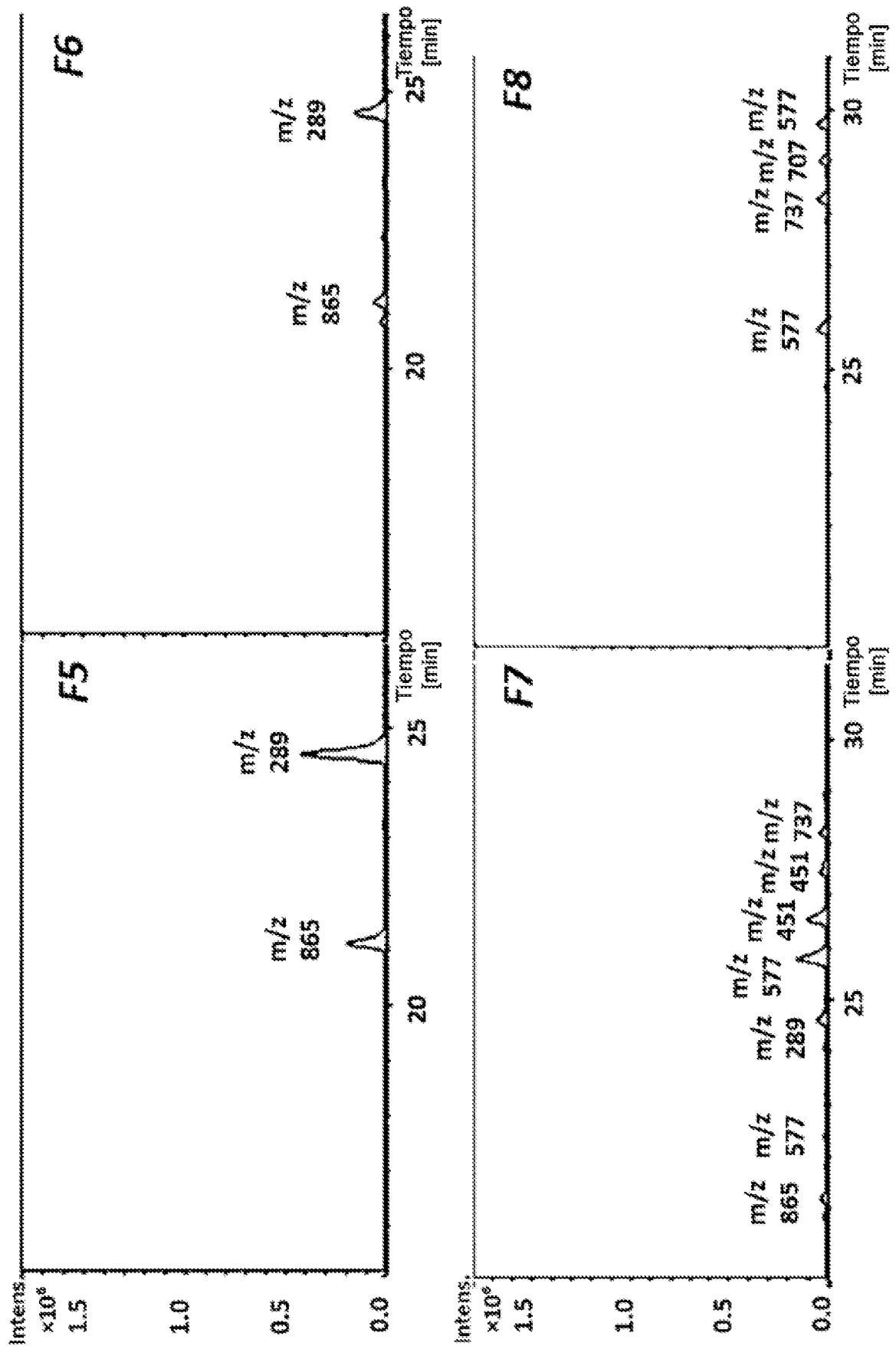


Figura 3B

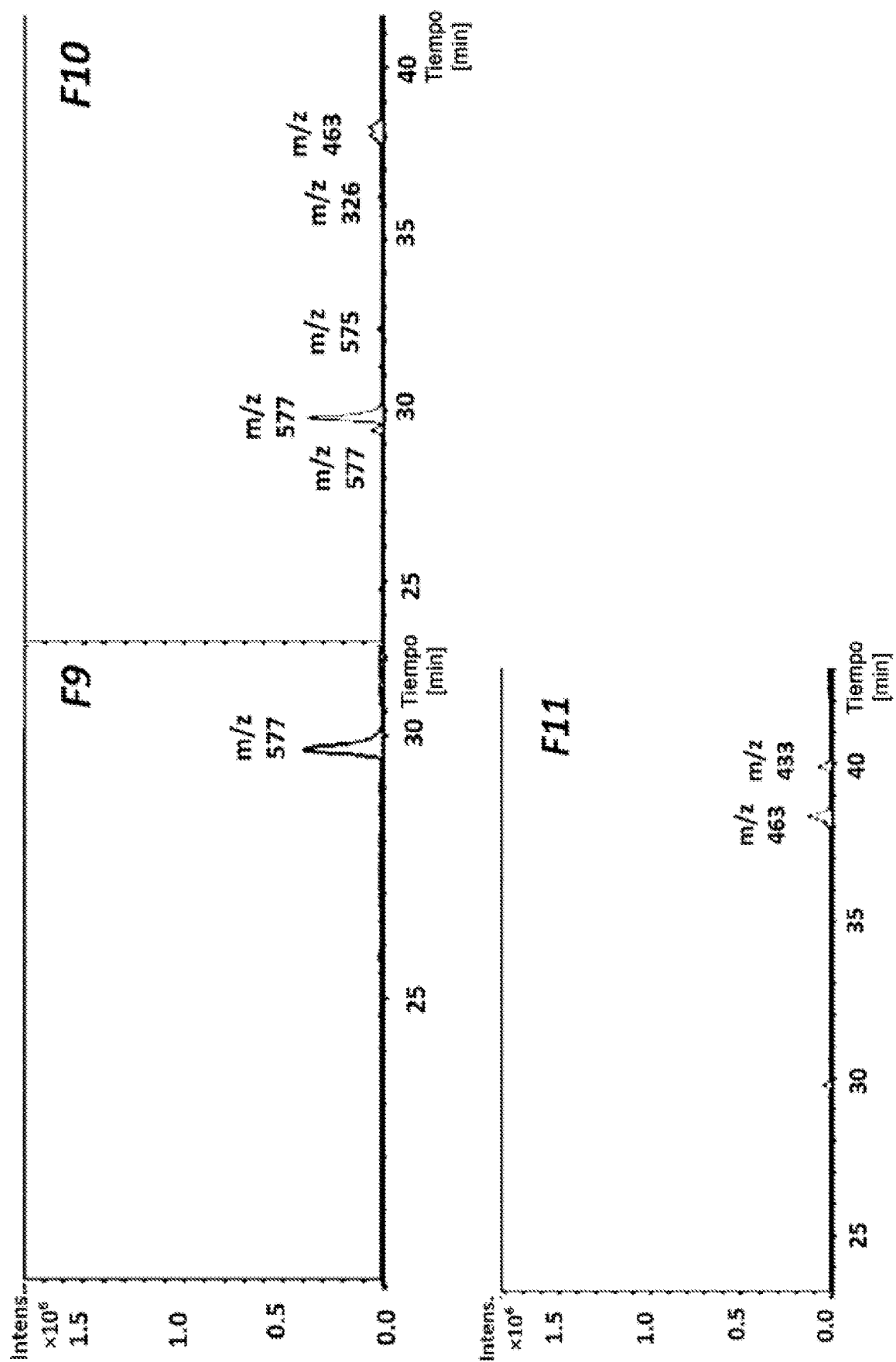


Figura 3C

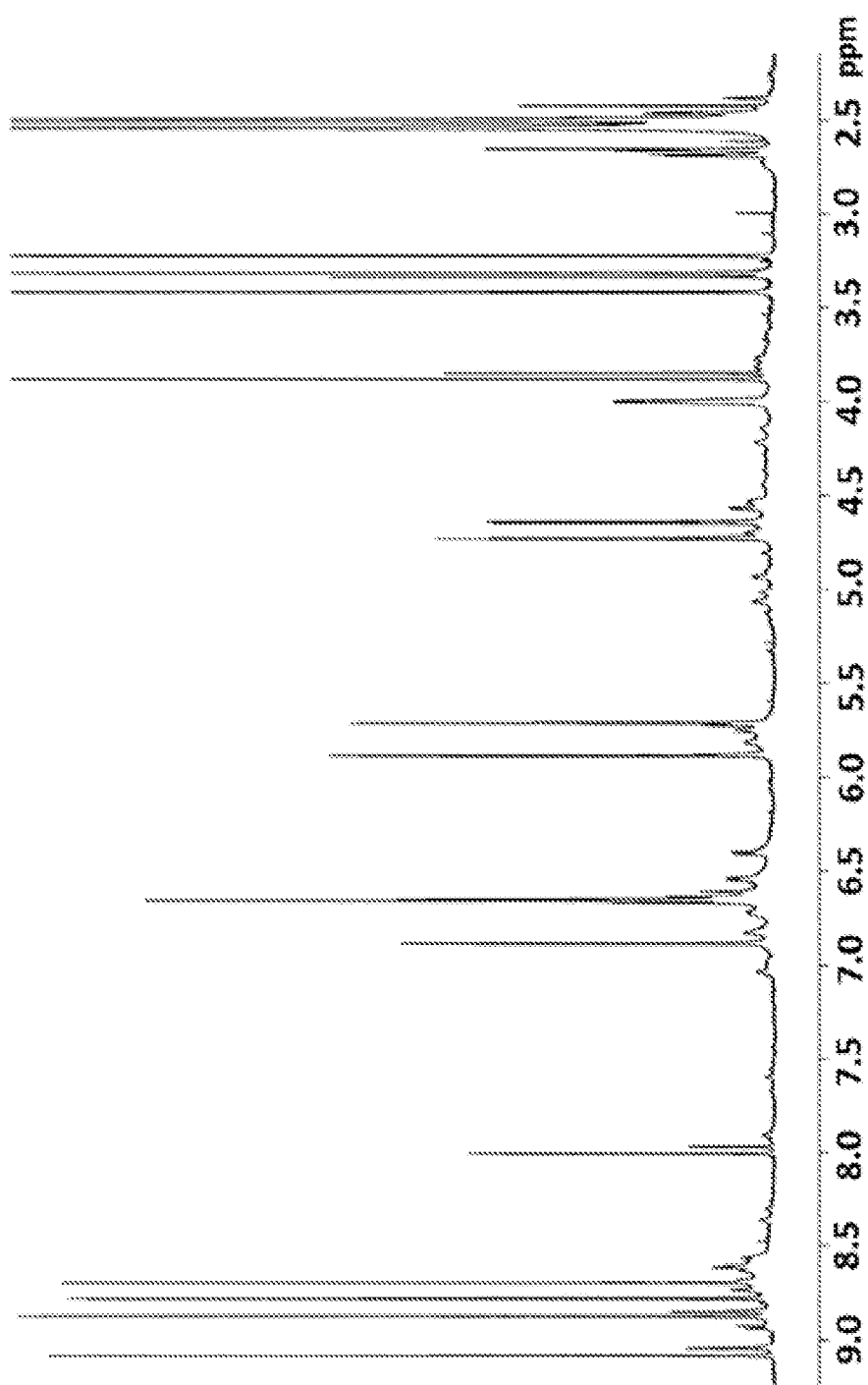


Figura 4

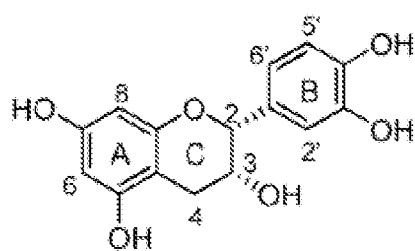


Figura 5

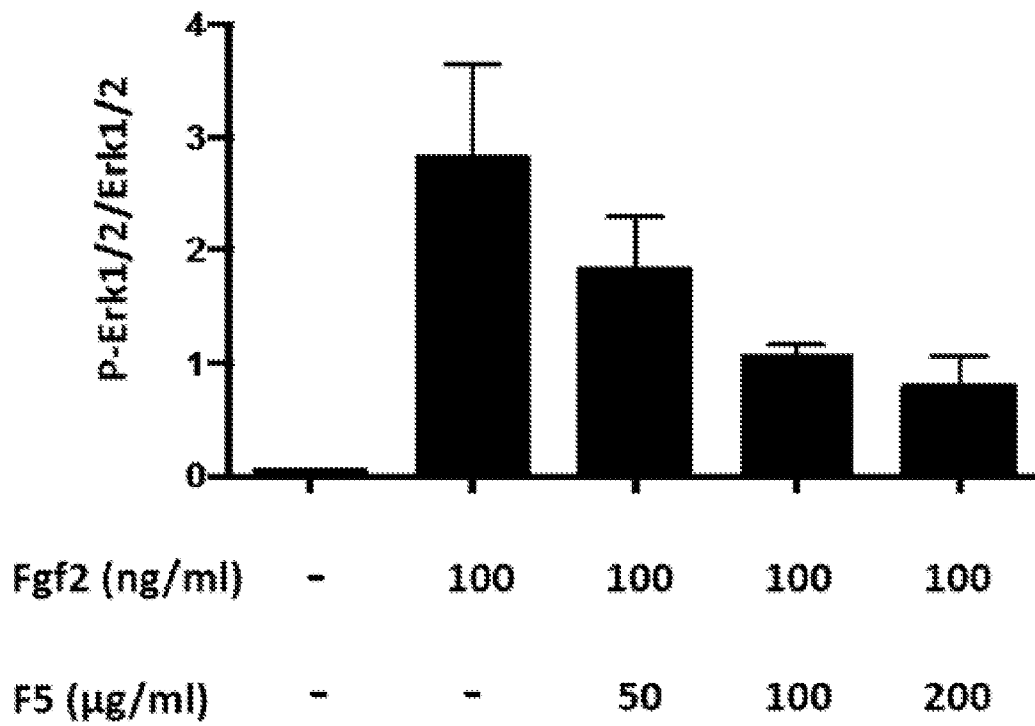


Figura 6

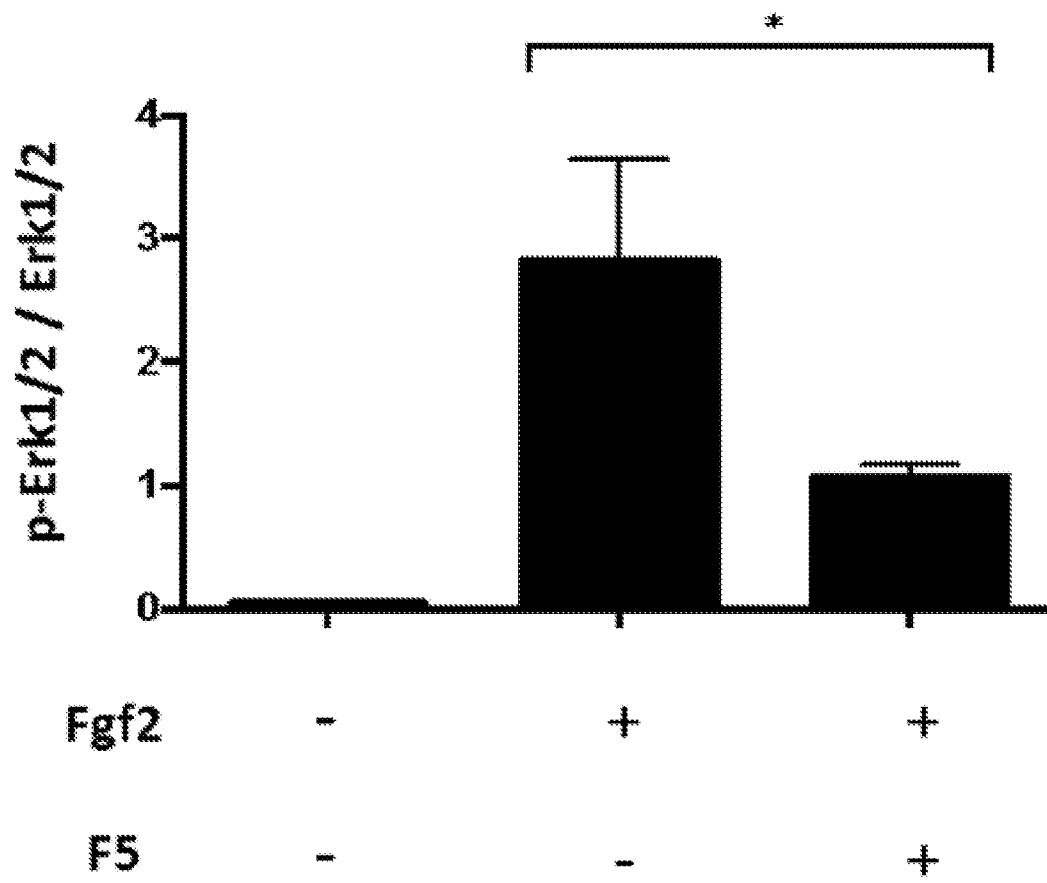


Figura 7

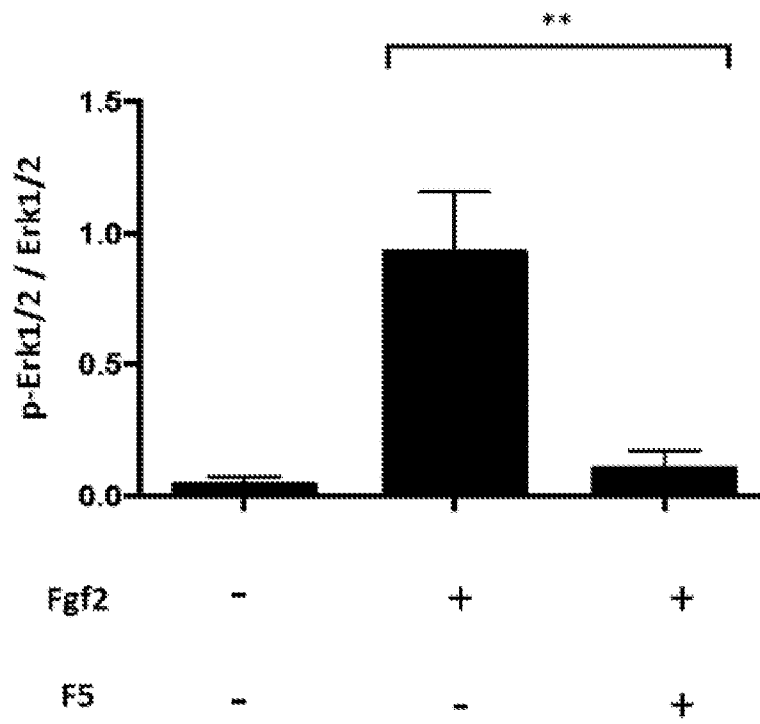


Figura 8

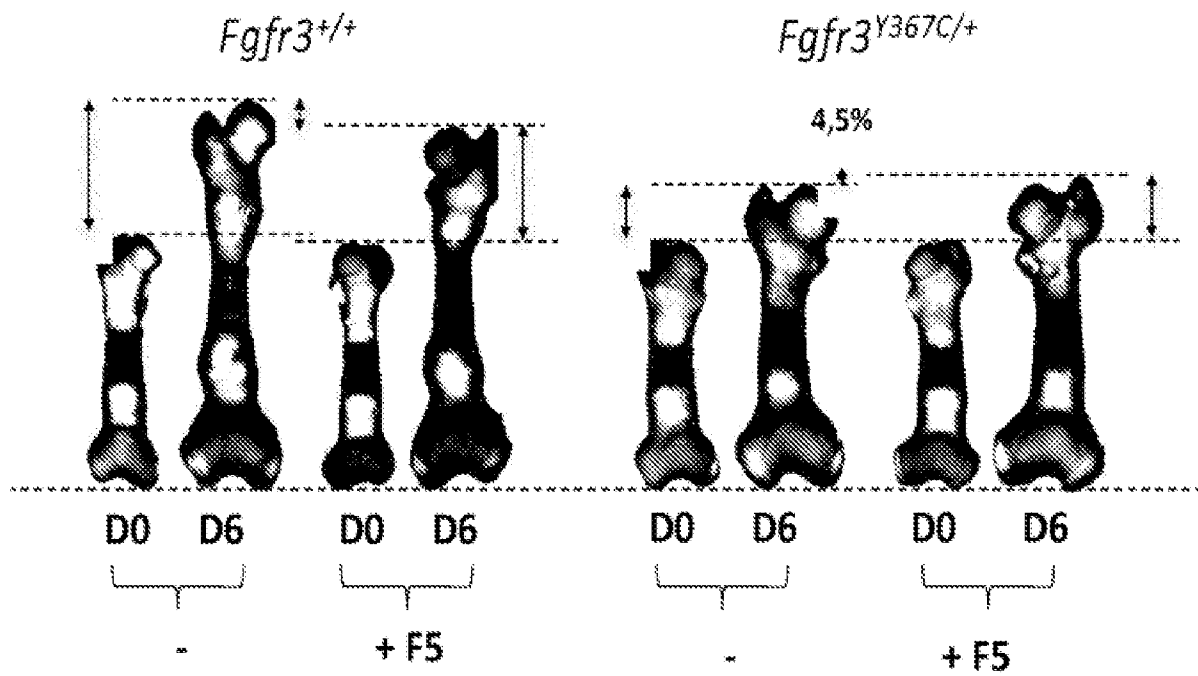


Figura 9

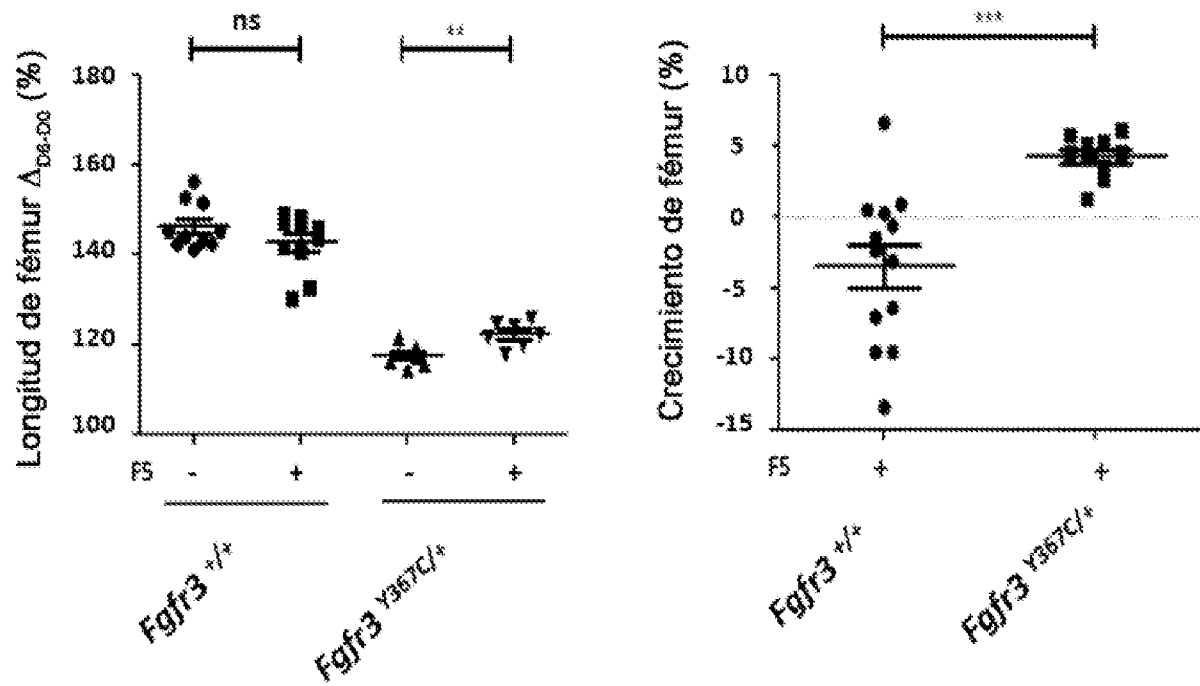


Figura 10

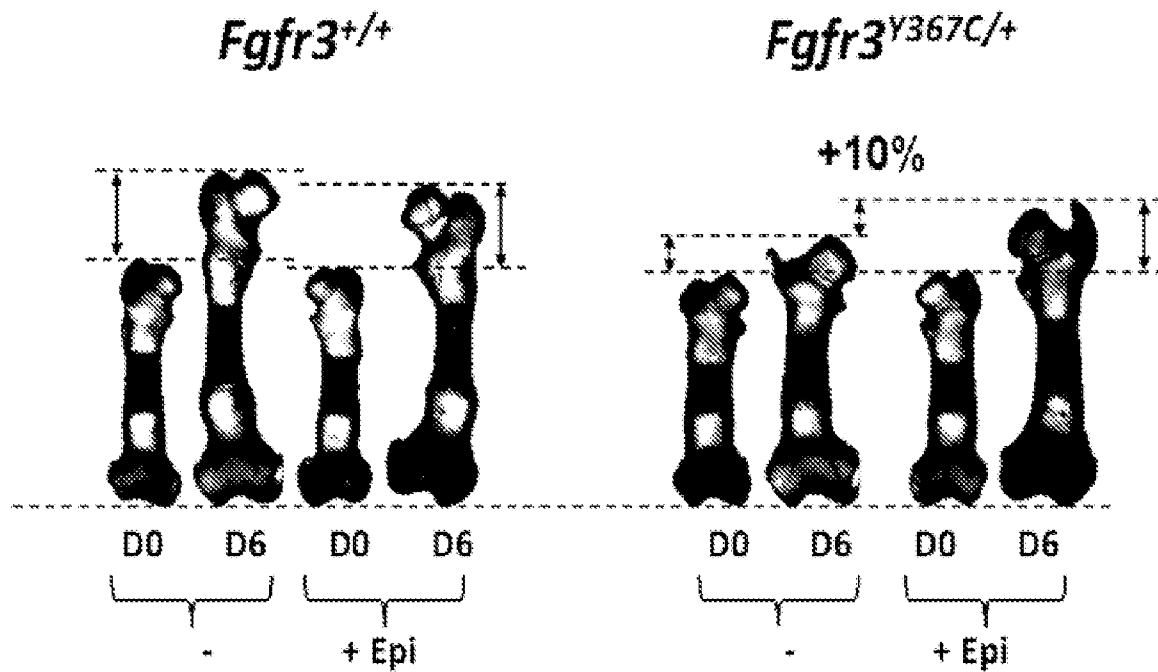


Figura 11

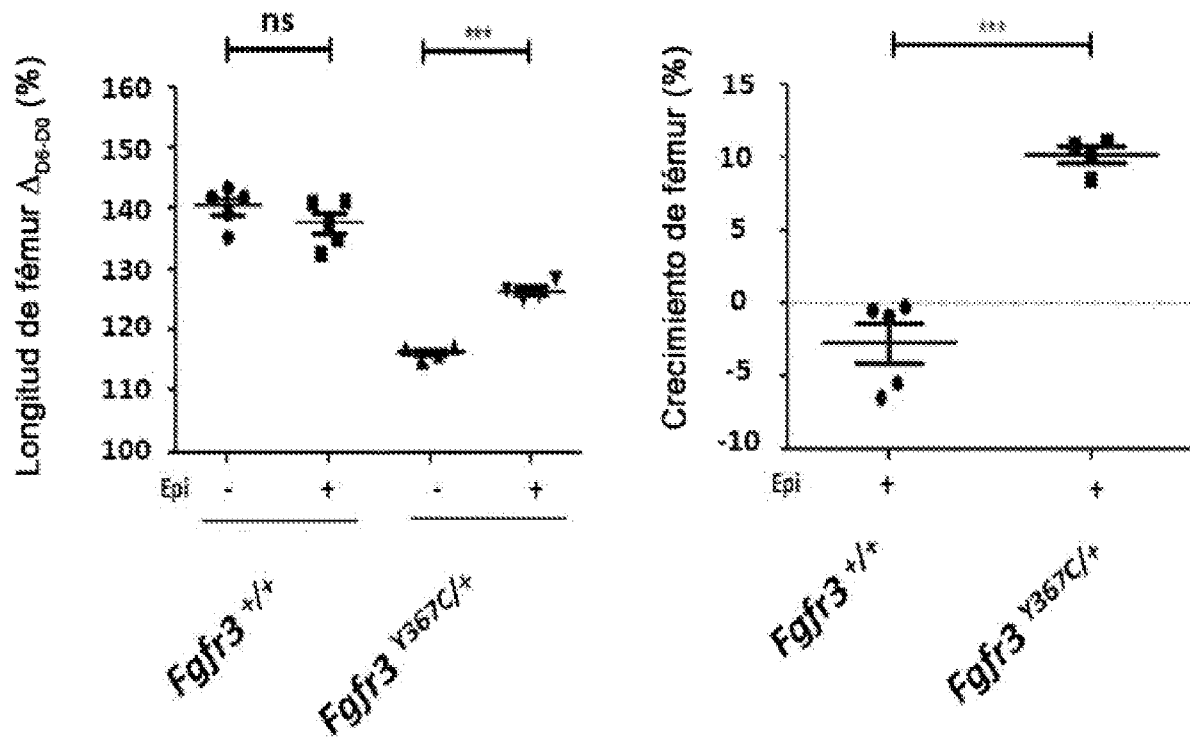


Figura 12

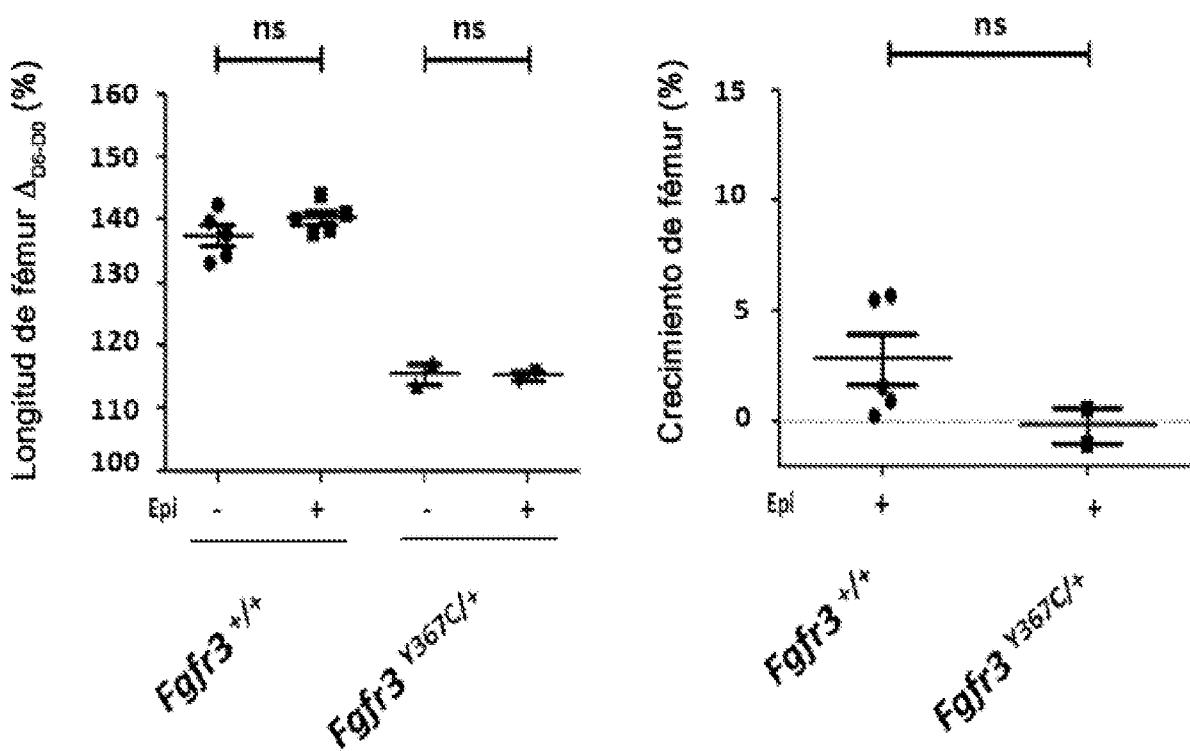


Figura 13

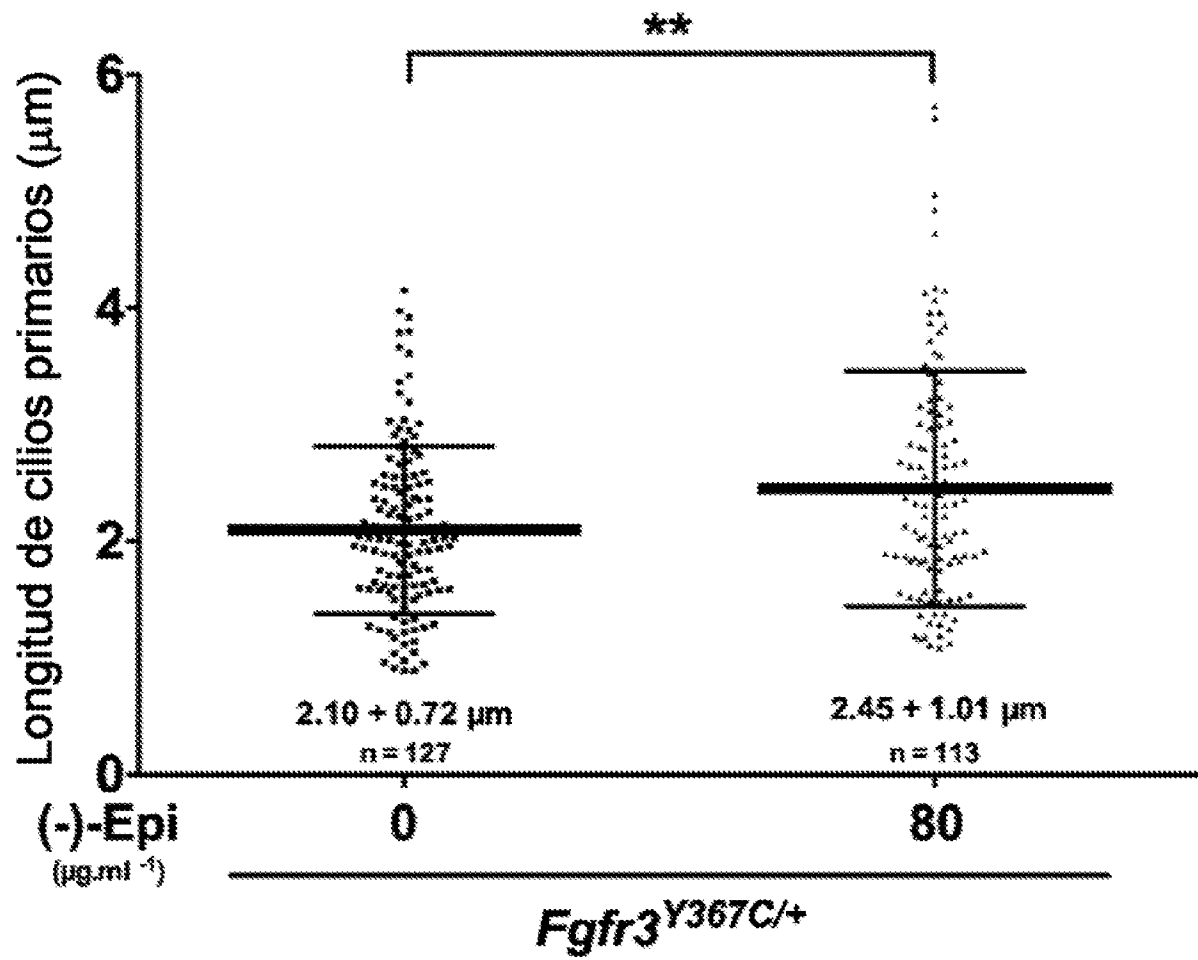


Figura 14