

(11) Número de Publicação: **PT 1435976 E**

(51) Classificação Internacional:

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)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.09.26**

(30) Prioridade(s): **2001.09.26 IS 608501**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.07.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.04.18**
025/2007

(73) Titular(es):

GENIS EHF
MYRARGOTU 2 101 REYKJAVIK IS

(72) Inventor(es):

JON M. EINARSSON IS

JOHANNES GISLASON IS

MARTIN PETER, INST. FÜR ORG. CHEMIE UND STRUCTUR. DE

SVEN BAHRKE, INST. FÜR ORG. CHEMIE UND STRUCTUR. DE

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA INCLUINDO QUITO-OLIGÓMEROS**

(57) Resumo:

RESUMO**"COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA INCLUINDO QUITO-OLIGÓMEROS"**

São descritas composições incluindo quito-oligómeros que se podem obter da quitina, que incluem oligómeros de N-acetilglucosamina (NAG) e glucosamina, em que pelo menos 50% dos oligómeros apresentam um comprimento de cadeia de cerca de 2-50, e o grau de desacetilação dos oligómeros está adentro da gama se cerca de 0-70%, preferivelmente cerca de 30-50%. As composições são extremamente úteis como composições farmacêuticas para o tratamento de patologias das articulações, tais como a artrite reumatóide e a osteoartrite. Também são descritos métodos para o tratamento de patologias das articulações e para o tratamento da actividade inflamatória.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA INCLUINDO QUITO-OLIGÓMEROS"

DOMÍNIO DA INVENÇÃO

A invenção presente insere-se no domínio farmacêutico, especificamente para o tratamento de patologias das articulações tais como a artrite reumatóide e a osteoartrite.

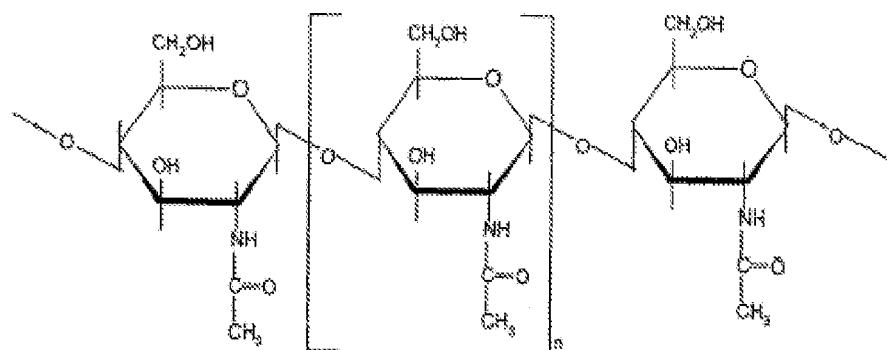
ANTECEDENTES DA TÉCNICA

A quitina e o quitosano são biopolímeros, que são tipicamente obtidos a partir de restos de cascas de crustáceos, mas também se podem obter a partir de determinados fungos. O quitosano pode ser preparado a partir da quitina por desacetilação química. Isto é tipicamente levado a cabo hidrolisando a ligação *N*-acetilo com álcali concentrado (NaOH ou KOH a 40-50%). Por definição, o quitosano é em geral descrito como um copolímero de D-glucosamina (GlcN) e *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc ou NAG), que é insolúvel em água a valores de pH superiores a 6,2 - ponto isoeléctrico do grupo amina livre - mas se dissolve a valores de pH inferiores a 6,2 (Veja-se os Esquemas 1 e 2). No quitosano, 65-100% das unidades

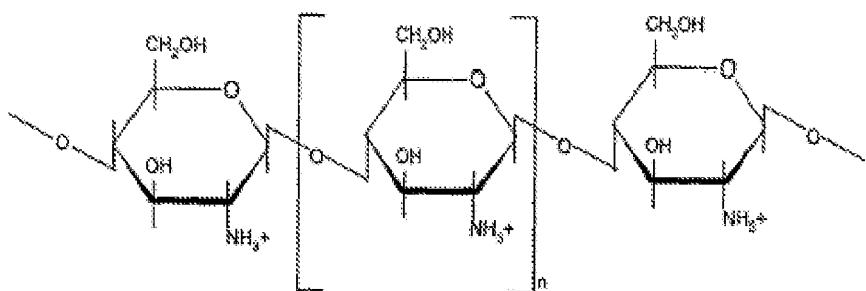
monoméricas são D-glucosamina, o que é habitualmente descrito como quitina desacetilada a 65-100%. As propriedades químicas e biológicas do quitosano são directamente influenciadas pelo seu grau de desacetilação (DDA) e pelo seu grau de polimerização (DP), isto é, pelo comprimento da cadeia do polímero.

Em solução a um valor de pH inferior a 6,2, e quando os grupos amina dos resíduos de D-glucosamina estão protonados, o quitosano é um polímero com carga positiva. Sendo uma amina, o quitosano é uma base fraca e pode formar sais com ácidos, tais como os ácidos carboxílicos e os ácidos inorgânicos. A maior parte destes sais são solúveis em água.

Na sua forma natural, a quitina é insolúvel em água. No entanto, ela pode ser tornada solúvel em água por desacetilação parcial através de um tratamento com álcalis [1]. A quitina parcialmente desacetilada, com um DDA de 35-50%, é solúvel em água numa larga gama de valores de pH. Demonstrou-se que esta forma de quitina solúvel em água é um substrato excelente para os enzimas de transformação da quitina [2, 3]. Para além disto, a preparação de quitina solúvel em água demonstrou ser um passo indispensável para se manter um rendimento elevado em quito-oligómeros utilizando quitinases, uma vez que a quitina insolúvel é hidrolisada muito devagar pelas quitinases [1].



Esquema 1. Estrutura da quitina completamente acetilada (poli-*N*-acetil-D-glucosamina).



Esquema 2. Estrutura da quitosano completamente desacetilada (poli-D-glucosamina, forma protonada a pH baixo).

Os quito-oligômeros (QO) e a quitina e o quitosano com pequena massa molecular são segmentos mais curtos, obtidos a partir de polissacáridos de elevada massa molecular, das ligações beta-(1,4) que ligam os monómeros. Os quito-oligômeros referem-se, neste documento, a polímeros com comprimento curto ou médio, preferivelmente apresentando um grau de polimerização (DP) na gama de entre

2 e 50, correspondendo a uma massa molecular de entre cerca de 360 e cerca de 10.000 Da. Os QO obtidos a partir de quitina solúvel em água (DDA 35-50%) mantêm a solubilidade em água. Os QO são obtidos quer quimicamente pela utilização de ácidos fortes tais como ácido clorídrico que catalisa a hidrólise das ligações beta-(1, 4) a temperaturas elevadas, quer por hidrólise enzimática [4,5]. A hidrólise enzimática é preferida uma vez que o processo é mais fácil de controlar e as condições são muito mais suaves envolvendo um menor risco de reacções colaterais de que resultem modificações do material.

A artrite é um termo geral para a inflamação da(s) articulação(ões), e por vezes utilizado como designação genérica de todas as patologias de articulares. A osteoartrite é a forma mais habitual de patologia das articulações na qual há danos na superfície da articulação e uma reacção a anormal no osso subjacente. Utilizam-se outros termos para descrever esta doença, tais como 'osteoartrose', 'artrose' e 'doença degenerativa das articulações'. A doença afecta sobretudo os joelhos, as ancas, e as mãos (mais comum), bem como os pés, o pescoço e as costas. A artrite reumatóide é uma doença inflamatória das articulações que é habitual, que provoca inflamação do revestimento (sinóvia). Isto provoca mais inchaço e outros sinais de inflamação do que é habitual na osteoartrite, e pode levar a danos severos nas articulações.

Bioactividade dos quito-oligossacáridos

A actividade biológica da quitina e do quitosano está abundantemente documentada na literatura. Foi claramente demonstrada por estudos de bioactividade a importância do grau de polimerização (DP) bem como do grau de desacetilação (DDA) [6]. Nas plantas, os oligómeros com DP 5-7 são mais activos do que os que apresentam DP 1-4 [7]. Isto tem sido explicado com base na capacidade das proteínas designadas como proteínas semelhantes à quitinase (CLP) para se ligarem a quito-oligómeros. Estas proteínas partilham uma homologia de sequência elevada, e têm uma relação estrutural, com a família das quitinases 18 [8]. As CLP não possuem actividade catalítica por causa de uma mutação num só local do seu domínio catalítico, mas mantêm a sua capacidade de ligação, que em geral envolve 5-7 unidades de quito-oligossacáridos.

N-acetil-glucosamina, quito-oligossacáridos e hialuronana:

A glucosamina (GN ou GlcN) é uma glucose modificada em que o grupo OH no carbono dois da molécula de açúcar está substituído por NH₂. Nas células animais, só se encontra glucosamina sob duas formas; sob a forma de glucosamina-6-fosfato (GN-6-P) e sob a forma de N-acetylglucosamina (NAG ou GlcNAc). O aminoácido GN-6-P é sintetizado a partir de glutamina e de frutose-6-fosfato (F-6-P). Esta reacção é catalisada pela glucosamina sintase

e é o passo determinante da velocidade da biossíntese do aminoácúcar. O GN-6-P é o precursor de todas as hexosaminas e dos derivados de hexosamina. O GN-6-P pode subsequentemente ser acetilado pelo acetil coenzima A a *N*-acetil-glucosamina (NAG). A NAG pode subsequentemente ser transformada em *N*-acetilgalactosamina ou em *N*-acetilmanosamina. Estes três aminoácúcares são importantes na glicosilação de proteínas bem como a título de blocos de construção para glicolípidos, glicosaminoglicanas (GAG), hialuronana e proteoglicanas. A hialuronana (HA), esqueleto de muitas proteoglicanas, é um polissacárido (com até 25.000 unidades de açúcar) composta por unidades de dissacárido que se repetem, de NAG e ácido glucurónico (GlcA). Crê-se que a HA foi a primeira forma de GAG ao longo da evolução. A HA é não só um polissacárido importante na cartilagem, no fluido sinovial, no humor vítreo dos olhos e na pele dos vertebrados, mas pode também desempenhar um papel importante na organização dos tecidos, na morfogénese, nas metástase do cancro, na cicatrização de feridas e na inflamação [9]. É produzida em grandes quantidades durante a cicatrização das feridas, e é um constituinte essencial do fluido das articulações (fluido sinovial), no qual serves de lubrificante [10]. A NAG aumenta a síntese da hialuronana por parte das células do mesotélio e dos fibroblastos, de um modo proporcional à dose [11]. A HA é segregada das parafora das células por um complexo enzimático, denominado HA sintases (HAS) que se encontra adentro da membrana plasmática [9]. Crê-se que estes enzimas resultam de uma evolução a partir das quitina sintases ou das celulose

sintases [9]. Uma HA sintase de murganho (HAS1) é capaz de sintetizar a HA *in vitro*, quando lhe são fornecidos UDPGlcA e UDP-NAG [12]. Quando se incuba o HAS1 apenas com UDP-NAG, ele sintetiza quito-oligoasacáridos (QO) [12]. Se se demonstrasse que as sintases de HA eucarióticas possuíam actividade semelhante *in vivo*, isto sugeriria novas funções para os QO nos mamíferos [9]. Os QO são produzidos *in vivo* durante o desenvolvimento dos vertebrados (*Xenopus*, *zebrafish* e murganho), quando a sub família semelhante a quitinase DG42/HAS sintetiza tanto QO como HA durante a diferenciação celular e demonstrou-se que os QO eram vitais para uma formação normal do eixo anterior/posterior na fase de gastrula tardia [9,12-16], revisto em [8].

Estudos recentes sugeriram métodos para se tratar a artrite pela administração de glucosamina. Estes estudos demonstraram que a administração de glucosamina tende a normalizar o metabolismo da cartilagem, inibindo a sua degradação, e estimulando a síntese de proteoglicanas, da qual resulta uma restauração cortical da função articular. A eficiência terapêutica do tratamento com glucosamina foi demonstrada em diversos estudos com animais e com seres humanos.

A Patente U. S. Nº. 6.117.851 [17] ensina que a (poli)-*N*-acetilglucosamina (poli-NAG), isto é, a quitina pode ser utilizada para tratar a osteoartrite e/ou para aliviar os seus sintomas. No entanto, a quitina, actuando como fibra insolúvel no intestino, não é provavelmente

digerida e absorvida. Devido à sua pequena solubilidade no ambiente intestinal, a quitina também não deve ser facilmente hidrolisada pela quitinase ácida dos mamíferos que se descobriu recentemente (AMCase) [18] nem é provável que existam bactérias intestinais que produzam fragmentos de quitina com baixa massa molecular disponíveis para serem absorvidos. A quitina parcialmente desacetilada, no entanto, é solúvel em água a qualquer valor de pH e está facilmente disponível como substrato para a AMCase ou para a flora intestinal.

Actividade dos quito-oligómeros sobre a reacção imunitária e sobre as reacções inflamatórias - condróцитos e macrófagos:

Foi sugerido que a quitina e o quitosano possuem actividade imunoestimulante nos mamíferos [19-22]. A quitina e o quitosano foram também estudados na cicatrização de feridas e como substitutos artificiais de pele durante alguns anos [19-22]. Nestes estudos, a quitina e o quitosano demonstraram um efeito inibidor significativo sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos activados. A hexa-*N*-acetilquitohexose (GlcNAc)₆ e a penta-*N*-acetilquitohexose (GlcNAc)₅ também inibem a produção de NO mas são menos potentes. Estes resultados indicam que o efeito positive dos materiais quitinosos sobre a cicatrização das feridas é pelo menos em parte relacionado com a sua inibição da produção de NO pelos macrófagos activados [23]. Também foi demonstrado que tanto a

glucosamina como a acetilglucosamina inibem a produção de NO em condrócitos articulares normais, e que a N-acetilglucosamina exibe um novo mecanismo para a inibição dos processos inflamatórios [24].

A proteína semelhante a quitinase YKL-40, também denominada glicoproteína-39 da cartilagem humana (HC gp-39), é um membro da família das quitinases 18 [25]. A YKL-40 é segregada pelos condrócitos, pelas células sinoviais, e pelos macrófagos [26]. A HC gp-39 (YKL-40) parece ser induzida nos seres humanos quando envelhecem e nos jovens pacientes com osteoartrite [28]. Foi descrito que a YKL-40 desempenha um papel como auto-antigéneo na artrite reumatóide (RA) [29-31] e que está expressa nos seres humanos doentes, na cartilagem osteoartrítica e nos osteófitos, mas não no tecido isento de doença [32].

BIBLIOGRAFIA

1. Cho, Y.-W., et al., Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules*, 2000, **1**(4): págs. 609-614.

2. Tokuyasu, K., M. Ohnishi-Kameyama, e K. Hayashi, Purification and characterization of extracellular quitina deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, **60**(10): págs. 1598-1603.

3. Dunkel, C. e D. Knorr, Enhancement of chitin deacetylase activity in *Mucor rouxii* and *Absidia coeruleuea* with chitin and its detection with a non radioactive substrate. *Food Biotechnology*, 1994, **8**(1): págs. 67-74.

4. Ilyina, A. V., N. Y. Tatarinova, e V. P. Varlamov, The preparation of low- molecular-weight chitosan using chitinolytic complex from *Streptomyces kurssanovii*. *Process Biochemistry*, 1999, **34** (9): págs. 875-878.

5. Li, T., R. Brzezinski, e C. Beaulieu, Enzymatic production of quitosan oligomers. *Plant Physio. Biochem.*, 1995, **33** (5): págs. 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): págs 72-9.

7. Kendra, F. F. e 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, **b**(3): págs. 276-281.

8. van der Holst, P. P. G., H. R. M. Schalaman, and H. P. Spaink, Proteins involved in the production and perception of oligosaccharides in relation to plant and

animal development. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, **11**: págs. 608-611.

9. Les, J. Y. and A. P. Spicer, Hyaluronan: a multifunctional, megDalton, stealth molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000, **12**: págs. 581-586.

10. Alberts, B., et al. *The Cell*, Terceira Edição, 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 mesothelial cells and fibroblasts. *Advances in Peritoneal Dialysis*, 1998, **14**: págs. 31-5.

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): págs. 497-506.

13. Semino, C.E., e M. L. Allende, Chitin oligosaccharides as candidate patterning agents in zebrafish embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 2000, **44**(2): págs. 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), págs. 114-23.

15. Semino, C. E., et al. Homologs of 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**: págs. 2548-2553.

16. Bakkers, J., et al., An important developmental role for oligosaccharides during early embryogenesis of cyprinid fish, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, **94**: págs. 7982-7986.

17. Sherman, W. T., e R. W. Gracy, Treatment of arthritis 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 Cytochemistry Society, 2002, **50**(8): págs 1081-1089.

19. Merayo-Lloves, J. M., et al., Chitosan modulates corneal wound healing and increases corneal transparency in an experimental model of photorefractive keratectomy (PRK), Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000, **41**(4): pág. 3521B719.

20. Sugamori, T., et al., Local haemostatic effects of microcrystalline partly deacetylated chitin hydrochloride, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, **49**(2): págs. 225-232.

21. Ueno, H., et al., Chitosan accelerates de production of osteopontin from polymorphonucleas leukocytes, *Biomaterials*, 2001, **22**(12): págs. 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): págs. 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): págs. 229-233.

24. Shikhman, A. R., et al., N-acetylglucosamine prevents IL-1 β -mediated activation of human chondrocytes, *J. Immunol.*, 2001, **166**(8): págs. 5155-5160.

25. Hakala, B. E., C. White e 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): págs. 25803-25810.

26. Kirckpatrick, 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): págs. 41-54.

27. De Ceuninck, F., et al., Development of an enzyme-linked Immunoassay for the quantification of YKL-40 (carilage gp-39) in guinea pig serum using hen egg yolk antibodies, *Journal of Immunological Methods*, 2001, **252**: págs 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**. Págs. 449-459.

29. Boots, A. M. H., G. F, M. Verheijden, e E. S. Bos, Proteins and novel peptides derived from autoantigen for use in immunotherapy of autoimmune diseases, em 19 págs. Continuação em parte da U. S. 5.736.507, 1996, Akzo Nobel N. V., Holanda: 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): págs: 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), págs. 351-360.

32. Connor, J. et al., Human cartilage glycoprotein 39 (HC gc-39) mRNA expression in adult and fetal chondrocytes, osteoblasts and osteocytes by *in-situ* hybridization, Osteoarthritis and Cartilage, 2000, **8**(2): págs. 87-95.

33. Bahrke, S. et al., Sequence analysis of Chitooligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Postsource Decay Mass Spectroscopy, Biomacromolecules, **3**(4): págs. 696-704.

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

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os inventores constataram que composições contendo quito-oligómeros (com 2 a 50 unidades) proporcionam resultados notavelmente bons no alívio dos sintomas de patologias articulares tais como a artrite. Os resultados indicam que os quito-oligómeros parecem ser surpreendentemente mais eficazes do que a glucosamina monomérica,

para este efeito. Sugere-se que os ligandos quitinosos, por exemplo dos quito-oligossacáridos (QO), por se ligarem à YKL-40 ou a outras proteínas semelhantes a quitinases, podem funcionar diminuindo a expressão destas e/ou diminuindo a sua actividade como auto-antigéneo ao mascarar, ou alterar, os seus epítopos.

Observámos efeitos anti-inflamatórios em sujeitos humanos que sofriam de artrite reumatóide depois da administração de quito-oligómeros durante 3-4 semanas. Estes efeitos anti-inflamatórios podiam possivelmente influenciar os condrócitos, macrófagos e possivelmente os osteoblastos através da YKL-40.

Os resultados preliminares indicam uma indução do crescimento dos condrócitos humanos *in vitro*, quando incubados com quito-oligómeros (dados não publicados).

De acordo com a hipótese que se apresenta neste documento, as composições de oligómeros da invenção proporcionam substratos oligoméricos benéficos que bloqueiam as proteínas semelhantes a quitinases, e têm também os efeitos benéficos conhecidos de NAG e GlcN, quando os oligómeros são degradados.

Postula-se também neste documento que a quitina parcialmente desacetilada e solúvel em água proporcionará também efeitos anti-inflamatórios e um efeito terapêutico

contra patologias das articulações, uma vez que estes polímeros solúveis em água permitem alguma degradação pela quitinase ácida e possivelmente pelos enzimas quitolíticos da flora intestinal, proporcionando *in situ* quito-oligómeros solúveis em água e NAG e monómeros de glucosamina.

Num primeiro aspecto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica tal como se define na reivindicação 8 em que os oligómeros possuem um comprimento de cadeia com um DP de cerca de 2-50, e em que o grau de desacetilação dos oligómeros esteja compreendido entre cerca de 0-70%.

Num outro aspecto, a invenção proporciona a utilização de quito-oligómeros para o fabrico de um medicamento para o tratamento das patologias das articulações, em que nos quito-oligómeros se incluem oligómeros de *N*-acetil-glucosamina (NAG) e glucosamina, em que o comprimento da cadeia dos quito-oligómeros esteja compreendido entre cerca de 1-50, e em que pelo menos 60%, em peso dos quito-oligómeros apresente um comprimento de cadeia de pelo menos 2, e em que o grau de desacetilação da glucosamina esteja compreendido entre cerca de 0-50%.

A invenção proporciona, sob um seu outro aspecto, a utilização de quito-oligómeros para o fabrico de um medicamento contra a actividade inflamatória no corpo humano.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Análise por GPC da Amostra 1 com Biogel P4. Listam-se na Tabela 1 os DP (comprimento da cadeia polimérica) e os homólogos para cada comprimento de cadeia.

Figura 2. Distribuição de homólogos dos quito-oligómeros da Amostra 1. e da Amostra 2, tal como determinados por MADM-TOF de amostras tal qual. O sinal relativo proveniente da análise é calculado adicionando os sinais para todos os homólogos de DP2 a DP10, e ajustando a 100%. O sinal para cada homólogo é então expresso em valor relativo do seu sinal (%)

Figura 3. Distribuição do conjunto de DP dos quito-oligómeros da Amostra 1 e da Amostra 2, tal como avaliada do MS em MALDI-TOF. Os homólogos de cada DP, entre DP2 e DP10, tal como ilustrados na Figura 2, são adicionados e expressos sob a forma de sinais relativos dos conjuntos (%).

DESCRÍÇÃO PORMENORIZADA

A composição da invenção inclui oligómeros de *N*-acetil-glicosamina (NAG) e glucosamina, apresentando os quito-oligómeros um comprimento de cadeia adentro da gama de cerca de 2-50, e sendo o grau de desacetilação nos oligómeros, de entre cerca de 30 e 50% ($F_A = 0,5-0,7$).

O termo quito-oligómeros, tal como se utilize

neste documento, refere-se a oligómeros e a polímeros de um ou ambas de entre *N*-acetil-glicosamina (NAG) e glucosamina, isto é, trata-se de cadeias oligoméricas com um comprimento mínimo de 2 (dímeros). Tal como se descreve neste documento e nos exemplos e nos exemplos que se seguem, a composição é especialmente útil para utilização como medicamento.

O termo homólogo define oligómeros com cadeias com o mesmo comprimento e com a mesma razão entre monómeros, mas que podem ter sequências diferentes, isto é, o homólogo A3D2 pode ser constituído, por exemplo, pelas sequências oligoméricas A-A-A-D-D e A-A-D-A-D. (A e D designam respectivamente *N*-acetil-glicosamina e glucosamina).

De preferência o grau de desacetilação dos quito-oligómeros será de cerca de 35-50%, tal como 40-50%, incluindo cerca de 40% e cerca de 50%. O grau de desacetilação, DDA, pode também ser expresso como factor de desacetilação, F_A , em que, por exemplo, um DDA de 30% corresponde a um $F_A=0,7$.

De preferência cerca de 60% dos quito-oligómeros têm um comprimento de cadeia na gama de cerca de 2-50, e mais preferivelmente 75% destes, e ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 85%.

Podem obter-se as composições da invenção a partir de matéria-prima quitinosa tal como cascas de camarões. Desacetila-se a quitina de preferência com base

forte, tal como dissolvendo quitina substancialmente seca em solução concentrada de base (por exemplo NaOH ou KOH a 40-60%), a uma temperatura na gama de entre cerca de 70-100°C, incluindo a gama de entre cerca de 70 e 95°C, tal como entre cerca de 70 e 90°C, por exemplo cerca de 70°C, cerca de 80°C, ou cerca de 90°C. O período reaccional e a concentração de quitina podem ser variados consoante o grau de desacetilação que seja exactamente pretendido. Termina-se a reacção lavando a quitina/quitosano que se obteve com água fria, e pode-se submeter a solução de quitina solúvel a uma hidrólise para se obterem quito-oligómeros, ou pode-se secar o material com meios de secagem adequados, para processamento ulterior ou para armazenagem.

Tal como se mencionou, prefere-se levar a cabo uma hidrólise enzimática da quitina/quitosano para se obterem os quito-oligómeros, no entanto a utilização de ácidos inorgânicos adequados para a despolimerização (por exemplo ácido clorídrico ou ácido nitroso) também se engloba na invenção corrente. Vários enzimas quitinase activos estão disponíveis e podem ser utilizados para este efeito, por exemplo quitinase (EC N°. 3.2.1.14), por exemplo disponível na Sigma-Aldrich, e também a lisozima (EC N°. 3.2.1.17), que se determinou possuir uma actividade de quitinase (veja-se, por exemplo, a Patente U.S. 5.262.310). As condições de incubação com o enzima (razão enzima/substrato, temperatura, pH, período reaccional) podem ser variadas, consoante a actividade específica e as condições de reacção óptimas do enzima que se utilizou. Tal como se demonstra no Exemplo 2 (veja-se Amostra 1 e Amostra

2; produção), podem optimizar-se as condições para se obter um valor pretendido da razão entre oligómeros de pequena e de média dimensão. Os oligómeros mais compridos e os polímeros (DP de 30 e maiores) podem ser opcionalmente separados dos oligómeros de média e pequena dimensões que se pretendem, quer por cromatografia preparativa, quer por precipitação a um pH elevado (cerca de 9, ou superior).

A composição em quito-oligómeros pode ser convenientemente proporcionada sob uma forma essencialmente seca incluindo um pó, flocos ou material fibroso que se pode incluir como enchimento em cápsulas, ou dissolver ou suspender numa solução aquosa, para administração. Uma tal composição pode conter ou ser constituída substancialmente apenas por oligómeros como os que se mencionaram acima, isto é, conter cerca de 80 a 100% de quito-oligómeros. <nas concretizações úteis, as composições contêm entre 20-100%, em peso dos quito-oligómeros referidos , incluindo cerca de 20-95% dos quito-oligómeros referidos, tal como 50-90%. Consoante o processo de fabrico e as condições aplicadas durante a hidrólise da matéria-prima polimérica, estão presentes alguns monómeros de glucosamina, e NAG , nas composições da invenção, como por exemplo sendo 0 a 60% da quantidade total de sacáridos, tal como menos do que cerca de 50%, mas de preferência os monómeros são menos do que cerca de 40% do total de sacáridos, tal como menos do que cerca de 25%, incluindo menos do que 20%. Os nossos resultados de teste, no entanto, indicam que se encontra presente uma certa quantidade de monómeros, e em especial

de NAG, nas composições da invenção, e que podem apresentar um efeito sinérgico positivo.

A composição pode também conter ainda um excipiente ou um diluente aceitável do ponto de vista farmacêutico, uma substância saborizante, um nutriente, ou um corante.

Postula-se que os oligómeros mais curtos são muito importantes para a actividade da composição da invenção. Numa concretização útil, pelo menos 10%, em peso, dos oligómeros da composição têm uma massa molecular de entre 2 e 12, mais preferivelmente pelo menos 15%, em peso, incluindo pelo menos 25%, em peso, e ainda mais preferivelmente pelo menos 50% dos oligómeros terão um comprimento de cadeia de entre 2 e 12. Numa determinada concretização, entre cerca de 15 e 75% dos oligómeros, em peso, entre cerca de 15 e 75% dos oligómeros, em peso, apresentam um comprimento de cadeia de entre 2 e 12, tal como cerca de 50% dos oligómeros, em peso, tal como cerca de 50% dos oligómeros, em peso, preferivelmente entre cerca de 15 e 75% dos oligómeros, em peso, apresentam um comprimento de cadeia de entre 2 e 9, e em determinadas concretizações pelo menos cerca de 50% dos oligómeros, em peso, entre cerca de 15 e 75% dos oligómeros, em peso, apresentam um comprimento de cadeia de entre 2 e 15, tal como cerca de 50% dos oligómeros, em peso, tal como pelo menos 60%, em peso, incluindo pelo menos 70%, em peso, ou pelo menos 80%, em peso.

Noutro aspecto da invenção, proporciona-se uma composição farmacêutica que inclua a composição oligomérica tal como se descreve neste documento.

A composição farmacêutica assumirá de preferência uma forma adequada para administração por via oral, tal como uma forma seca que se possa dissolver facilmente, por exemplo num copo com água. Incluem-se nessas formas a de pó seco, a granular, a de flocos, a de material fibroso e a de pasta. No entanto a composição também pode estar contida em comprimidos ou em cápsulas.

Noutras concretizações úteis, a composição da invenção assume uma forma adequada para a administração sistémica, tal como por administração intramuscular, subcutânea, ou endovenosa. Essas formas adequadas são formas de soluções com um veículo ou excipiente adequado do ponto de vista farmacêutico, tal como é praticado habitualmente em farmácia. Essas formas de solução são estéreis, e o pH estará adequadamente ajustado e tamponizado. Para utilização endovenosa, a concentração total do soluto deve ser controlada, para que a preparação se torne isotónica.

Tal como se demonstra nos exemplos que acompanham esta descrição, verifica-se que a composição farmacêutica é útil para o tratamento de patologias reumatóides das articulações, num sujeito que dela necessite, e verificou-se que é especialmente útil para o tratamento de uma patologia das articulações seleccionada de entre o conjunto

constituído por osteoartrite e artrite reumatóide. neste contexto, inclui-se no significado de tratamento o alívio dos sintomas da patologia das articulações, num sujeito a quem se administre a composição.

Sob um outro aspecto ainda, é proporcionada uma composição aplicada em tratamentos anti-inflamatórios e no tratamento de patologias das articulações, a qual inclui quitina parcialmente desacetilada e solúvel em água, com um grau de desacetilação na gama de entre cerca de 35 e cerca de 50%. A solubilidade do polímero em água permite que ocorra alguma degradação do polímero pelos enzimas quitolíticos produzidos pela flora intestinal, e portanto quando se ingere, a composição proporciona *in situ* quito-oligómeros solúveis em água, bem como monómeros de glucosamina, embora na mesma quantidade que os quito-oligómeros descritos acima.

Sob outro aspecto ainda, a invenção proporciona a utilização de quito-oligómeros tais como os que se descreveram acima, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de patologias das articulações, tais como a osteoartrite e a artrite reumatóide.

Sob ainda um outro aspecto, é proporcionada a utilização das composições descritas acima para o tratamento contra a actividade inflamatória no corpo humano, bem como a utilização das composições referidas para o fabrico de um medicamento para o tratamento contra a actividade inflamatória, nos ossos e nos tecidos magros.

EXEMPLOS

**Exemplo: Caracterização dos quito-oligómeros:
métodos analíticos**

1A: Determinação dos conteúdos em água e em cinzas

Analisa-se gravimetricamente o conteúdo em água de uma amostra seca por atomização de 4-5 g de quito-oligómeros, pesando-a antes e depois de uma incubação durante 3 horas a 105°C. determina-se o conteúdo em cinzas por combustão completa a 800°C durante 3 horas, calculando-se sob a forma de uma percentagem de um resíduo inorgânico em peso, com base no peso seco.

1B: Determinação do grau de desacetilação por titulação directa

Misturam-se quito-oligómeros (500 mg, corrigidos quanto a cinzas e a humidade) com 125 mL de HCl 0,060 N num balão de Erlenmeyer que se rolhou, dissolvendo-se de um dia para o outro a 22°C num agitador orbital (a 150 rpm). Em seguida, adicionaram-se 125 mL de água destilada e agitou-se a solução durante pelo menos mais 15 minutos. Transferiram-se 50,0 g da solução para um copo, e titulou-se com uma solução 0,500 N de NaOH, adicionada a um caudal de 1,00 mL/minuto (bomba do HPLC). Monitorizou-se o valor do pH entre pH 1,8 e 9, e calculou-se a DDA com base no

volume de NaOH consumido entre os pontos de inflexão da curva de titulação, de um pH de 3,75 a um pH de 8,0, utilizando a equação DDA = Vol(mL) NaOH*1616*0,0500/100 mg de quitosano. Cada amostra foi titulada em triplicado.

1C: Teste com DNS para determinar o grau médio de polimerização

Mediu-se o grau médio de polimerização (valor de DP) na solução de oligómero a 0,50% por um teste de redução de açúcares envolvendo o ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) como reagente, e a glucose como um padrão. Este teste tinha sido originalmente descrito por Miller [34]. Um volume de 1,00 mL de uma solução de oligómeros de quitosano (a 5,00 mg/mL, corrigidos quanto à humidade e cinza presentes, em ácido acético), com 2,00 mL de reagente de DNS, ferveu-se durante 8 minutos, arrefeceu-se e centrifugou-se a 2.000 x g durante 3 minutos. Mediu-se a densidade óptica do sobrenadante a 540 nm, num espectrofotômetro, e calculou-se o valor médio de DP utilizando como padrão a absorvância de glucose a 1,00 mg/mL (5,55 M). Utilizou-se como branco a 540 nm, água (a 1,00 mL em 2,00 mL de solução de DNS). O valor médio da massa molecular utilizada para o cálculo de DP foi de 200 Da. Cada amostra foi avaliada em duplicado.

1D:Análise por Cromatografia de Permeação de Gel com BioGel P4 (GPC)

Montaram-se em série duas colunas (Pharmacia), contendo BioGel P4, de grau fino (BioRad, Munique,

Alemanha), utilizando-se como fase móvel um tampão de acetato de amónio 0,05 M, ajustado com ácido acético 0,23 M a um pH de 4,2. O caudal utilizado foi de 27,7 mL/hora. A detecção foi levada a cabo num detector de índice de refracção Shimadzu RID 6A. Recolheram-se fracções, misturaram-se as adequadas, e liofilizou-se antes de se analisar por análise de MS, MALDI-TOF.

1E: Análise por Espectrometria de Massa MALDI-TOF

Preparação da amostra: Colocaram-se no alvo soluções de amostras em H₂O (1 μL), e misturaram-se com 1 μL de uma solução a 5% de THAP ou de DHB em MeOH. Depois de secar à temperatura ambiente, voltou a dissolver-se a amostra em 1 μL de MeOH para se obter uma camada de cristais muito pequenos, quando se secou à temperatura ambiente.

Registaram-se os espectros de massa obtidos num instrumento Bruker Reflex II (Bruker Daltonic, Bremen, Alemanha), tal como se descreveu em mais pormenor em [34].

Exemplo 2: Produção de quito-oligómeros (QO) utilizados para administração por via oral contra a artrite**Produção da amostra 1 (G0000823-IK):**

Dissolveram-se 25 kg de hidróxido de sódio em 25 kg de água, num misturador de 80 L, e aqueceu-se a 70°C.

Adicionou-se-lhe 2,5 kg de quitina de camarão (Primex ehf), e agitou-se (a 15 rpm) durante 20 minutos. Arrefeceu-se então a suspensão com água, filtrou-se através de um pano de coar coalhada de queijo (200 x 40 cm), e lavou-se durante 10 a 15 minutos. Voltou a colocar-se o gel de quitina no misturador, ajustou-se o pH a 4 pela adição de HCl a 30%, e água para perfazer um volume de 80 L. Adicionou-se-lhe 380 g (a 750 U/g) de uma solução de quitinase e agitou-se o gel durante 16 horas a 30°C. Desnaturou-se o enzima ajustando o pH a 7 e aquecendo a solução a 70°C durante 10 minutos. Depois de arrefecer, verteu-se a solução do oligómero através de um peneiro com poros de dimensão de malha de 280 μm . Submeteu-se a solução a uma secagem por atomização, utilizando uma unidade de atomizador rotativo com um ar cuja temperatura à entrada era de 190°C, e a temperatura do ar à saída era de 80°C. A velocidade do rotor do atomizador era de 20.000 rpm. Recolheu-se o quitosano em pó, com partículas de pequenas dimensões, 2,0 kg, mantendo-a à temperatura ambiente, e sendo referida como Amostra 1.

Análise da Amostra 1

Analisa-se o conteúdo em água e as cinzas da amostra de quito-oligómeros seca por atomização por atomização. O conteúdo em cinzas foi de 53,7% (em peso) e o de água de 5,4% (em peso). Os quito-oligómeros mais os monómeros perfaziam 40,9% (em peso). O grau de

desacetilação (DDA) era de 42,3%+/-0,1% (desvio padrão). Utilizando análises por Biogel GPC (Figura 1) e em seguida por MALDI-TOF (Tabela 1) demonstrou-se que o monómero era sobretudo *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc), com uma presença menos importante de *N*-glucosamina (GlcN). Os dímeros eram uma mistura de (GlcNAc)₂ com (GlcNAc)(GlcN). Nos trímeros incluía-se (GlcNAc)₂(GlcN) como produto principal e (GlcNAc)₃ como produto secundário. A sequência do principal produto trimérico foi determinada como sendo GlcN-GlcNAc-GlcNAc, ou D-A-A. As quantidades dos oligômeros mais longos (DP 4 a 20) que foram encontrados, eram menores, tal como avaliadas na análise por Biogel P4. Foi confirmada a existência de oligômeros de comprimento médio tanto por análise sobre Biogel P4 como por MS em MALDI-TOF.

Tabela 1. MALDI-TOF de picos obtidos por GPC sobre Biogel da Amostra 1, ilustrados na Figura 1. Cada um dos picos numerado foi recolhido e analisado por MS em MALDI-TOF. A tabela mostra o número da fracção e os oligómeros e homólogos de cada fracção

Produção da Amostra 2 (G010430-1 K) :

Produziu-se esta amostra utilizando um protocolo essencialmente igual ao descrito para a Amostra 1, excepto que depois da inactivação enzimática (pH ajustado a 8,0 com NaOH a 10%) e de se peneirar, clarificou-se a solução utilizando uma centrífuga contínua da Alfa-Laval (tipo: LAPX) a 9800 rpm. O caudal do fluido foi de 520 mL/minuto, e o rotor era esvaziado a cada 3-5 minutos. Descartou-se a pastilha e secou-se por atomização a solução límpida do oligómero, tal como no Exemplo 2. O rendimento de produto que se obteve foi de 1,74 kg de um pó.

Análise da Amostra 2

O conteúdo desta amostra em cinzas elevava-se a 48,3% (em peso) sendo o conteúdo em NaCl de 47,0 %. O conteúdo em água era de 5,0% (em peso). Os quito-oligómeros e monómeros eram, em conjunto, 46,7% (em peso). O grau de desacetilação (DDA) era de 38,7% +/-0,9%.

Nas Figuras 2 e 3 ilustram-se análises por MS em MALDI-TOF das Amostras 1 e 2. A Figura 2 indica a distribuição dos homólogos dos quito-oligómeros com DP 2 a DP 10. A distribuição dos homólogos apresenta algumas diferenças entre as duas amostras. Adicionando os diversos homólogos respeitantes a um mesmo DP é evidente que a distribuição de DP é semelhante para ambas as amostras, tal como se evidencia na Figura 3. É importante relembrar que

as intensidades dos sinais para os diversos oligómeros na análise por MALDI-TOF é de natureza qualitativa, e não quantitativa, e em especial que os picos dos oligómeros maiores podem aparecer com intensidades relativamente menores do que os picos relativos aos oligómeros menores.

**Exemplo 3: Administração dos quito-oligómeros
(QO) por via oral**

Foram administradas a sujeitos que sofriam de artrite doses diárias de 3,0 g (1 colher de chá, 5,0 mL, 1331 mg de QO) de Amostra 1, quito-oligómeros em pó, secos por atomização, dissolvido em água, ao longo de pelo menos 5 semanas e até dois anos. Dois destes pacientes interromperam a administração durante um período de 5-6 semanas, após a tomarem continuamente como suplemento, e depois começaram de novo, tomando 2,9 g de Amostra 2 (1 colher de chá; 5,0 mL, 1331 mg de QO).

Resultados da administração

Sujeito 1: Tratamento da artrite reumatóide

Um sujeito do sexo feminino, com 55 anos de idade, sofria de artrite reumatóide. As articulações de ambas as mãos apresentavam inchaços severos. Os dedos estavam rígidos e a sua movimentação provocava dor. A sujeita tomou diariamente 3 g do pó de quito-oligómeros. A sujeita sentiu uma melhoria significativa após 4 a 5

semanas. Houve um notável alívio dos sintomas, e a inflamação cessou, e tanto as articulações como os dedos voltaram a parecer normais. Houve um alívio da dor e a sujeita conseguia mover os dedos com mais facilidade, o que lhe tornou possível de novo fazer trabalho de precisão. por volta dos 2 meses ela parou a administração diária do pó de quito-oligómeros durante 5-6 semanas. A partir das 3 ou 4 semanas, os sintomas da artrite voltaram a pouco e pouco. Duas ou três semanas depois da interrupção, começou de novo a tomar diariamente 2,9 g da amostra 2 (1331 mg de QO), de que resultou reportar um alívio 4 a 5 semanas depois dão segundo início de administração. A sujeita já se mantém sob uma dose diária de Amostra 1 ou 2 ou de produções semelhantes de quito-oligómeros, sem inflamação nem dor, há cerca de 21 meses.

Sujeitos 2-4: Tratamento da artrite reumatóide

Os sujeitos sofriam de artrite reumatóide. Eles tomaram diariamente 3,0 g de quito-oligómeros da Amostra 2. Ao fim de um mês os sujeitos descreveram um alívio significativo dos sintomas de AR. A inflamação (articulações inchadas) tinha sido aliviada e as articulações estavam menos rígidas.

Sujeitos 5-14: Tratamento da osteoartrite

Administrhou-se diariamente a cada um de dez sujeitos que sofriam de osteoartrite 3,0 g da amostra 1,

2,9 g da amostra 2, ou produções de quito-oligómeros semelhantes. Passadas 2 a 4 semanas, 8 sujeitos descreveram resultados positivos, com redução da inflamação e da dor. Dois sujeitos não reportaram qualquer alívio dos sintomas.

Para todos os sujeitos testados, não foi registada qualquer diferença significativa dos sintomas entre as Amostras 1 e 2. As alterações na preparação da amostra, que foi diferente para as Amostra 1 e 2 (maior DDA, maior DP), não levaram a uma melhoria da actividade anti artrítica, tal como avaliada pelos sujeitos. Estão a decorrer mais ensaios.

Lisboa, 19 de Junho de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. A utilização de quito-oligómeros de *N*-acetilglucosamina (NAG) e de glucosamina, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de patologias seleccionadas de entre o conjunto contendo patologias das articulações incluindo a osteoartrite e a artrite reumatóide, as patologias inflamatórias, e outros estados de reumatismo, em que o comprimento da cadeia dos quito-oligómeros se encontre na gama de entre cerca de 2-50, e em que o grau de desacetilação esteja na gama de entre cerca de 0-70%.

2. A utilização da reivindicação 1, em que o grau de desacetilação dos quito-oligómeros esteja adentro da gama de cerca de 30-50%.

3. A utilização da reivindicação 1, em que pelo menos cerca de 10 %, em peso, dos quito-oligómeros, tenham um comprimento de cadeia de 2 a 12.

4. A utilização da reivindicação 1, em que cerca de 15 a 75%, em peso, dos quito-oligómeros, tenham um comprimento de cadeia de 2 a 12.

5. A utilização da reivindicação 1, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de uma

patologia das articulações seleccionada de entre um conjunto que inclua a osteoartrite e a artrite reumatóide.

6. A utilização da reivindicação 1, em que o tratamento alivie os sintomas da patologia das articulações no sujeito referido.

7. A utilização da reivindicação 1, em que o medicamento se destine a administração por via oral.

8. Uma composição farmacêutica para o tratamento de patologias seleccionadas de entre o conjunto que contém patologias das articulações incluindo a osteoartrite e a artrite reumatóide, patologias inflamatórias, outros estados reumáticos, a qual inclua quito-oligómeros de N-acetilglucosamina (NAG) e glucosamina, em que o comprimento de cadeia dos quito-oligómeros se encontra na gama de entre cerca de 2-50, e em que o grau de desacetilação se encontra na gama de cerca de 0-70%.

9. A composição farmacêutica da reivindicação 8, em que pelo menos cerca de 10 %, em peso, dos quito-oligómeros, tenham um comprimento de cadeia de entre 2 e 12.

10. A composição farmacêutica da reivindicação 8, em que cerca de 15 a 75 %, em peso, dos quito-oligómeros tenham um comprimento de cadeia de entre 2 e 12.

11. Uma composição farmacêutica para o tratamento anti-inflamatório e para o tratamento de patologias das articulações, que inclua quitina parcialmente desacetilada e solúvel em água, com um grau de desacetilação adentro da gama de cerca de 35 a cerca de 50%.

Lisboa, 19 de Junho de 2007

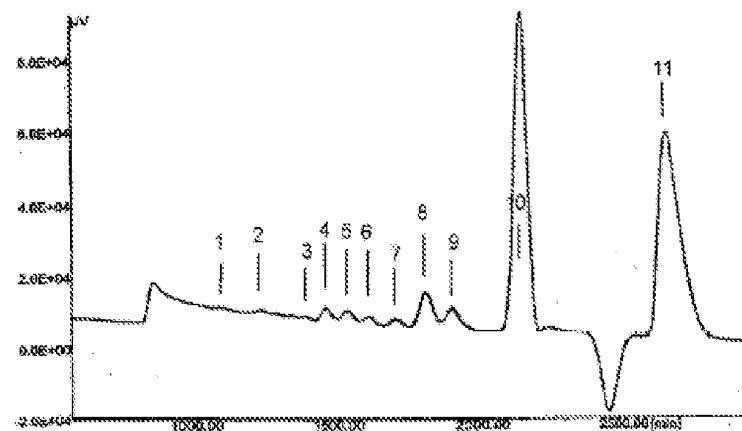


Figura 1

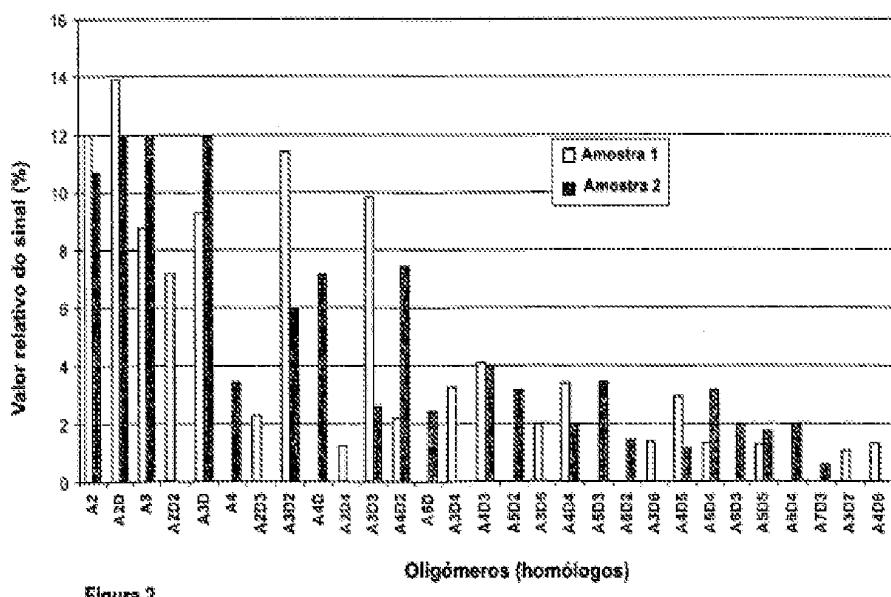


Figura 2

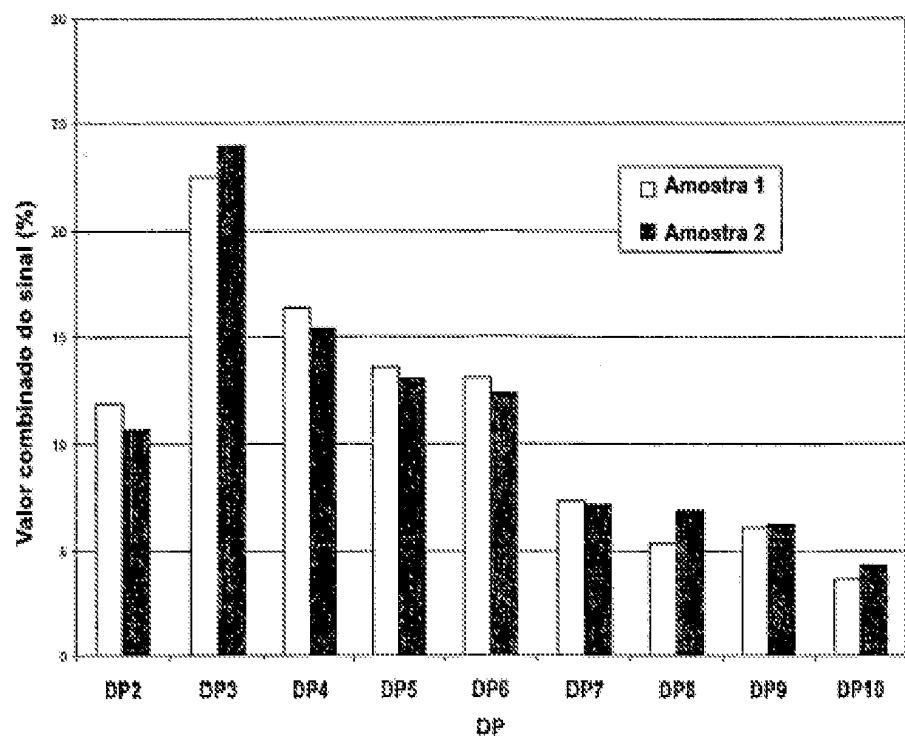


Figura 3