

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 429**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A23L 33/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2017 PCT/KR2017/010489**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2018 WO18135719**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2017 E 17892942 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3572087**

54 Título: **Composición para prevenir o tratar la osteoartritis que contiene sialilactosa o una sal de la misma como principio activo**

30 Prioridad:

23.01.2017 KR 20170010540

31.05.2017 KR 20170067915

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

31.10.2023

73 Titular/es:

**CUPIONE CO., LTD. (100.0%)
Room 102-9, 2F 427, Teheran-ro
Gangnam-gu, Seoul 06159, KR**

72 Inventor/es:

**YANG, SIYOUNG;
JEON, JIMIN;
KANG, LI-JUNG y
CHO, CHANMI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 952 429 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

Composición para prevenir o tratar la osteoartritis que contiene sialilactosa o una sal de la misma como principio activo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición para prevenir o tratar la osteoartritis que contiene 3'- o 6'-sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

10 **Antecedentes de la técnica**

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular degenerativa causada principalmente por la inhibición de la síntesis de la matriz extracelular (MEC) del cartílago y la promoción de la destrucción del tejido cartilaginoso. Muchos factores de riesgo etiológicos y procesos fisiopatológicos asociados al envejecimiento contribuyen a la progresión de la osteoartritis. La inestabilidad articular, el estrés mecánico, incluidas las lesiones, y los factores relacionados con el envejecimiento que predisponen a la osteoartritis son potenciales mecanismos causantes de la osteoartritis. Estos factores activan las vías bioquímicas en los condrocitos, que son un tipo celular único que sintetiza diferentes factores catabólicos y anabólicos, lo que conduce a la degradación de la MEC por la metaloproteinasa de matriz (Mmp) y al cese de la síntesis de la MEC a través de la desdiferenciación y la apoptosis de los condrocitos (Pelletier J.P. et al., *Arthritis Rheum.*, 44:1237-47, 2001). En concreto, el tejido cartilaginoso que constituye una articulación normalmente no se regenera *in vivo* una vez que está dañado. Si el tejido cartilaginoso en una articulación está dañado, el daño del tejido cartilaginoso impide las actividades diarias con dolor grave. Si el daño se vuelve crónico, provoca osteoartritis mortal que interfiere con la vida normal o las actividades profesionales.

Hasta ahora, no se han desarrollado agentes terapéuticos para la artritis. Generalmente, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se usan con el fin de aliviar la inflamación de las articulaciones. Sin embargo, puesto que los medicamentos a base de AINE están destinados principalmente a aliviar temporalmente la inflamación de las articulaciones, los medicamentos basados en AINE no proporcionan un tratamiento adecuado para la osteoartritis, que es una artritis no inflamatoria que requiere la mejora de la formación de cartílago y la inhibición de la destrucción del cartílago (Pritchard M.H. et al., *Annals of the Rheumatic Diseases*, 37:493-503, 1978). Dichos AINE son adecuados como agentes terapéuticos para la prevención de la inflamación en la artritis reumatoide, que es una artritis inflamatoria. Sin embargo, se señala que los AINE aceleran el daño del cartílago o tienen efectos adversos sobre el sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, riñón, hígado, etc.

Asimismo, un método de trasplante osteocondral autólogo que se desarrolló para la formación de cartílago implica extraer cartílago y hueso subcondral de una parte normal de un paciente y trasplantarlos a un orificio que se hace en el sitio del cartílago dañado mediante perforación, generando de este modo cartílago hialino. Aunque este método ha tenido éxito en algunos pacientes, no se puede aplicar universalmente porque el método se puede realizar solo para pacientes elegibles para trasplante autólogo con menos daño del cartílago (Peterson L. et al., *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suplemento: 17-24, 2003).

Por otro lado, entre los oligosacáridos de la leche materna, la 3'- o 6'-sialilactosa tiene propiedades antiinflamatorias que influyen en la actividad de la microflora intestinal, y existe un informe de que la 3'- o 6'-sialilactosa enriquece la microflora intestinal (Izquierdo-Useros N. et al., *PLoS Biol* 2012, 10). Puesto que la sialilactosa está presente en la leche materna, ya se han verificado los efectos secundarios de la ingestión de sialilactosa y, por tanto, se están estudiando diversas funciones de la misma. Se confirmó que la administración de sialilactosa a un paciente con artritis reumatoide tiene efectos terapéuticos sobre enfermedades autoinmunitarias causadas por cambios en IgG (documento US 5164374). Sin embargo, no ha habido informes sobre los efectos profilácticos y terapéuticos de la 3'- o 6'-sialilactosa en la osteoartritis.

Por consiguiente, los presentes inventores han realizado intensos esfuerzos para encontrar una nueva sustancia capaz de prevenir o tratar eficazmente la osteoartritis y, como resultado, han descubierto que la 3'- o 6'-sialilactosa puede promover la formación de cartílago e inhibir la destrucción del cartílago simultáneamente, completando de este modo la presente divulgación.

55 **Sumario de la invención**

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica y un alimento para prevenir o tratar la osteoartritis, incluyendo la composición farmacéutica y el alimento 3'- o 6'-sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

En el presente documento se desvela un método para tratar la osteoartritis, incluyendo el método administrar la composición que incluye 3'- o 6'-sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

65 En el presente documento, también se divulga el uso de la composición que incluye 3'- o 6'-sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo en el tratamiento de la osteoartritis.

Para lograr el objeto anterior, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar osteoartritis, incluyendo la composición farmacéutica 3'- o 6'-sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

5 Asimismo, la presente divulgación proporciona un alimento para prevenir o mejorar la osteoartritis, incluyendo el alimento 3'- o 6'-sialilactosa o una sal aceptable de la misma para su uso como principio activo en alimentos.

10 Asimismo, la presente divulgación proporciona un método para tratar la osteoartritis, incluyendo el método administrar la composición que incluye 3'- o 6'-sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

15 Asimismo, la presente divulgación proporciona el uso de la composición que incluye 3'- o 6'-sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo en el tratamiento de la osteoartritis.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra un mecanismo por el cual la osteoartritis es inducida por diferentes factores catabólicos y anabólicos.

20 La FIG. 2 ilustra las fórmulas estructurales químicas de (A) 3'-sialilactosa (3'-SL) y (B) 6'-sialilactosa (6'-SL).

La FIG. 3 ilustra que 3'-sialilactosa y 6'-sialilactosa no mostraron citotoxicidad contra los condrocitos cuando los condrocitos se trataron con (A) 3'-sialilactosa o (B) 6'-sialilactosa a diferentes concentraciones.

25 La FIG. 4 ilustra que la expresión de colágeno tipo II (Col2a1) aumentó por el tratamiento de los condrocitos con 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, o 250 μ M de 3'-sialilactosa (A y B), la expresión de Col2a1 que disminuyó por IL-1 β aumentó por el tratamiento con 3'-sialilactosa (C y D), y la actividad de Sox-9 que disminuyó por IL-1 β aumentó por el tratamiento con 3'-sialilactosa (E).

30 La FIG. 5 ilustra que la expresión de colágeno tipo II (Col2a1) aumentó por el tratamiento de los condrocitos con 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 250 μ M de 6'-sialilactosa (A), la expresión de Col2a1 que disminuyó por IL-1 β aumentó por el tratamiento con 6'-sialilactosa (B), y Sox-9, que es un factor de transcripción que regula la expresión de colágeno tipo II, disminuyó por IL-1 β , pero aumentó nuevamente por 6'-sialilactosa (C).

35 La FIG. 6 ilustra que la expresión de Mmp3 y Mmp13 que induce la destrucción de cartílago aumentó por IL-1 β en condrocitos (A y B), y la expresión de Mmp3 y Mmp13 que aumentó por IL-1 β disminuyó por 3'-sialilactosa (C y D).

La FIG. 7 ilustra que la expresión de Mmp3 y Mmp13 que induce la destrucción de cartílago aumentó por IL-1 β en condrocitos (A), y la expresión de Mmp3 y Mmp13 que aumentó por IL-1 β disminuyó por 6'-sialilactosa (B).

40 La FIG. 8 ilustra que la fosforilación de Erk que aumentó por IL-1 β en condrocitos fue inactivada por 3'-sialilactosa.

Descripción detallada de la invención y realizaciones deseadas

45 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento es la bien conocida y comúnmente empleada en la técnica.

50 La artritis se clasifica en gran medida en artritis no inflamatoria y artritis inflamatoria, y la artritis no inflamatoria puede estar representada por la osteoartritis (OA) y la artritis inflamatoria puede estar representada por la artritis reumatoide (Yusuf E. et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 70:60-67,2011; Berebaum F. et al., *Osteoarthritis Cartilage*, 21:16-21, 2013).

55 La osteoartritis también se denomina artritis degenerativa, y la etiología de la misma aún es incierta, pero se sabe que una diversidad de desencadenantes tales como herencia, traumatismo, obesidad, envejecimiento, anomalías metabólicas, etc. están involucrados. Estos desencadenantes conducen a un desequilibrio entre los factores de ataque y los factores defensivos en los condrocitos, que promueve la destrucción del tejido cartilaginoso y el desgaste del cartílago y, como resultado, los pacientes sienten dolor y experimentan limitación en el movimiento de la articulación debido a los cambios patológicos característicos de la osteoartritis (Pelletier J.P. et al., *Arthritis Rheum.*, 44:1237-47, 2001).

60 Por el contrario, se sabe que la artritis reumatoide (AR) es causada principalmente por la progresión de la enfermedad debido a una reacción autoinmunitaria, a diferencia de la osteoartritis causada por la destrucción de condrocitos y tejido cartilaginoso. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por inflamación y proliferación de sinoviocitos, y desarrolla osteoporosis periarticular y erosión ósea, a diferencia de la osteoartritis. La artritis reumatoide progresa propagando la inflamación de la membrana sinovial a la cápsula articular, ligamento,

tendón, e invadiendo el hueso. Por lo tanto, la osteoartritis y la artritis reumatoide son completamente diferentes entre sí en cuanto a etiología y progresión, y los métodos de tratamiento de las mismas también son diferentes.

Los agentes terapéuticos para la artritis reumatoide conocidos hasta ahora incluyen medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), penicilamina, hormonas esteroideas, inhibidores de TNF, inhibidores de interleucina, inhibidores de JAK, inhibidores relacionados con anti-CD, etc., que son adecuados para bloquear el mecanismo de inflamación (Pritchard M.H. et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 37:493-503, 1978; Informe de Frost & Sullivan 2014: Product and pipeline analysis of the global rheumatoid arthritis therapeutics market). Los AINE y las hormonas esteroideas se usan en pacientes con osteoartritis con el fin de aliviar el dolor y combatir la inflamación, pero estos medicamentos pueden no funcionar como agentes terapéuticos prácticos para la osteoartritis debido a que tienen como objetivo aliviar los síntomas en lugar de tratar la enfermedad en sí (Abramson S.B. et al., *Osteoarthritis Cartilage*, 7:380-1, 1999). Además, puesto que la osteoartritis, que es causada principalmente por la destrucción de condrocitos y tejido cartilaginoso, es bastante diferente de la artritis reumatoide, que es una artritis inflamatoria, en cuanto a la causa y los síntomas, un método para tratar la osteoartritis también es diferente del de la artritis reumatoide.

Por ejemplo, hasta 2014, el desarrollo de la mayoría de los agentes terapéuticos para la osteoartritis avanzó en una dirección en la que la regeneración del cartílago se promovía mediante el trasplante de diferentes andamios con células madre mesenquimatosas promovidas por la secreción de Col2a1 y MEC en los defectos del cartílago. Por el contrario, el desarrollo de agentes terapéuticos para la artritis reumatoide avanza en una dirección en la que en última instancia las citocinas inflamatorias se inhiben mediante el desarrollo de inhibidores de TNF, inhibidores de interleucina, inhibidores de JAK, inhibidores relacionados con anti-CD, etc. (Informe de Frost & Sullivan de 2014: 1. A product and pipeline analysis of the Global knee cartilage repair market, 2. Product and pipeline analysis of the global rheumatoid arthritis therapeutics market). Es decir, se puede observar que las dianas terapéuticas de la osteoartritis que tiene una característica no inflamatoria y la artritis reumatoide que tiene una característica inflamatoria adoptan diferentes formas de acuerdo con los diferentes tipos de artritis.

Basándose en estos resultados, se puede ver que la osteoartritis y la artritis reumatoide tienen causas de enfermedad completamente diferentes, y los agentes terapéuticos que están actualmente en desarrollo se centran en la regeneración del cartílago para la osteoartritis y la inhibición de la inflamación para la artritis reumatoide. Por consiguiente, la estrategia objetivo para el tratamiento de la osteoartritis debe ser diferente de la estrategia objetivo para el tratamiento de la artritis reumatoide inflamatoria.

Es más, el documento WO 98/48817 divulga determinados métodos y composiciones para inhibir la proliferación de células endoteliales poniendo en contacto las células con un ácido siálico o un glucósido de sialilo. Estos métodos son útiles para tratar afecciones que se caracterizan por una proliferación celular indeseable.

Como se usa en el presente documento, los términos "osteoartritis (OA)" y "artritis degenerativa" pueden usarse indistintamente entre sí, y debe entenderse que tienen los mismos significados.

En la presente divulgación, se confirmó que 3'- o 6'-sialilactosa promueve la expresión de colágeno tipo II (Col2a1) que juega un papel importante en la formación de articulaciones e inhibe la expresión de Mmp3 y Mmp13 que promueven la destrucción del tejido cartilaginoso al mismo tiempo, mientras que no tiene citotoxicidad sobre los condrocitos. También se confirmó que la 3'- o 6'-sialilactosa está directamente implicada en la regulación de Sox9, que es un factor de transcripción implicado en la expresión de Col2a1, y la 3'-sialilactosa regula directamente la vía de transducción de señales de pErk implicada en la expresión de Mmp3 y Mmp13.

Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar la osteoartritis, incluyendo la composición farmacéutica sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

En la presente divulgación, la sialilactosa puede ser 3'-sialilactosa o 6'-sialilactosa.

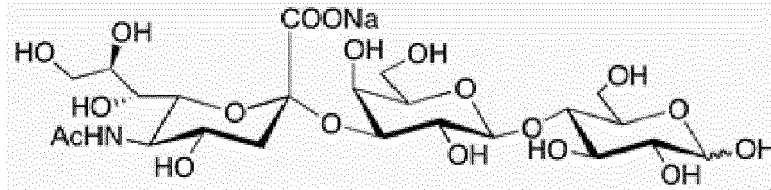
Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una formulación de un compuesto que no provoca irritación significativa a un organismo al que se administra el compuesto y no abroga la actividad biológica y las propiedades del compuesto. Las sales farmacéuticas pueden incluir sales de adición de ácido que pueden formar sales de adición de ácido no tóxicas que contienen aniones farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, etc.; ácidos carbónicos orgánicos, tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido salicílico, etc.; ácidos sulfónicos, tales como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, etc. Por ejemplo, la sal farmacéuticamente aceptable también puede incluir sales de metal o sales de metal alcalinotérreo formadas por litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, etc.; sales de aminoácidos, tales como lisina, arginina, guanidina, etc.; sales orgánicas, tales como dicitohexilamina, N-metil-D-glucamina, tris(hidroximetil)metilamina, dietanolamina, colina, trietilamina, etc.

En la presente divulgación, la sal farmacéuticamente aceptable de 3'- o 6'-sialilactosa puede ser Na, pero no de

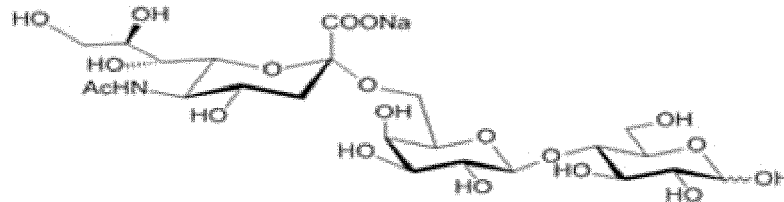
manera limitativa.

La sal de 3'-sialillactosa puede tener una estructura de la siguiente Fórmula 1, y la sal de 6'-sialillactosa puede tener una estructura de la siguiente Fórmula 2, pero no de manera limitativa:

5 [Fórmula 1]



10 [Fórmula 2]



15 Un compuesto único de prueba usado en la presente divulgación es 3'- o 6'-sialillactosa que tiene una fórmula estructural de $C_{23}H_{38}NO_{19}Na$, que es un compuesto único derivado de una fuente natural abundante en la leche materna (FIG. 2).

En la presente divulgación, pero no incluida en la presente invención, la 3'- o 6'-sialillactosa puede incluir un derivado de la misma.

20 Como se usa en el presente documento, el término "derivado" se refiere a un compuesto que se modifica por introducción, sustitución, oxidación, reducción, etc. de grupos funcionales de 3'- o 6'-sialillactosa sin cambios significativos en la estructura y las propiedades de un compuesto original. No hay limitación en un tipo de los grupos funcionales y, por ejemplo, los grupos funcionales pueden incluir cada uno independientemente grupos hidrocarbonados bicíclicos C1 a C20 sustituidos o no sustituidos con un grupo hidroxilo, un grupo fenoxi, un grupo tienilo, un grupo furilo, un grupo piridilo, un grupo ciclohexilo, un grupo de alcohol alquílico, un grupo dialcohol alquílico o un grupo fenilo sustituido o no sustituido; grupos hidrocarbonados cíclicos C3 a C30 sustituidos o no sustituidos con un grupo hidroxilo, un grupo hidroximetilo, un grupo metilo o un grupo amino; restos azúcares, pero no de forma limitativa.

30 Como se usa en el presente documento, el término "resto azúcares" se refiere a un grupo disponible en la eliminación de un átomo de hidrógeno de una molécula de polisacárido y, por lo tanto, el resto azúcares puede ser, por ejemplo, un resto derivado de un monosacárido o un oligosacárido.

35 Como se usa en el presente documento, el término "sustituido" significa, a menos que se especifique de otra manera, que al menos un átomo de hidrógeno entre los grupos funcionales está sustituido con un átomo de halógeno (F, Cl, Br o I), un grupo hidroxilo, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo imino ($=NH$, $=NR$, en donde R es un grupo alquilo C1 a C10), un grupo amino ($-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R'')(R''')$, en donde R', R'', R''' son cada uno independientemente un grupo alquilo C1 a C10), un grupo amidino, un grupo hidrazina, un grupo hidrazona, un grupo carboxilo, un grupo alquilo C1 a C20, un grupo arilo C6 a C30, un grupo cicloalquilo C3 a C30, un grupo heteroarilo C3 a C30, o un grupo heterocicloalquilo C2 a C30.

En la presente divulgación, un intervalo de pH en el que la 3'- o 6'-sialillactosa o el derivado de 3'- o 6'-sialillactosa muestra estabilidad puede ser de pH 4 a pH 10, pero no de manera limitativa.

45 En la presente divulgación, la composición farmacéutica para prevenir o tratar la osteoartritis que incluye 3'- o 6'-sialillactosa como principio activo puede tener una o más de las siguientes propiedades:

- 50
- 1) aumento de la expresión de colágeno tipo II (Col2a1);
 - 2) disminución de la expresión de metaloproteinas de matriz 3 (Mmp3) o metaloproteinas de matriz 13 (Mmp13);

3) aumento de la actividad de Sox-9; y

4) aumento de la inactivación de p-ERK.

5 En la presente divulgación, la composición farmacéutica puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente. El "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que se puede agregar al principio activo para ayudar a la preparación o estabilización de una formulación sin causar un efecto toxicológico adverso significativo en un paciente.

10 El vehículo se refiere a un vehículo o diluyente que no causa irritación a un paciente y no abroga la actividad biológica y las propiedades de la 3'- o 6'-sialilactosa de la presente divulgación. Cuando la composición se formula en una solución líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una mezcla de uno o más de solución salina, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, una solución inyectable de albúmina, una solución de dextrosa, una solución de maltodextrina, glicerol y etanol, que son estériles y biocompatibles. Si fuese necesario, se le puede agregar otros aditivos comunes, que incluyen un antioxidante, un tampón, un agente bacteriostático, etc. 15 Asimismo, se le puede agregar adicionalmente un diluyente, un dispersante, un tensioactivo, un aglutinante y un lubricante para preparar la composición como una formulación para inyección, tal como una solución acuosa, una suspensión y una emulsión, o como una píldora, una cápsula, un gránulo o un comprimido. Se describen otros vehículos, por ejemplo, en una literatura [Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin)].

20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. La composición puede formularse para inyección parenteral. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o 25 un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, etc.), y mezclas adecuadas de los mismos. En algunos casos, la composición puede incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando una cantidad requerida de 3'- o 6'-sialilactosa en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes descritos anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un 30 vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los descritos anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y el secado en frío (liofilización) que producen un polvo del principio activo y cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente sometida a esterilización por 35 filtración.

40 Asimismo, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación puede administrarse por vía oral o parenteral en una dosis y frecuencia de administración que pueden variar dependiendo de la gravedad del dolor del que padece el paciente. La composición se puede administrar a un paciente en forma de bolo o continua, según sea necesario.

45 La composición que incluye sialilactosa de la presente divulgación puede inhibir la destrucción de cartílago debido al envejecimiento de la articulación y puede promover la formación de cartílago, tratando de este modo la osteoartritis.

50 Los métodos de tratamiento de la osteoartritis conocidos hasta ahora pueden incluir artroplastia de reemplazo, artroplastia, trasplante de articulación e implantación de condrocitos autólogos. Sin embargo, puesto que la artroplastia de reemplazo requiere una incisión en la articulación, impone dolor y carga a un paciente, y el procedimiento es complicado y difícil. Además, la artroplastia de reemplazo se realiza solo para pacientes elegibles para trasplante autólogo y, por tanto, existen muchas restricciones en el tratamiento (Peterson L. et al., *J. Bone Joint Surg. Am.*, 85:17-24, 2003). El implante de condrocitos autólogos es un método para obtener condrocitos a partir de un tejido cartilaginoso extraído de un sitio normal de un paciente, cultivar y proliferar el número deseado de condrocitos *ex-vivo*, y, a continuación, introducir los condrocitos en un sitio de cartílago dañado. Sin embargo, este procedimiento también es complicado y difícil, debido a que los tejidos donantes son limitados, y se requiere una cirugía para la extracción de un tejido para la implantación (Yoon et al., *Journal of Rheumatic Diseases*, 19, 2012). Además, existe un método para 55 obtener células madre mesenquimales a partir de un tejido tal como médula ósea autóloga, músculo, grasa, etc., diferenciando las células *ex-vivo*, y, a continuación, inyectando las células en un sitio dañado del cartílago. Sin embargo, existe el riesgo de que las células madre mesenquimales se diferencien en condrocitos hipertróficos cuando se usa TGF- β para inducir la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos, y las células madre mesenquimales se pueden diferenciar en osteofitos cuando se usa BMP para inducir la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos (1. Park et al., *J. of Korean Orthopaedic Research Society*, 18:2, 2015; Mamidi M.K. et al., *Osteoarthritis Cartilage*, 24:1307-16, 2016). Sustancialmente, la mayoría de los medicamentos o alimentos naturales para la osteoartritis que se han desarrollado hasta ahora tienden a centrarse en el alivio del dolor y los efectos antiinflamatorios en lugar de centrarse en la activación de los condrocitos y la regeneración del cartílago, que 60 son fundamentales para el tratamiento de la osteoartritis.

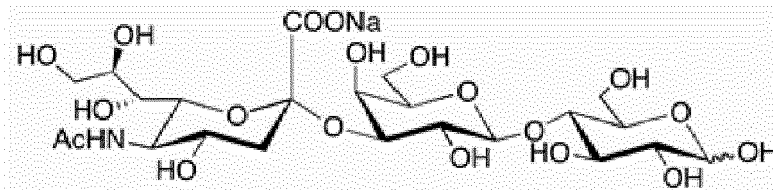
Por lo tanto, se espera que la 3'- o 6'-sialilactosa, que es uno de los componentes de la leche materna que no tiene efectos adversos en el cuerpo humano, se use como materia prima que pueda prevenir, tratar o mejorar la osteoartritis y pueda resolver los problemas de los medicamentos terapéuticos conocidos o los alimentos naturales para la osteoartritis, incluyendo los efectos secundarios, la reducción de los efectos de regeneración del cartílago y la seguridad.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para tratar la osteoartritis, incluyendo el método administrar la composición que incluye sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

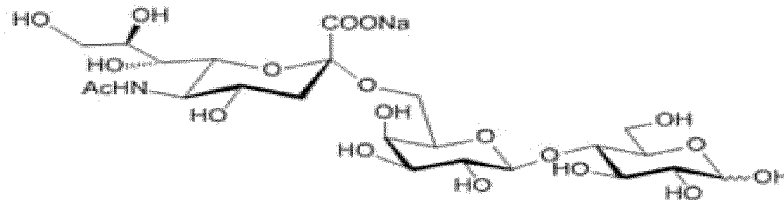
Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere al uso de la composición que incluye sialilactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo en el tratamiento de la osteoartritis.

En la presente divulgación, la sialilactosa puede ser 3'-sialilactosa o 6'-sialilactosa y, más preferentemente, la sal de 3'-sialilactosa puede tener una estructura de la siguiente Fórmula 1, y la sal de 6'-sialilactosa puede tener una estructura de la siguiente Fórmula 2, pero no de manera limitativa:

[Fórmula 1]



[Fórmula 2]



Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a un alimento para prevenir o mejorar la osteoartritis, incluyendo el alimento sialilactosa o una sal de la misma aceptable para su uso como principio activo en el alimento.

En la presente divulgación, la sialilactosa puede ser 3'-sialilactosa o 6'-sialilactosa.

En la presente divulgación, la sal de 3'-sialilactosa aceptable para uso alimentario puede tener la estructura de Fórmula 1, y la sal de 6'-sialilactosa aceptable para uso alimentario puede tener la estructura de Fórmula 2, pero no de forma limitativa.

En la presente divulgación, la sal de 3'- o 6'-sialilactosa aceptable para uso alimentario puede ser Na, pero no de manera limitativa.

En la presente divulgación, pero no incluido en la presente invención, la 3'- o 6'-sialilactosa puede incluir un derivado de la misma.

El alimento de la presente divulgación se puede preparar en cualquier forma de un alimento funcional, un suplemento nutricional, un alimento saludable y un aditivo alimentario. Por ejemplo, como alimento saludable, la 3'-sialilactosa de la presente divulgación puede beberse después de haber sido preparada en forma de té, zumos y bebidas, o puede tomarse después de granulación, encapsulación y pulverización. Asimismo, el alimento funcional se puede preparar agregando 3'-sialilactosa de la presente divulgación a bebidas (incluidas las bebidas alcohólicas), frutas y sus alimentos procesados (por ejemplo, frutas en conserva, alimentos embotellados, confitura, mermelada, etc.), pescado, carne y sus alimentos procesados (por ejemplo, jamón, embutido, carne curada, etc.), panes y pastas (por ejemplo, fideos Udon, pasta de trigo sarraceno, fideos de ramen, espaguetis, macarrones, etc.), zumos de frutas, diferentes bebidas, galletas, caramelo masticable, productos lácteos (por ejemplo, mantequilla, queso, etc.), aceites vegetales

comestibles, margarina, proteínas vegetales, alimentos embolsados, alimentos congelados, diferentes condimentos (por ejemplo, pasta de soja, salsa de soja, salsa, etc.), etc.

Asimismo, el alimento funcional natural incluye diferentes formas, tales como alimento funcional, suplementos nutricionales, alimentos naturales y aditivos alimentarios, como composición del alimento, y se puede proporcionar en varias formas de acuerdo con un método general conocido en la técnica, por ejemplo, preparando la 3'- o 6'-sialilactosa en forma de té, zumo, o bebida, o por granulación, encapsulación o pulverización de la 3'- o 6'-sialilactosa, o adición del compuesto o el extracto a diversos alimentos, que incluyen bebidas, frutas y sus alimentos procesados, pescado, carne y sus alimentos procesados, panes, pasta, condimentos, etc.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a las realizaciones. Sin embargo, es evidente para los expertos en la materia que estas realizaciones son para una explicación más detallada, y no se pretende que el alcance de la presente divulgación esté limitado por estas realizaciones.

Ejemplo 1: Medición de la citotoxicidad de la sialilactosa en condrocitos

Se obtuvieron condrocitos de tejidos cartilaginosos derivados de cabezas femorales, cóndilos femorales y mesetas tibiales de ratón normal a los 5 días después del nacimiento. Los condrocitos obtenidos se cultivaron en medio DMEM (Gibco, EE. UU.) que contenía suero bovino fetal al 10 % (v/v) (Gibco, EE. UU.), 50 µg/ml de estreptomycin (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y 50 unidades/ml de penicilina (Sigma-Aldrich, EE. UU.).

Para confirmar que la 3'- o 6'-sialilactosa no tiene citotoxicidad sobre los condrocitos, se cultivaron condrocitos en una placa de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 9×10^3 células/pocillo y, a continuación, se trató con 3'- o 6'-sialilactosa (Genechem Inc., Daejeon, Corea) a una concentración de 0 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM o 250 µM, seguido de incubación en una incubadora de CO₂ al 5 % a 37 °C durante 24 h. La citotoxicidad de 3'- o 6'-sialilactosa sobre condrocitos se confirmó midiendo la absorbancia a 450 nm usando un kit de ensayo de viabilidad celular EZ-Cytox (DoGen, Corea).

Como resultado, la 3'-sialilactosa y la 6'-sialilactosa no mostraron citotoxicidad sobre los condrocitos a ninguna concentración, lo que sugiere que no afectan negativamente a la proliferación de condrocitos (FIG. 3).

Ejemplo 2: Examen de los efectos de la sialilactosa en la formación y regeneración del cartílago

2-1: Aumento de la expresión de colágeno tipo II (Col2a1)

Para examinar los efectos de la 3'- o 6'-sialilactosa sobre la formación y regeneración del cartílago, los condrocitos obtenidos en el Ejemplo 1 se incubaron durante 36 h y, a continuación, se trataron con 3'- o 6'-sialilactosa a una concentración de 0 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM o 250 µM, seguido de una incubación adicional durante 36 h.

A continuación, para realizar qRT-PCR, se extrajo ARN de los condrocitos usando un reactivo TRI (Molecular Research Center Inc.), y el ADNc obtenido por transcripción inversa del ARN se amplificó por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 1 y 2 en condiciones de temperatura de alineamiento de 55 °C para examinar la expresión de colágeno tipo II (Col2a1, 173 pb) que es esencial para la formación de cartílago. Como grupo control, se examinó Gapdh (450 pb, temperatura de alineamiento de 58 °C) usando cebadores de SEQ ID NO: 3 y 4.

SEQ ID NO: 1: 5'-CACACTGGTAAGTGGGGCAAGA-3' (Col2a1-S)

SEQ ID NO: 2: 5'-GGATTGTGTTGTTTCAGGGTTCG-3' (Col2a1-AS)

SEQ ID NO: 3: 5'-TCACTGCCACCCAGAAGAC-3' (Gapdh-S)

SEQ ID NO: 4: 5'-TGTAGGCCATGAGGTCCAC-3' (Gapdh-AS)

Asimismo, se extrajo un lisado celular completo de los condrocitos usando un tampón de lisis (NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, Tris 50 mM, NaF 5 mM) que contenía cócteles inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche), y se examinó la expresión de Col2a1 en las células. Se realizó transferencia Western usando anticuerpo anti-Col2a1 (Millipore) y anticuerpo anti-Erk (señalización celular), y el grosor y la concentración de las bandas de la transferencia Western se midieron mediante un programa informático y sus valores relativos se determinaron por densitometría (FIG. 4A y 4B).

Como resultado, se confirmó que la expresión de Col2a1 en los condrocitos aumentó por 3'-sialilactosa o 6'-sialilactosa, lo que indica que la 3'-sialilactosa y la 6'-sialilactosa tienen el efecto de promover la formación de cartílago (FIG. 4A y 4B y FIG. 5A).

2-2: Aumento de la expresión de colágeno tipo II (Col2a1) suprimida por IL-1 β

IL-1 β es una citocina inflamatoria representativa que inhibe la expresión de Col2a1 en condrocitos. Se incubaron condrocitos durante 36 h y, a continuación, se trataron con 5 ng/ml de IL-1 β (GeneScript, EE. UU.) durante 24 h para confirmar que la expresión de Col2a1 se redujo por IL-1 β .

Para examinar si la disminución de la expresión de Col2a1 aumenta nuevamente en los condrocitos por 3'- o 6'-sialillactosa, se realizaron qRT-PCR y transferencia Western de la misma manera que en el Ejemplo 2-1.

Como resultado, se confirmó que la expresión de Col2a1 suprimida por IL-1 β en condrocitos aumentó gradualmente por 3'- o 6'-sialillactosa (FIG. 4C y 4D y FIG. 5B), lo que indica que la formación y la regeneración de cartílago puede ser promovida por 3'-sialillactosa o 6'-sialillactosa.

Ejemplo 3: Activación de las vías de señalización de la formación y regeneración de cartílago por sialillactosa

La expresión de Col2a1 esencial para la formación y regeneración del cartílago está regulada por un factor de transcripción Sox-9 y, por lo tanto, se examinó si el factor de transcripción Sox-9 está regulado por 3'-sialillactosa.

Se preparó un gen indicador de Sox-9 insertando el sitio de unión de Sox9 de 48 pb en el primer intrón del gen Col2a1 humano en dirección 5' del promotor de SV40 en el vector pGL3 (Zhou G. et al., *J. Biol. Chem.* 1998, 12-14989 (97).

Se sometió a transfección 1 μ g del gen indicador de Sox-9 en condrocitos usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) durante 3 h. Las células transfectadas se trataron conjuntamente con 5 ng/ml de interleucina 1 beta (IL-1 β) y 0 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 250 μ M de 3'- o 6'-sialillactosa durante 24 h y, a continuación, se recuperaron los condrocitos para examinar la actividad de Sox-9 por actividad de luciferasa.

Como resultado, se confirmó que la actividad de Sox-9 disminuida por IL-1 β fue restaurada por 3'- o 6'-sialillactosa (FIG. 4E y FIG. 5C), lo que indica que 3'- o 6'-sialillactosa regula directamente la actividad de Sox-9, conduciendo a la regulación de la expresión de Col2a1 esencial para la formación de cartílago. En otras palabras, la formación y regeneración del cartílago son promovidas por 3'-sialillactosa o 6'-sialillactosa.

Ejemplo 4: Examen de la inhibición de la inflamación articular y la destrucción del cartílago por sialillactosa

IL-1 β es una citocina inflamatoria representativa que disminuye Col2a1 esencial para la formación de cartílago en los condrocitos y también promueve la inflamación articular y la destrucción del tejido cartilaginoso. Se trataron condrocitos con 5 ng/ml de IL-1 β por vez y, a continuación, se realizó qRT-PCR usando las condiciones y los cebadores de la siguiente Tabla 1 de acuerdo con el método del Ejemplo 2-1 para examinar la inhibición de la expresión de Mmp3 y Mmp13.

[Tabla 1]

SEQ ID NO.	Secuencia (5'-3')	Sentido/antisentido	Gen	Tamaño (pb)	Temperatura de alineamiento (AT, °C)
5	TCCTGATGTTGGTGGCTTCAG	S	Mmp3	102	58
6	TGTCTTGGCAAATCCGGTGTA	AS			
7	TGATGGACCTTCTGGTCTTCTGG	S	Mmp13	473	55
8	CATCCACATGGTTGGGAAGTTCT	AS			

Se permitió que proteínas secretoras como Mmp3 y Mmp13 reaccionaran a 0 °C durante 20 min después de hacer reaccionar 900 μ l de medio sin suero (medio acondicionado) con 100 μ l de ácido tricloroacético (TCA). A continuación, se descartó un sobrenadante mediante centrifugación a 12.000 rpm y 4 °C durante 10 min y, a continuación, se hizo reaccionar con 500 μ l de acetona fría al 100 % a 20 °C durante 1 h. La muestra que reaccionó con acetona al 100 % se centrifugó para descartar un sobrenadante y finalmente se precipitaron y detectaron las proteínas. Se realizó transferencia Western usando anticuerpo anti-Mmp3 (Abeam) y anticuerpo anti-Mmp13 (Abcam), y el grosor y la concentración de las bandas de transferencia Western se midieron mediante un programa informático y sus valores relativos se determinaron por densitometría.

Como resultado, se confirmó que la expresión de Mmp3 y Mmp13 que induce la destrucción de tejido cartilaginoso que causa inflamación articular aumentó en condrocitos por IL-1 β (FIG. 6A, 6B y 7A).

5 Por consiguiente, los condrocitos se trataron con 5 ng/ml de IL-1 β y 0 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 250 μ M de 3'- o 6'-sialilactosa durante 24 horas para examinar los niveles de expresión de Mmp3 y Mmp13. Se realizó qRT-PCR usando las condiciones y los cebadores de la Tabla 1, y se realizó transferencia Western para confirmar que la expresión de Mmp3 y Mmp13 aumentada por IL-1 β en condrocitos disminuyó por 3'- o 6'-sialilactosa de una manera dependiente de la concentración (FIG. 6C, 6D y 7B), lo que indica que la inflamación articular y la destrucción del tejido cartilaginoso pueden aliviarse e inhibirse con 3'-sialilactosa o 6'-sialilactosa.

10 Ejemplo 5: Inhibición de la vía de transducción de señales de destrucción de cartílago por sialilactosa

Mmp3 y Mmp13, que son factores que destruyen el cartílago y aumentan con la IL-1 β , se activan a través de diversas vías de transducción de señales en los condrocitos. Por consiguiente, se examinó si la 3'-sialilactosa es capaz de bloquear diversas vías de transducción de señales que están reguladas por IL-1 β .

15 Los condrocitos de la articulación de la rodilla del ratón se trataron con 5 ng/ml de IL-1 β durante 10 minutos para examinar la activación de la cinasa regulada por señales extracelulares (Erk) a través de la fosforilación de Erk.

20 Los condrocitos se trataron conjuntamente con 5 ng/ml de IL-1 β y 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M o 250 μ M de 3'-sialilactosa, y se confirmó que la fosforilación de Erk aumentada por IL-1 β disminuía por 3'-sialilactosa (FIG. 8). Es decir, la transferencia Western y la densitometría mostraron que entre las vías de transducción de señales capaces de activar Mmp3 y Mmp13 por IL-1 β , la vía de transducción de señales de Erk puede ser inhibida por 3'-sialilactosa, inhibiendo de este modo Mmp3 y Mmp13.

25 En general, la activación o promoción de Erk también se encuentra en tejidos de pacientes con osteoartritis (Yang et al., *Nat. Med.*, 2010), lo que sugiere que la 3'-sialilactosa puede inhibir fuertemente la vía de señalización de destrucción del cartílago que está más involucrada en los pacientes con osteoartritis.

Análisis estadístico

30 Todos los resultados de los ejemplos de la presente divulgación se analizaron mediante el método estadístico no paramétrico usando datos basados en sistemas de clasificación ordinal, tales como las puntuaciones de Mankin. Los datos de qRT-PCR presentados como el fold change se probaron inicialmente para la conformación a una distribución normal usando la prueba de Shapiro-Wilk, a continuación, se analizó mediante la prueba t de Student y el análisis de varianza (ANOVA) con pruebas post hoc cada una para comparaciones por pares y comparaciones múltiples según corresponda. Se aceptó la significancia al nivel de probabilidad de 0,05 ($P < 0,05$).

Aplicabilidad industrial

40 La 3'- o 6'-sialilactosa de la presente divulgación puede promover la formación de cartílago y puede inhibir eficazmente la destrucción del cartílago al mismo tiempo y, por lo tanto, puede ser útil como composición para prevenir o tratar la osteoartritis.

Texto independiente del listado de secuencias

45 Se adjuntó el archivo electrónico.

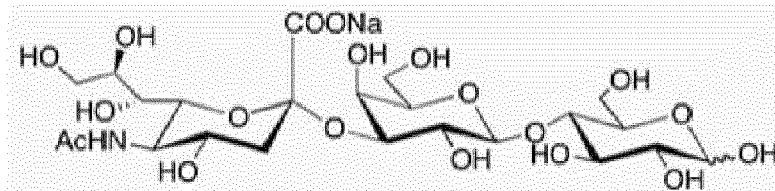
REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis que comprende 3'-sialillactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como ingrediente activo.

5 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal de 3'-sialillactosa tiene una estructura de la siguiente Fórmula 1:

[Fórmula 1]

10



3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición tiene una o más de las siguientes características:

15

- 1) aumento de la expresión de colágeno tipo II (Col2a1);
- 2) disminución de la expresión de metaloproteinasa de matriz 3 (Mmp3) o metaloproteinasa de matriz 13 (Mmp13);
- 3) aumento de la actividad de Sox-9; y
- 4) aumento de la inactivación de p-ERK.

20

4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente.

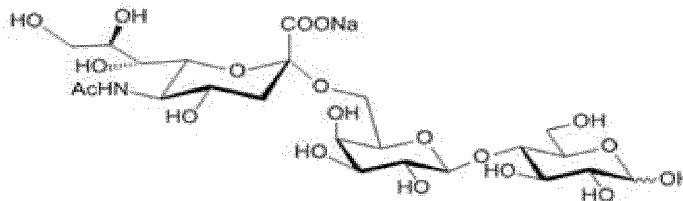
5. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la osteoartritis sin angiogénesis en un cartílago que comprende 6'-sialillactosa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

25

6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la sal de 6'-sialillactosa tiene una estructura de la siguiente Fórmula 2:

30

[Fórmula 2]



7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición tiene una o más de las siguientes características:

35

- 1) aumento de la expresión de colágeno tipo II (Col2a1);
- 2) disminución de la expresión de metaloproteinasa de matriz 3 (Mmp3) o metaloproteinasa de matriz 13 (Mmp13); y
- 3) aumento de la actividad de Sox-9.

40

8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente.

9. Un producto alimenticio que comprende 3'-sialillactosa o una sal aceptable de la misma para alimentos como principio activo y/o 6'-sialillactosa o una sal aceptable de la misma para alimentos como principio activo, como se muestra en la Fórmula 1 o 2, respectivamente, para su uso en la prevención o mejora de la osteoartritis.

45

FIG. 1

Mecanismo molecular de la osteoartritis

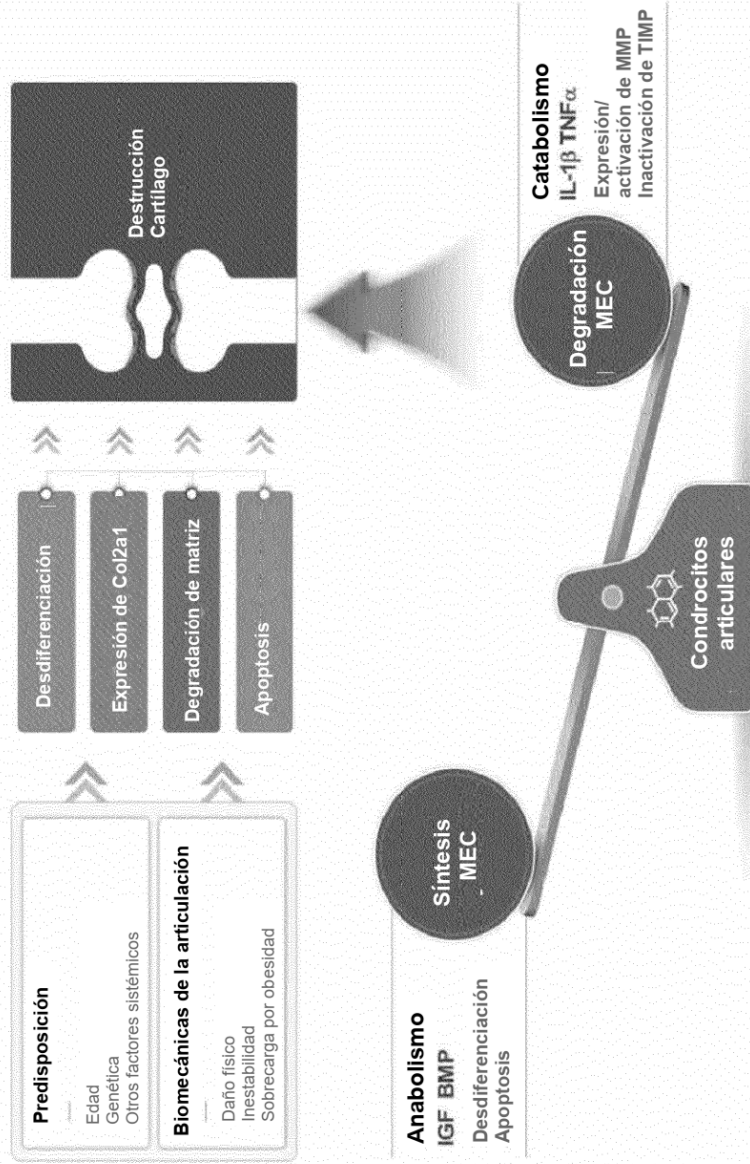


FIG. 2A

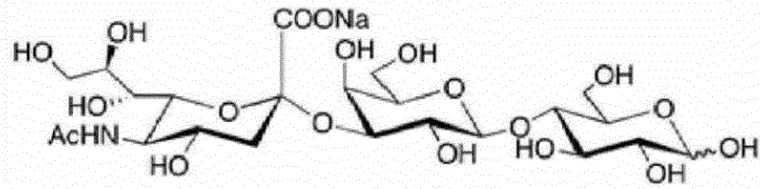


FIG. 2B

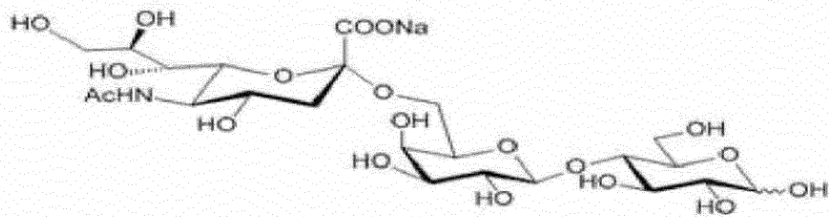


FIG. 3A

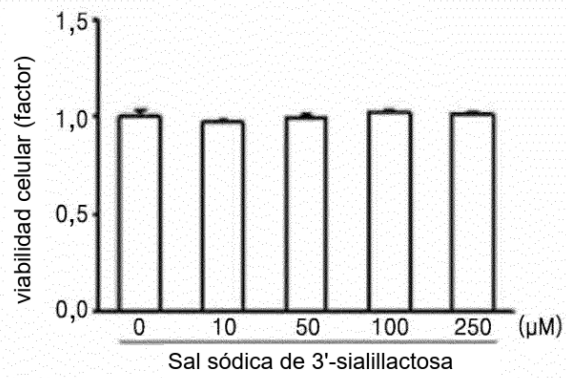


FIG. 3B

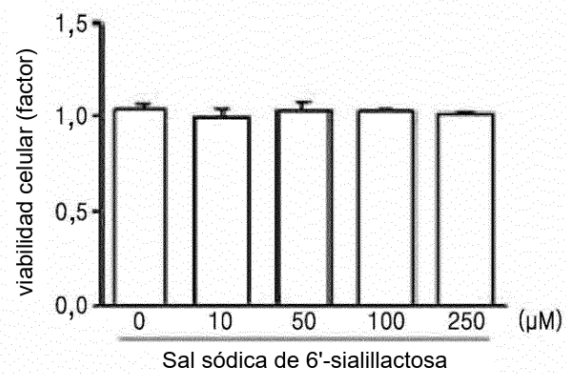


FIG. 4

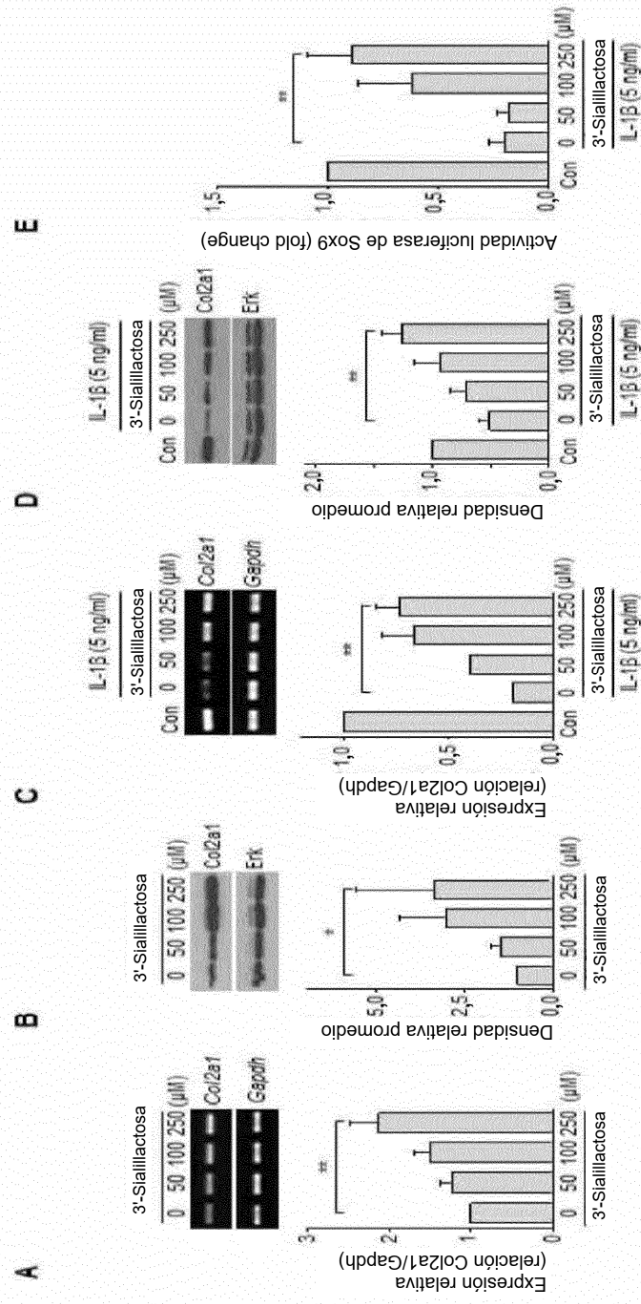


FIG. 5

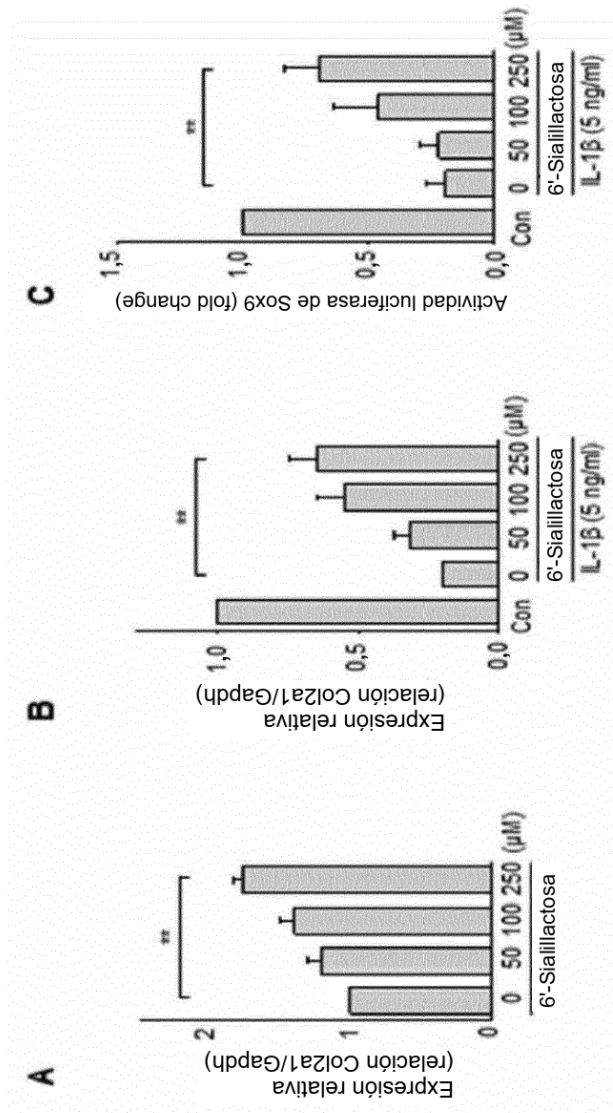


FIG. 6

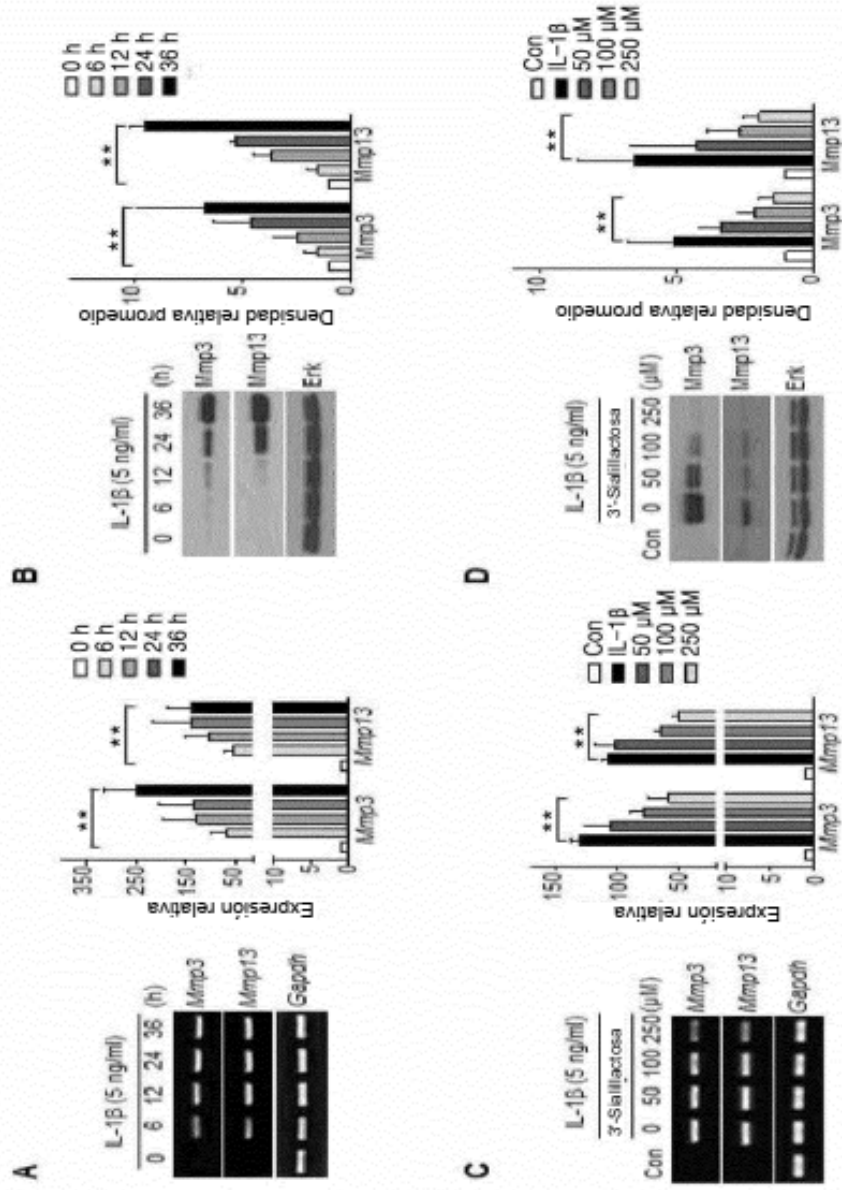


FIG. 7

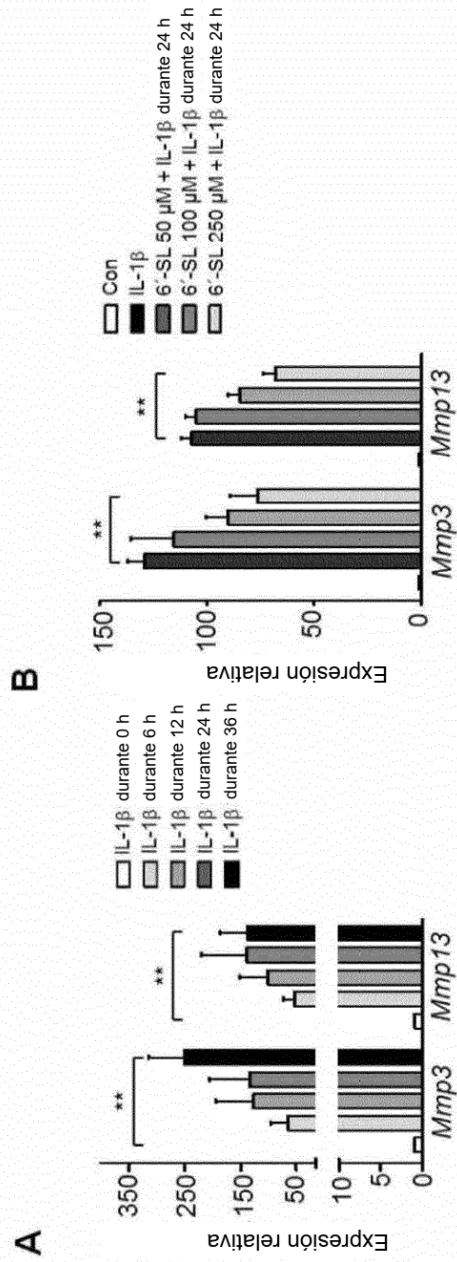


FIG. 8

