

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 915**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/728** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2006** **E 06707203 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013** **EP 1853279**

54 Título: **Derivados de amida del ácido hialurónico en osteoartrosis**

30 Prioridad:

**02.03.2005 IT PD20050056**

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

**06.09.2013**

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)  
VIA PONTE DELLA FABBRICA 3-A  
35031 ABANO TERME (PADOVA), IT**

72 Inventor/es:

**SCHIAVINATO, ANTONELLA y  
BELLINI, DAVIDE**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 421 915 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

Derivados de amida del ácido hialurónico en osteoartritis

5 **OBJETO DE LA INVENCION**

10 La presente invención concierne a un biomaterial fabricado de hexadecilamidas de ácido hialurónico (HA), particularmente la hexadecilamida del HA, administrada por la vía intra-articular como un sustituto parcial/total del fluido sinovial para tratar las articulaciones afectadas por la osteoartritis (OA) así como los casos de inflamación de las articulaciones y/o trauma que cause daño al cartílago y/o sinovia (asociado con dolor). Finalmente, describimos y reivindicamos su uso en el tratamiento de las articulaciones donde la estructura completa muestra signos de desgaste debido al envejecimiento fisiológico.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La osteoartritis/osteoartritis (OA) es una afección seriamente incapacitante caracterizada por una erosión progresiva del cartílago de la articulación debido a la degradación de la matriz articular y la pérdida de los componentes celulares principales: condrocitos.

20 La etiología exacta de la afección no es aún clara. Sin embargo, los estudios recientes han mostrado que puede ser desencadenado por desbalance mecánico que afecta toda la articulación. La inestabilidad de la articulación mecánica puede ser causada por diversos factores (por ejemplo, trauma y/o tensión mecánica que involucra la cápsula articular *in toto*, inflamación del sistema articular) y puede alterar el delicado equilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular, que se sintetiza principalmente por los condrocitos y sinoviocitos.

25 Cuando se altera esta perfecta, pero frágil homeostasis, la degradación de la matriz se compensa por su síntesis, debido a la pérdida de condrocitos, y empeora gradualmente.

30 Claramente, la carga excesiva y/o incorrecta de la articulación puede causar una respuesta del condrocito que se manifiesta en la síntesis de las mismas enzimas responsables de la degradación del cartílago, las enzimas proteasas denominadas metalo-proteinasas (MMP). Estas son sintetizadas por los condrocitos cuando son estimulados por las citocinas inflamatorias, tales como IL-1 y TNF- $\alpha$ , que se producen y liberan en la cavidad de la articulación particularmente en el inicio de una patología inflamatoria. La IL-1 estimula además la síntesis de altos niveles de óxido nítrico (responsable de la muerte del condrocito por apoptosis) así como la inhibición de la síntesis de proteoglicano (componentes de la matriz) por los propios condrocitos (Dozin B. y otros, Matrix Biology, 2002, 21:449-459).

35 Se conoce que la matriz extracelular debe ser integral para que los condrocitos sobrevivan. Los datos en la literatura científica han demostrado que la degradación de las moléculas de la matriz puede dar lugar a la liberación de otras moléculas (que igualmente se derivan de la degradación de la matriz) igualmente capaces de inducir apoptosis del condrocito (Cao L. y otros, Exp Cell Res, 1999, 246:527-537).

40 Por esta razón, el cartílago de los pacientes osteoartrosicos presenta una disminución en la celularidad y un aumento correspondiente en la formación de "lagunas" vacías dentro de la matriz articular.

45 Altos niveles de IL-1 se han encontrado en el líquido sinovial de pacientes que sufren de artritis reumatoide (RA) y artritis psoriásica (Arend W.P. y otros, Arthritis Rheum, 1995, 38:151-160).

50 El proceso de envejecimiento fisiológico de las superficies de la articulación parece además involucrar mecanismos enzimáticos peculiares a la OA. Por lo tanto, los tratamientos habitualmente usados para tratar esta patología también se aplican a articulaciones con cartílago dañado parcial o totalmente por el envejecimiento "normal" de la articulación.

55 La matriz del cartílago está constituida por una estructura tridimensional formada por moléculas de colágeno y complejos de proteoglicanos agregados. Estos a su vez están constituidos por una estructura de soporte basada en ácido hialurónico que interactúa con moléculas de glicosaminoglicano (GAG), unidas de forma no covalente a secuencias de polipéptidos asociadas con el ácido hialurónico (HA), dando así al cartílago propiedades mecánicas y viscoelásticas.

60 Claramente, HA es una molécula con propiedades viscoelásticas especiales, sintetizada y secretada también en la cavidad articular principalmente por los sinoviocitos (Asari A. y otros, Arch Histol Cytol, 1995, 58(1):65-76) y por lo tanto es uno de los principales componentes de líquido sinovial. Cuando la articulación se mueve lentamente, HA actúa como un lubricante viscoso, mientras que cuando se mueve energicamente las propiedades elásticas de HA permiten que actúe como un amortiguador contrarrestando cualquier trauma o microtraumatismo al que pueda exponerse la articulación.

Se sabe que las características funcionales del líquido sinovial dependen tanto de la concentración y el grado de polimerización de HA, y que cualquier cambio en éstas puede conducir a daño histológico de tipo OA de la articulación

5 El reemplazo de HA (y de glicosaminoglicanos en general) en el líquido sinovial sano es usualmente rápido (1 día en las ovejas), pero en el curso de la OA, una caída en su concentración (asociada con una disminución de GAG) y su peso molecular promedio (MW) ha sido observado, así como una marcada disminución en su reemplazo (Balazs EA. y otros, J Rheumatol Suppl, 1993, 12:75-82; Belcher C. y otros, Annals of the Rheumatic Disease, 1997, 56:299-307).

10 Otros hallazgos han mostrado que HA no solamente tiene propiedades de viscosuplementación biomecánicas, sino también la capacidad para proteger condrocitos de la acción de IL-1, medida como el porcentaje de la síntesis de proteoglicanos (Brun P. y otros, OsteoArthritis and Cartilage, 2003, 11:208-216), (Stove J. y otros, Journal of Orthopaedic Research, 2002, 20:551-555).

15 Basándose en estas observaciones, fue Balazs, quien primero sugirió que la evolución de la osteoartrosis podría modificarse mediante la administración de HA exógeno, especialmente de HA de alto peso molecular, directamente en la cavidad articular.

20 Existen varios medicamentos disponibles en el mercado para la administración intra-articular de HA en la OA, tales como: Hyalgan<sup>®</sup>, HA purificado a partir de crestas de gallo con un MW de:  $5-7,5 \times 10^5$  Da (patente europea núm. 0138572 B1); Synvisc<sup>®</sup>, (Hylan G-F 20) HA reticulado con formaldehído y divinil sulfona con un PM de:  $6-7 \times 10^6$  Da (patente de Estados Unidos 4,713,448), Artz<sup>®</sup>, HA con PM:  $6,2-12 \times 10^5$  Da.

25 WO2004/011503 describe geles de derivados del ácido hialurónico en los cuales un grupo amina que contiene un compuesto sacárido se une a un ácido hialurónico por amidación. Dicho grupo amina que contiene el compuesto sacárido es derivado de quitosana o ácido hialurónico deacetilado y sus derivados. WO2002/30990 describe derivados de amida reticulados del ácido hialurónico obtenido por reticulación del polímero u oligómero con dos o más grupos amina, con ácido hialurónico o sus sales de hialuronato a través de la reacción de amidación. Dicho polímero u oligómero puede ser quitosana o sus derivados, ácido hialurónico deacetilado o sus derivados, polietilenglicol o proteína o péptido con dos o más grupos amina reactivos los que pueden aceptar protones. Además, la patente europea núm. 1144459 B1 describe y reivindica un nuevo derivado del HA para el tratamiento de patologías de la articulación en OA. Es un derivado de ácido hialurónico reticulado con poliaminas para formar enlaces amida con los grupos carboxi del HA. Está en forma de un hidrogel generalmente insoluble en agua, preparado y posteriormente probado con un grado final de reticulación de 50% (Barbucci R. y otros, Biomaterials, 2002, 23:4503-4513).

35 Las inyecciones intraarticulares de AH son conocidas por proporcionar viscosuplementación y mejorar la función de las extremidades afectadas por la patología OA, con la consiguiente reducción en el dolor de la articulación. Sin embargo, el tiempo de permanencia de HA en la cápsula articular se limita a alrededor de 40 horas después de la aplicación de Hyalgan<sup>®</sup> (Fraser JR. y otros, Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1993, 22:9-17) mientras que en el caso de Synvisc<sup>®</sup> puede durar unos pocos días (Fiorentini R., Proceedings of the US FDA Advisory Panel on Orthopaedic and Rehabilitation Devices, 11/21/96 Fairfax (VA):CASET Associates, 1996; Berkowitz D., Proceedings of the US FDA Advisory Panel on Orthopaedic and Rehabilitation Devices, 11/20/96 Fairfax (VA):CASET Associates, 1996).

40 Esta limitación significa que ciclos de administración semanal son generalmente requeridos, con un total de por lo menos 5 inyecciones intra-articulares.

50 Por otra parte, algunos de estos medicamentos basados en HA químicamente modificado, tal como Synvisc<sup>®</sup>, se han involucrado en reportes de eventos adversos algunas veces serios (Hammesfahr JF. y otros, The American Journal of Orthopaedics, 2003, 32:277-283), probablemente después de la aparición de procesos inflamatorios, especialmente vinculados con el reclutamiento de eosinófilos (Schiavinato A. y otros, Clinical and Experimental Rheumatology, 2002, 20:445-454).

55 Teniendo en cuenta lo anterior, se están estudiando nuevos derivados químicos de HA lo que permitirá que los problemas relacionados con el tiempo de permanencia en la cavidad articular y el riesgo de toxicidad debido a los solventes y/o agentes químicos particulares usados en la modificación química del HA sean superados, manteniendo al mismo tiempo todas las características y propiedades intrínsecas del polisacárido inalteradas. El solicitante descubrió sorprendentemente que el HA, químicamente unido a una amina por su grupo carboxi y llamado HYADD<sup>™</sup> (patente europea núm. 1095064 B1), tiene todas las propiedades intrínsecas del HA descritas anteriormente, demostrando, además, que este proporciona un estímulo proliferativo sorprendente hacia los condrocitos humanos en OA, provoca una acción protectora sobre la sinovia en OA, ralentiza el proceso degenerativo, reduce los cambios en la morfología de la superficie del cartílago en OA y la formación de osteofitos (las formaciones óseas típicas de osteoartrosis), y representa así una nueva terapia curativa para la OA y, por último, posee características viscoelásticas que permiten la

integración/sustitución parcial y/o completa del líquido sinovial en una articulación que ha sido dañada o tratada por cirugía, permitiendo corregir, la carga dolorosa de la rodilla.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

5 La patente europea núm. 1095064 B1 describe y reivindica derivados de amida del HA que se originan a partir de la formación de un enlace amida entre el grupo carboxi del HA y el grupo amina de una amina que pertenece a las series alifática, aromática, arilalifática, cicloalifática, heteroalifática. Los compuestos que se derivan de ahí (llamados HYADD™) pueden presentar diferentes grados de amidación, en el intervalo de 0.1 a 5%, (Ejemplo 1) de modo que el producto final es soluble en agua, tampón fosfato o solución salina.

10 Dichos derivados se han descrito con respecto a la preparación de composiciones farmacéuticas formuladas en varias vías diferentes, en la preparación de biomateriales fabricados en formas diferentes para la preparación de artículos quirúrgicos y, por último, en formas adecuadas para el revestimiento de objetos biomédicos tales como catéteres y endoprótesis.

15 Su uso se reivindica además en un amplio intervalo de prácticas clínicas, que incluyen ortopédicas. Sin embargo, su uso nunca se ha descrito, reivindicado, o incluso no se ha planteado la hipótesis, como un biomaterial para usar específicamente a un nivel intra-articular como una terapia curativa para la OA, o para la RA y artritis psoriásica, en todos los casos de inflamación y/o trauma articular causando daño al cartílago y/o sinovia (asociado con dolor) y por último, como una terapia para patologías asociadas con el envejecimiento de la articulación.

20 En particular, es un objeto de la presente invención el uso de hexadecilamidas de ácido hialurónico para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la osteoartritis/osteoartritis.

25 Las hexadecilamidas de ácido hialurónico como sustitutos parciales y/o totales del líquido sinovial en el tratamiento de las articulaciones afectadas por la osteoartritis, trauma, inflamación y/o desgaste debido al envejecimiento de la estructura de la articulación son además objetivo de la presente invención. Los biomateriales constituidos por las hexadecilamidas de ácido hialurónico son además objetivo de la presente invención.

30 Con los experimentos descritos de aquí en lo adelante el solicitante ha demostrado que:

- los derivados de HYADD™ poseen las propiedades intrínsecas del HA, con un tiempo de permanencia decididamente más largo en la articulación que el del HA nativo;
- ejercen un fuerte estímulo proliferativo en los condrocitos en OA y por lo tanto prometen ser una nueva terapia eficaz para la cura del cartílago dañado;
- ejercen una acción protectora inesperado en la sinovia y cartílago en OA, ralentizando el proceso degenerativo;
- tienen propiedades viscoelásticas que permiten la integración/sustitución parcial y/o completa del líquido sinovial en una articulación que está dañada/inflamada/envejecida o se ha sometido a cirugía;
- no tienen ningún efecto tóxico sobre condrocitos o sinoviocitos tratados *in vitro* e *in vivo*;
- por último, por todas las razones anteriores, los derivados de HYADD™ han probado ser activos para reducir el dolor asociado a la OA, permitiendo así corregir la carga de la articulación.

45 Basado en lo anterior, el solicitante reivindica derivados de HYADD™ como biomateriales para usar para sustituir parcialmente/totalmente el líquido sinovial en el tratamiento de las articulaciones, especialmente las afectadas por OA y, además, para las articulaciones afectadas por trauma y/o inflamación, o que se han dañado por el proceso de envejecimiento fisiológico o tratadas por cirugía.

50 Los derivados del HA conocidos como HYADD™ descritos en la presente invención se sintetizan de acuerdo con patente europea núm. 1095064 B1, comenzando con un derivado del HA a partir de cualquier fuente, por ejemplo, obtenido por extracción de crestas de gallo (patente europea núm. 0138572 B1), o por fermentación o por medios técnicos, y tienen un peso molecular en el intervalo entre 400 y  $3 \times 10^6$  Da, particularmente entre  $1 \times 10^5$  Da y  $1 \times 10^6$  Da, y aún más particularmente entre 500,000 y 750,000 Da.

55 El derivado de HYADD™ usado en todos los experimentos realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, tiene un grado de amidación promedio de 2-3%, y se sintetizó usando hexadecilamina con carbonil diimidazol como el agente de activación preferido (Ejemplo 2).

60 El producto obtenido es soluble en agua y puede estabilizarse mediante los métodos conocidos por los expertos en el campo. Sin embargo, la esterilización por autoclave es preferida.

Particularmente, en las hexadecilamidas de ácido hialurónico de acuerdo con la presente invención la amida se forma por un enlace amida entre el grupo carboxi del ácido hialurónico y el grupo amina de la hexadecilamina. El grado de amidación está en el intervalo entre 0.1 y 5%. Con mayor preferencia el grado de amidación promedio es 2% o 5%. Las

hexadecilamidas del ácido hialurónico de acuerdo con la presente invención se preparan en forma de geles, hidrogeles, polvos, microesferas, nanoesferas.

5 El propósito de los experimentos descritos más adelante fue analizar la viscosidad y propiedades químicas/biológicas del derivado HYADD™:

- para el análisis histológico *in vivo* de la sinovia (membrana sinovial) en oveja con OA después del tratamiento intra-articular (descrito en detalle de aquí en lo adelante);
- para analizar la morfología de la superficie del cartílago con OA *in vivo* y evaluar la presencia de osteofitos después del tratamiento intra-articular (descrito en detalle de aquí en lo adelante);
- para medir la concentración de glicosaminoglicanos *in vivo* presentes en el líquido sinovial de ovejas con OA antes y después del tratamiento intra-articular (descrito en detalle de aquí en lo adelante);
- para determinar la viscosidad intrínseca *in vivo* del líquido sinovial de las articulaciones de ovejas con OA antes y después del tratamiento intra-articular (descrito en detalle de aquí en lo adelante);
- para evaluar *in vivo* el tiempo de permanencia en la cavidad articular y lugar en el cartílago de la articulación;
- usar cultivos *in vitro* de sinoviocitos tomados de articulaciones OA de ovejas que recibieron tratamiento intra-articular (descrito en detalle de aquí en lo adelante) para evaluar la capacidad de HA para la síntesis;
- usar cultivos *in vitro* de condrocitos OA humanos para verificar su efecto proliferativo y toxicidad.

20 **Materiales, métodos, y los resultados obtenidos del experimento *in vivo* : Modelo de OA en las articulaciones de ovejas**

18 ovejas Merino de 7-8 años de edad se sometieron primero a una meniscectomía para eliminar la parte lateral del menisco en ambas extremidades frontales; 16 semanas después de la cirugía, la OA fue evidente, como se describe en Ghosh P. y otros, Proceeding Hyaluronan 2003 Congress, Ed. Matrix Biology Institute 2004 e en Little C. y otros, J Rheumatol, 1997, 24:2199-2209.

**Tratamiento**

30 Los 18 animales se dividieron después en 3 grupos, a cada uno de administró un tratamiento diferente comenzando la semana 16<sup>ta</sup> después de la cirugía y terminando la 20<sup>ma</sup> semana:

- **OA + Placebo:** los animales se trataron semanalmente con 1 inyección intra-articular de 2 ml de solución salina estéril, para un total de 5 inyecciones;
- **OA + HA:** los animales se trataron semanalmente con 1 inyección intra-articular de 2 ml de HA (PM 500,000-730,000 D), para un total de 5 inyecciones;
- **OA + HYADD™:** estos animales se trataron cada dos semanas con 1 inyección intra-articular de 2 ml de HYADD™ (Hexadecilamida del ácido hialurónico con un PM de PM 500,000-730,000 D y un grado de amidación promedio de 2%) diluido en solución de tampón fosfato (PBS) a una concentración final de 5 mg/ml, para un total de 3 inyecciones.

40 Los animales se sacrificaron en la 26<sup>ta</sup> semana.

El líquido sinovial se tomó de la oveja inmediatamente antes del inicio del tratamiento y 1 semana antes del sacrificio (por lo tanto, 5 semanas después del final del tratamiento), mientras que la sinovia y el cartílago se eliminaron en el momento del sacrificio.

**Análisis realizado in vivo:****Histología de la sinovia**

5 Las muestras de sinovia de las articulaciones sometidas a meniscectomía y tratadas como se describió anteriormente, se sumergieron primero en solución de formalina tamponada (10% en PBS) por 24-48 horas. Después de la deshidratación con alcohol y xilol, se embebieron en parafina y se procesaron como es conocido por un experto en este campo para obtener secciones de 4µm de espesor, y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina. A los 3 grupos de muestras tratadas como se describió, se añadió un 4to grupo de animales no operados, representando los "controles no-OA".

10 **[0039]** La membrana sinovial cubre toda la superficie interior no-cartílago de la cavidad de la articulación y está constituida por tejido conectivo. Estructuralmente, se compone de tres capas, conocidas como *íntima*, *subíntima* y *subsinovial*. En la íntima, pueden observarse las fibras de colágeno y reticular regularmente dispuestas, que aumentan en número en la subíntima y subsinovial. Dichas secciones se analizaron bajo un microscopio óptico usando una cuadrícula de 1 cm<sup>2</sup> el cual, con una lente de aumento 40 X, proyectó un campo visual de 250 µm de cada área analizada. Se analizaron cinco áreas seleccionadas al azar por sección. Los parámetros considerados (escogidos porque caracterizan la OA), fueron los siguientes: hiperplasia de la íntima, presencia de infiltraciones de plasma en la íntima y fibrosis de la membrana sinovial (manifiesta por un disposición "desordenada" de las fibras de colágeno en la sinovia). La fibrosis de la sinovia se evaluó midiendo la profundidad de la subíntima hasta un valor máximo de 250 µm. La puntuación en los primeros dos parámetros se basó en la tabla más abajo:

Parámetros	Puntuación	Observaciones
Hiperplasia de la íntima	0	Presencia de 1-2 capas de células;
	1	Entre 3 y 4 capas;
	2	5 capas o más;
	3	5 capas o más a lo largo de toda la íntima.
Infiltraciones de Plasma	0	Ninguno;
	1	1 foco de infiltración;
	2	entre 2 y 5 focos;
	3	Presencia de 5 o más focos dispersos.

**Resultados**

25 La meniscectomía causó un aumento significativo en todos los parámetros histológicos analizados, comparado con los controles no operados (que representan una situación libre de OA), demostrando así la validez del modelo de inducción de OA que se usó. En todos los casos, el tratamiento con HYADD™ (Fig. 1, 2 y 3) determinó una mejora marcada y significativa en los parámetros considerados, con respecto al tratamiento con Placebo y HA (Fig. 3) y, en un caso (Fig. 3), HYADD™ incluso dio el mismo resultado que el control no-OA.

**Análisis del cartílago de la articulación**

35 En paralelo con el análisis histológico de la membrana sinovial, el análisis morfológico macroscópico se realizó en la articulación cartílago de los animales OA comparado con los no tratados (placebo) y los controles (en este caso también, un cuarto grupo de animales no operados que representan "controles no-OA" se añadió a los tres grupos). Las articulaciones se abrieron para analizar la superficie de las articulaciones mediales que conectan la tibia y el fémur. Las evaluaciones se basaron en el Sistema de Puntuación Morfológico en Bruto de Cake y otros, Osteoarthritis and Cartilage, 2000, 8:404-411, usado para evaluar los daños del cartílago y los efectos del tratamiento.

40 El Sistema de Puntuación estima la integridad del cartílago y el desarrollo de osteofitos (formaciones óseas típicas de la osteoartritis) aplicando las siguientes puntuaciones:

Parámetros	Puntuación	Observaciones
Integridad del cartílago	0	Normal;
	1	Rugosidad;
	2	Fibrilación y fisuras;
	3	Pequeñas erosiones (< 5 mm)
	4	Mayores erosiones (>5mm)
Desarrollo de Osteofito (os.)	0	Normal;
	1	Ligero Desarrollo de os.;
	2	Moderado Desarrollo de os.;
	3	Gran Desarrollo de os.;

**Resultados**

5 Los animales tratados con placebo tuvieron las puntuaciones más altas para el desarrollo de osteofitos (Fig. 4-5). El tratamiento con HYADD® redujo significativamente el desarrollo de tales alteraciones, particularmente evidentes en el compartimento medial del cóndilo femoral (Fig. 5).

10 Igualmente, las puntuaciones más altas con relación al daño del cartílago se observaron en los animales tratados con placebo, mientras que el cartílago del grupo tratado con HYADD® fue el menos alterado, teniendo en cuenta tanto la placa tibial y el cóndilo femoral (Fig. 6-7).

**Concentración de glicosaminoglicano**

15 El propósito de este análisis fue evaluar y comparar la concentración de los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) presentes y/o recientemente sintetizados en el líquido sinovial de los animales tratados vs placebo. El análisis se realizó usando la técnica descrita por Farndale RW. y otros, Connective Tissue Res., 1982, 9:247-248, y perfeccionada por Appleyard RC. y otros, Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11:65-77.

20 Los resultados se muestran como un gráfico en la Fig. 8 como la concentración de GAGs determinada al final del tratamiento y expresada como un porcentaje de la concentración medida al inicio del tratamiento. La Figura 8 muestra que el tratamiento con HYADD™ solo determina un mayor aumento que el placebo en la concentración de GAGs en el líquido sinovial al final del experimento (el cual, contrariamente, da valores sustancialmente inferiores que al inicio del tratamiento, como se discutió previamente), GAGs que puede derivarse de una mayor síntesis por los sinoviocitos de tejido sinovial estimulados y protegidos por la amida del HA en cuestión.

**Viscosidad dinámica**

30 La viscosidad dinámica del líquido sinovial (es decir, su viscosidad intrínseca) se midió al inicio y 5 semanas después del final de cada tratamiento con un reómetro Micro Fourier. Todos los hallazgos se calcularon y compararon entre sí a una frecuencia de 0.5 Hz (Ghosh P. y otros, Proceedings Hyaluronan 2003 Congress, Ed. Matrix Biology Institute 2004).

35 Los resultados se muestran en la Fig. 9: El tratamiento con HYADD™ determina un aumento significativo en la viscosidad intrínseca en los animales tratados, comparado con el placebo.

**Tiempo de permanencia**

40 El tiempo de permanencia de HYADD™ en la cavidad articular se evaluó en articulaciones de conejos no-OA: 5 grupos de 5 conejos cada uno se les administró una sola inyección intra-articular de 0.25 ml de HYADD™ a una concentración inicial de 5 mg/ml (cada articulación por lo tanto recibió 1.25 mg de HYADD™), y se analizaron 15, 25, 35, 45 y 55 días después de la administración.

45 El tiempo de permanencia en la articulación se determinó por análisis HPLC del residuo amina (del derivado HYADD™) presente en el líquido sinovial tomado de las articulaciones tratadas, en los tiempos fijados, después de la eutanasia de los animales.

Las muestras de líquido sinovial se trataron con NaOH antes de la hidrólisis a 70°C, lo que permite así completar la

liberación de la hexadecil amina de la molécula en cuestión. La amina se extrajo después de la solución con dietiléter, se disolvió en metanol y se preparó para análisis cromatográfico por la técnica HPLC con fluorómetro (longitud de onda de excitación 330 nm, longitud de onda de emisión 440 nm).

5 Cuantificando la hexadecil amina en las muestras, es posible establecer la concentración de HYADD™ en el líquido sinovial.

10 El tiempo de permanencia resultante fue 15 días, porque 27% del derivado inicial estaba aún presente en la cavidad articular después de ese tiempo, pero este índice cayó a 5% 25 días después de la inyección, como se muestra en la Fig. 10.

#### **Determinación del lugar de preferencia del derivado de HYADD™**

15 Para este tipo de experimento, usamos el derivado de HYADD™ marcado con el isótopo 14C : (14C)-HYADD™ con actividad inicial específica de 3.01 $\mu$ Cl.mg<sup>-1</sup>, preparado y suministrado por ABC Laboratories. El derivado (14C)-HYADD™ se preparó en tampón de fosfato a una concentración inicial de 8 mg.ml<sup>-1</sup>; 0.4 ml de la solución resultante se inyectó en las cavidades de la articulación de 5+5 conejos que se sacrificaron más tarde en el 2<sup>do</sup> y 14<sup>to</sup> días después del tratamiento cuando se analizó la radiactividad presente en la superficie del cartílago. Las muestras de cartílago tomadas se expusieron primero a hidrólisis básica con NaOH 2M por 30 minutos a 70 °C. Cada muestra se lavó después con tampón y el tampón lavado se concentró con las soluciones anteriores de NaOH. Las muestras se mezclaron después con fluido de escintilación Quickszint 1 (en una relación de 1:10) para la lectura de radiactividad final, y después la radiactividad se determinó usando un analizador de escintilación Packard TR 2100.

25 Los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje de radiactividad inicial inyectada. Dos días después de las inyecciones intra-articulares, el % de radiactividad recuperado después de la hidrólisis básica del cartílago fue 2% de la inicialmente inyectada, mientras que el índice cayó a 1% 14 días después del tratamiento.

30 Este resultado indica claramente que el derivado de HYADD™ no se queda confinado en el líquido sinovial después de inyectarse intra-articularmente, sino que podemos encontrarlo en la superficie del cartílago de la articulación tan pronto como a los dos días después, confirmando así que el derivado de amida, tema de la presente invención, representa una nueva terapia para el tratamiento de la OA.

#### **Análisis *In vitro* :**

##### **Sinoviocitos de ovejas con OA en cultivo**

#### **Materiales, métodos y resultados obtenidos a partir del experimento**

##### **Células:**

40 Las membranas sinoviales usadas en el siguiente experimento se tomó de los animales tratados con HYADD™ y HA y de los controles respectivos, como se describió anteriormente para el experimento *in vivo*.

45 **[0058]** Ellos se cortaron primero en una placa de Petri, se lavaron y se centrifugaron con una solución tampón de fosfato (PBS) a 2000 rpm a 20°C por 10 minutos, y después se resuspendieron en PBS conteniendo tripsina (0,2%) y EDTA (0,1%). El material digerido se lavó y se centrifugó con el medio de cultivo (DMEM) y después se resuspendió en DMEM conteniendo suero fetal de ternera FCS (10%). Las células así obtenidas se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos y el comprimido se recogió con el medio de cultivo (DMEM/FCS) conteniendo 2 mg/ml de colagenasa. Después de 3 horas de incubación a 37 °C, las células se centrifugaron y se sembraron en placas de Petri con DMEM conteniendo 10% de FCS. Las células así obtenidas se expandieron al segundo pasaje. El medio se renovó cada 2/3 días y, cuando las células alcanzaron 90% de confluencia, se usó para determinar la síntesis de HA, incubando los sinoviocitos con alícuotas establecidas de <sup>3</sup>H-acetato (Amersham Pharmacia Boitech). Las células se trataron después como se describe por Ghosh P. y otros, Proceedings Hyaluronan 2003 Congress, Ed. Matrix Biology Institute 2004 para la determinación final del <sup>3</sup>H-acetato incorporado en las moléculas de HA sintetizadas *in vitro* por los sinoviocitos.

##### **Resultados**

60 Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento de las articulaciones OA con HYADD™ protege los sinoviocitos de la acción citotóxica de las citocinas proinflamatorias normalmente presentes en las articulaciones OA, favoreciendo/manteniendo inalterada su metabolismo celular, demostrado por su alta capacidad para la síntesis de HA, como se muestra por los datos experimentales en la Figura 11, obtenidos con los sinoviocitos tomados de ovejas con OA tratadas con HYADD™ vs placebo.

**Cultivos de condrocitos de OA humanos**

**Materiales:**

5 HYADD™ (hexadecilamida del ácido hialurónico con un PM de 500,000-730,000 D y un grado de amidación promedio de 2%) diluido en tampón fosfato a una concentración final de 3mg/ml.

**Células:**

10 Condrocitos Humanos: las células se obtuvieron por biopsia del cartílago de la articulación de pacientes que se sometieron a cirugía de reemplazo de la articulación. En resumen, las muestras se picaron y se trataron con tripsina (0.25%), hialuronidasa testicular y colagenasa tipo I. El material digerido se resuspendió después en medio de cultivo (F12 de Ham) conteniendo suero fetal de ternero (10%), glutamina, 4mM, y penicilina/estreptomycin, 100U.

15 Las células así obtenidas se expandieron al segundo pasaje con cambios diarios del medio. La viabilidad celular se probó por tinción con azul tripán.

**Curso de tiempo de la proliferación celular**

20 Para verificar cualquier toxicidad y/o cualquier posible influencia que HYADD™ pueda tener en la velocidad de proliferación del condrocito, las células se sembraron en presencia de dos concentraciones diferentes de HYADD™ (0.5 y 1.5 mg/ml de medio de cultivo) por un periodo de 3 a 9 días. Los experimentos se realizaron por triplicado. La viabilidad celular se determinó por el método MTT (Dezinot F. y otros, J Immunol Methods, 1986, 22(89):271-277).

25 **Resultados**

Los resultados obtenidos (Fig. 12) indican que el tratamiento con HYADD™ a una concentración de 1.5 mg/ml aumentó significativamente la viabilidad de los condrocitos humanos en todas las preparaciones de prueba tan pronto como el 3<sup>er</sup> día del tratamiento. Además, después de 9 días del tratamiento, una efecto proliferativo significativo del derivado de amida puede observarse, para la concentración de 1.5 mg/ml y para una inferior de 0.5 mg/ml.

Los resultados del estudio con HYADD™ por lo tanto confirman que dicho derivado de ácido hialurónico tiene un marcado efecto proliferativo en los cultivos de condrocitos humanos de pacientes con OA.

35 Considerando los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, puede decirse que:

- Los derivados de amida del HA denominados HYADD™ (especialmente el hexadecil amida del HA) estimula la proliferación de condrocitos, las células responsables de la síntesis de la matriz extracelular que, en OA, se somete a un proceso degenerativo continuo asociado con la muerte del condrocito, como se describió anteriormente en detalle;
- El derivado de amida, objeto de la presente invención, probó además ser capaz de estimular la síntesis de HA por los sinoviocitos, contribuyendo así a la normalización del reemplazo del HA (y el de los otros glicosaminoglicanos) en el líquido sinovial, el cual de cualquier otra forma está severamente deteriorado en las articulaciones con OA, como se describió anteriormente;
- cuando se probó *in vivo*, el derivado de amida objeto de la presente invención probó ser capaz de proteger la membrana sinovial y el cartílago de la articulación de las alteraciones típicas de la OA, estableciendo la sinovia a parámetros similares, si no iguales, a los del control no-OA;
- la viscosidad final de las muestras de líquido sinovial tratadas fue mayor que la observada en OA, y el tiempo de permanencia del derivado de amida en la cavidad articular fue notablemente más largo que el de los otros derivados y/o HA no-modificados.

50 La falta absoluta de toxicidad del derivado objeto de la presente invención, la protección de la degeneración de la OA que se produce en el cartílago, la protección de la membrana sinovial y normalización de la viscosidad del líquido sinovial, asociada con su considerable tiempo de permanencia en la cavidad articular, hace este derivado absolutamente nuevo y adecuado para el uso:

- como un nuevo tratamiento para la osteoartrosis/osteoartritis,
- como un sustituto parcial/total del líquido sinovial, en el tratamiento de articulaciones afectadas por osteoartrosis y en casos de inflamación y/o trauma con daño sinovial y/o del cartílago resultante (asociado con dolor).

60 Por último, reivindicamos su uso en el tratamiento de articulaciones afectadas por desgaste debido al envejecimiento fisiológico de la estructura de la articulación.

El biomaterial que es objeto de la presente invención puede fabricarse en varias formas (tal como geles, hidrogeles,

5 polvos, microesferas, nanoesferas), asociadas con sustancias farmacológicamente y/o biológicamente activas tales como esteroides, citocinas, interferón, péptidos y ácido nucleicos, factores de crecimiento (tales como PDGF, IGF, TGF- $\beta$ , FGF, GDF5, GDF6) y/o factores de crecimiento diferenciadores (por ejemplo, BMP2 y BMP7), o usados como un vehículo para las células diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, sinoviocitos, osteoblastos/osteocitos), o células no diferenciadas tales como células mesenquimales.

10 Los derivados de amida del HA que son el objeto de la presente invención pueden formularse en todas las formas conocidas por un experto en el campo, en asociación con estabilizadores, excipientes, conservantes y/o cualquier otra molécula que un experto pudiera considerar útil, para obtener la mejor formulación farmacéutica posible.

15 Reportamos algunos ejemplos para la preparación de los derivados de amida del HA (HYADD™) que son el objeto de la presente invención:

20 **Ejemplo 1**

25 ***Preparación de la hexadecilamida del ácido hialurónico con un grado de amidación de 5%***

30 Dos gramos (3.2 mM) de sal de tetrabutilamonio del HA (HA/TBA) se solubilizaron en 100 ml de DMSO. La solución se insufla con vapores de HCl o se trata con 60  $\mu$ l de ácido metano sulfónico hasta que alcanza un valor de pH entre 4.5 y 5. Posteriormente, 52 gramos (0.32 mM) de carbonil diimidazol se añadió a la solución, la cual se agita a temperatura ambiente por 1 hora, y después se añaden 780 mg (3.2mM) de hexadecilamina. Se deja reaccionar durante 16-18 horas, después de lo cual se añaden 5 ml de una solución saturada de NaCl y el producto obtenido se precipita con 200 ml de acetona, se filtra y se seca al vacío. El final grado de amidación final se realiza en HPLC después de la hidrólisis básica de una pequeña cantidad del producto así obtenido.

35 **Ejemplo 2**

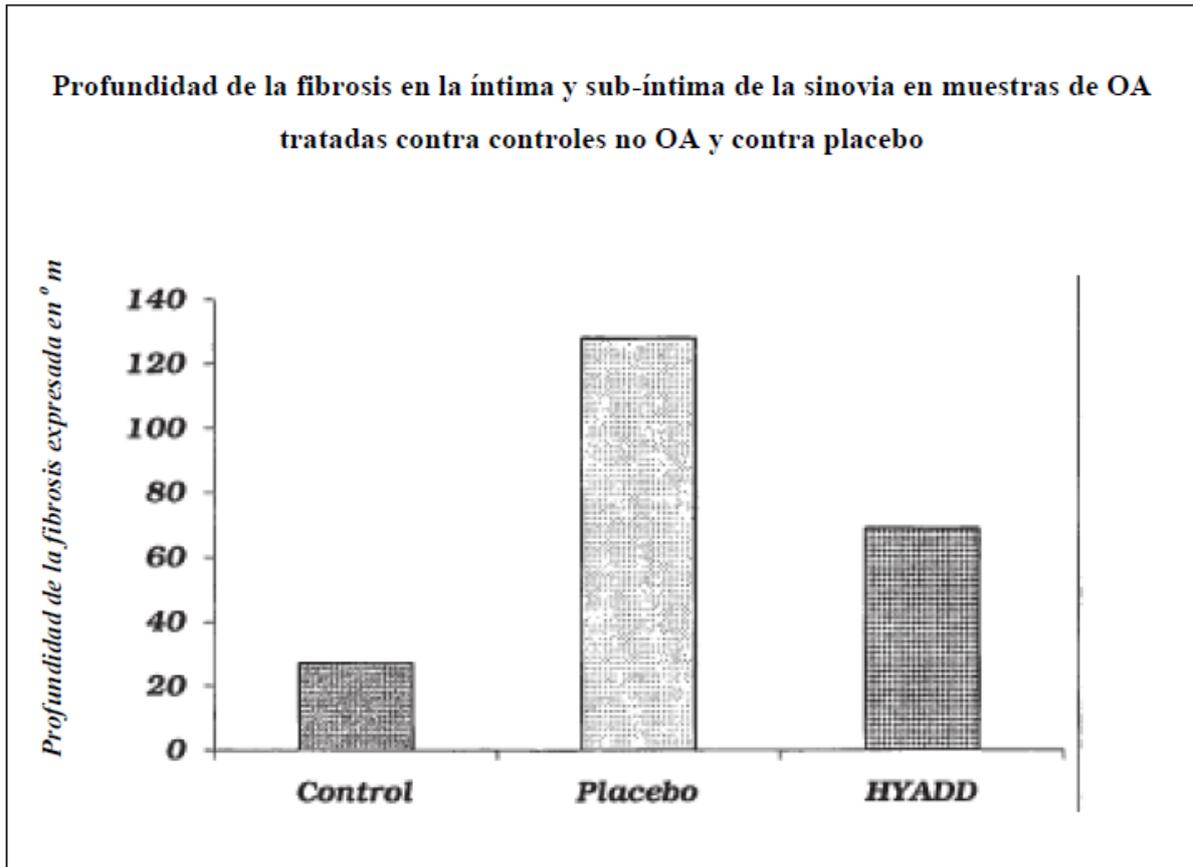
***Preparación de la hexadecilamida del ácido hialurónico con un grado de amidación de 2%***

El procedimiento es el mismo que en el Ejemplo 1, modificando solamente la cantidad de carbonildiimidazol a añadir, en este caso 30 mg.

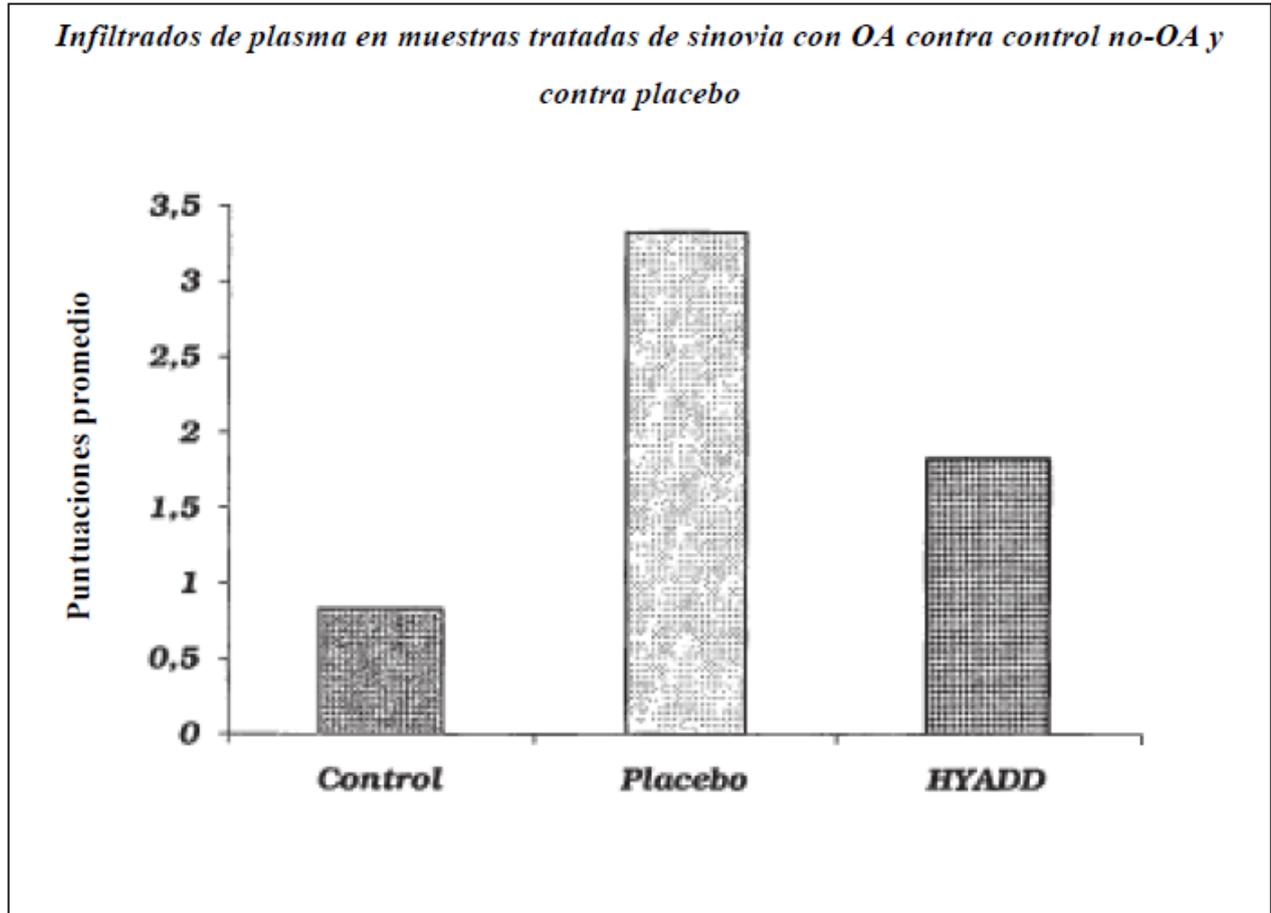
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Hexadecilamidas de ácido hialurónico **caracterizadas porque** la hexadecilamida del ácido hialurónico tiene un grado de amidación entre 0.1 y 5% para usar en el tratamiento de articulaciones afectadas por osteoartrosis, trauma, inflamación y/o desgaste debido al envejecimiento de la estructura de la articulación.
2. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas hexadecilamidas son sustitutos parciales y/o totales del líquido sinovial.
- 10 3. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde en dichas hexadecilamidas el grado de amidación promedio es 2%.
- 15 4. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde en dichas hexadecilamidas el grado de amidación promedio es 5%.
- 20 5. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dichas hexadecilamidas son solubles en agua.
- 25 6. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 5 en donde en dichas hexadecilamidas el peso molecular del ácido hialurónico está en el intervalo entre 400 y  $3 \times 10^6$  Da, particularmente entre  $1 \times 10^5$  Da y  $1 \times 10^6$  Da, y más particularmente aún entre 500,000 y 750,000 Da.
- 30 7. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dichas hexadecilamidas se elaboran en forma de geles, hidrogeles, polvos, microesferas, nanoesferas.
- 35 8. Biomateriales constituidos por hexadecilamidas de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de articulaciones afectadas por osteoartrosis, trauma, inflamación y/o desgaste debido al envejecimiento de la estructura de la articulación.
- 40 9. Biomateriales constituidos por hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 8 en donde en dichas hexadecilamidas el grado de amidación promedio es 2%.
- 45 10. Biomateriales constituidos por hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 8-9 en donde dichas hexadecilamidas son solubles en agua.
- 50 11. Biomateriales constituidos por hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 10 en donde en dichas hexadecilamidas el peso molecular del ácido hialurónico está en el intervalo entre 400 y  $3 \times 10^6$  Da, particularmente entre  $1 \times 10^5$  Da y  $1 \times 10^6$  Da, y más particularmente aún entre 500,000 y 750,000 Da.
- 55 12. Biomateriales constituidos por hexadecilamida del ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 8-11 en donde dichas hexadecilamidas se elaboran en forma de geles, hidrogeles, polvos, microesferas, nanoesferas.
- 60 13. Biomateriales constituidos por hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 12 en asociación con sustancias farmacológicamente y/o biológicamente activas.
14. Biomateriales constituidos por hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 13 en asociación con BMP2 y/o BMP7.
15. Biomateriales constituidos por hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 12 en donde dichos derivados de hexadecilamida son un vehículo para las células diferenciadas y/o no diferenciadas.
16. Biomateriales constituidos por hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 15 en donde dichas hexadecilamidas con un vehículo para los condrocitos y/o células mesenquimales.
17. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas hexadecilamidas están en asociación con sustancias farmacológicamente y/o biológicamente activas.
18. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas hexadecilamidas son un vehículo para las células diferenciadas y/o no diferenciadas.

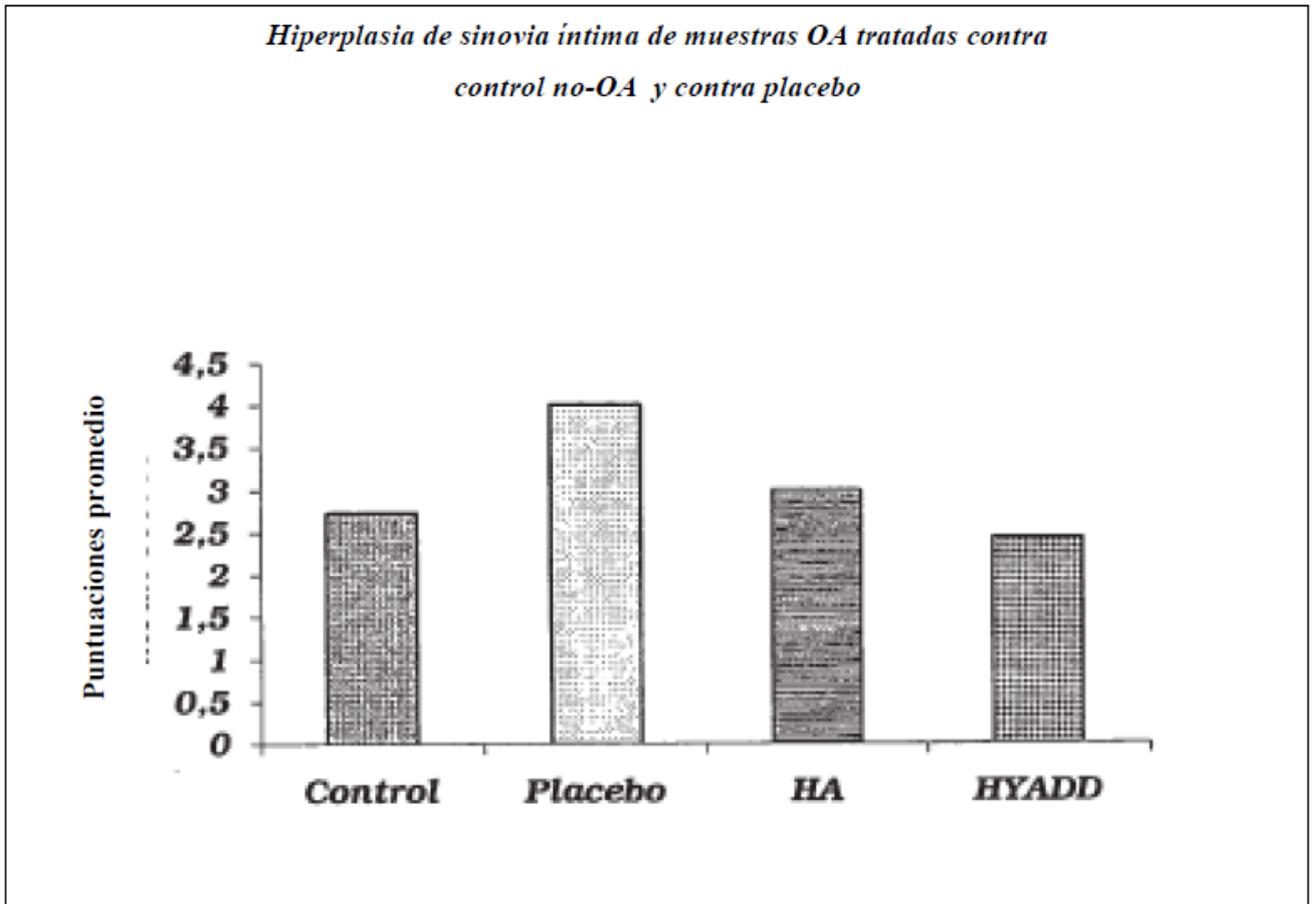
19. Hexadecilamidas de ácido hialurónico para usar de acuerdo con la reivindicación 18 en donde dichas células diferenciadas y/o no diferenciadas son condrocitos y/o células mesenquimales.



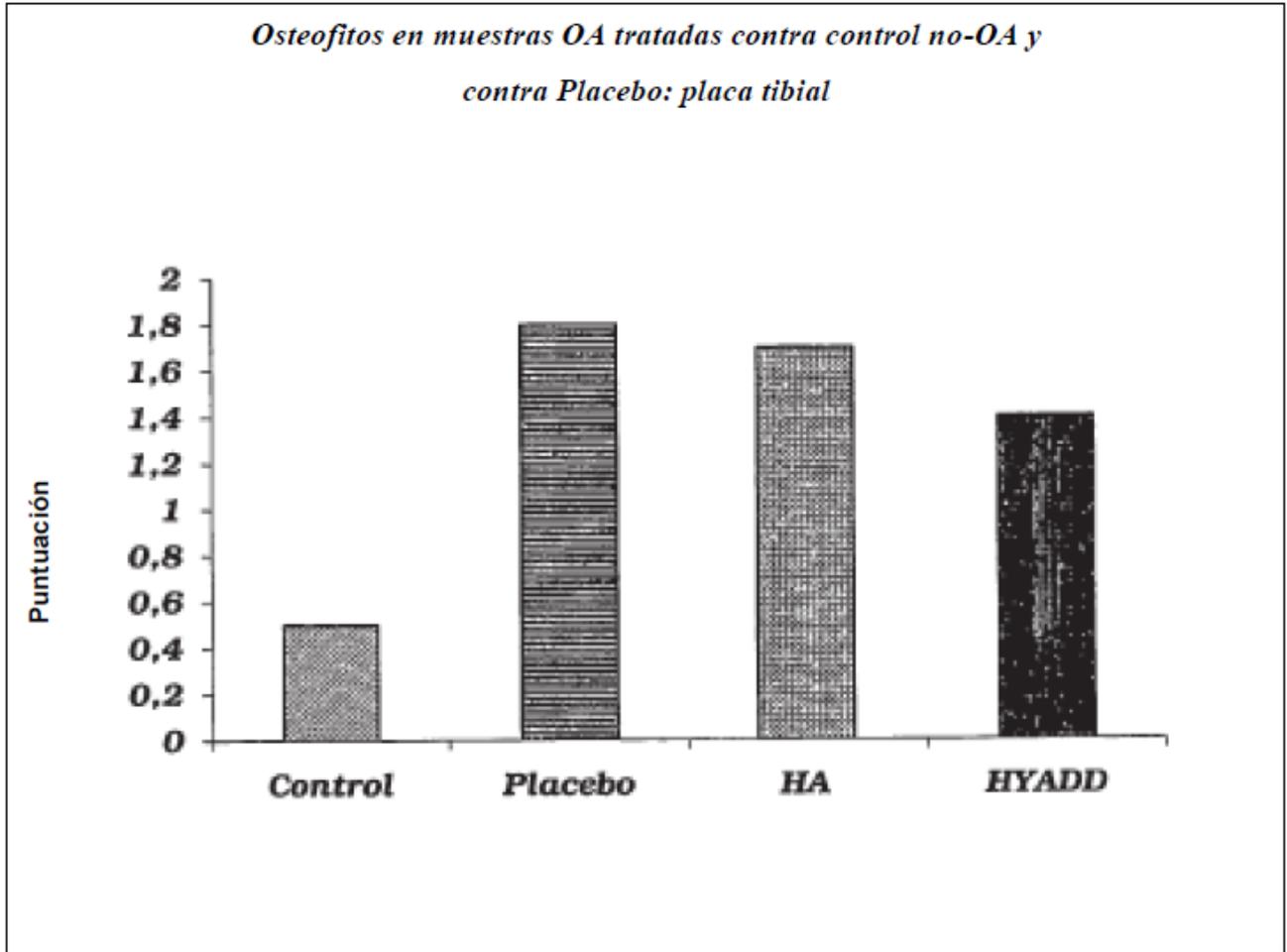
**FIG. 1**



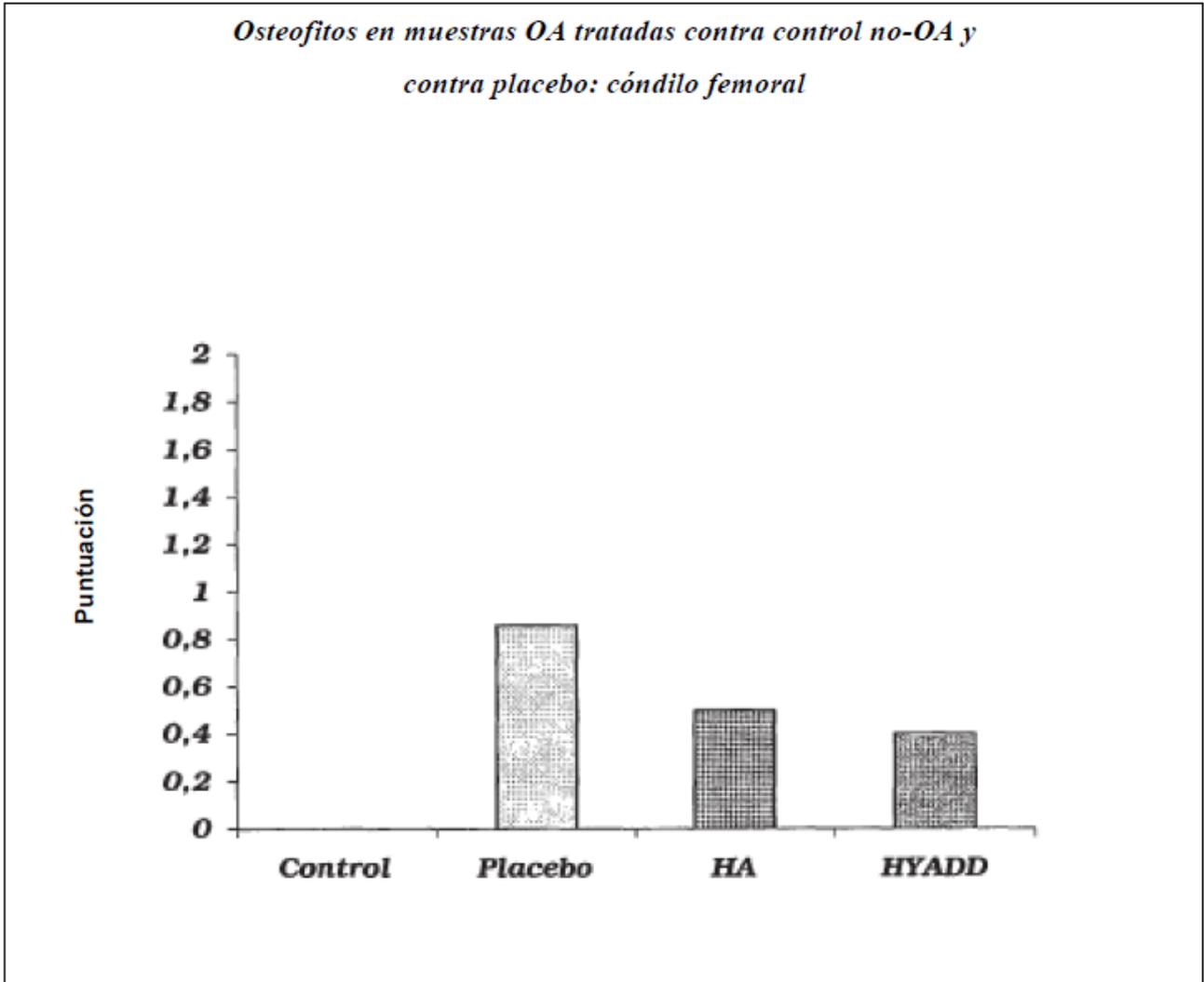
**FIG. 2**



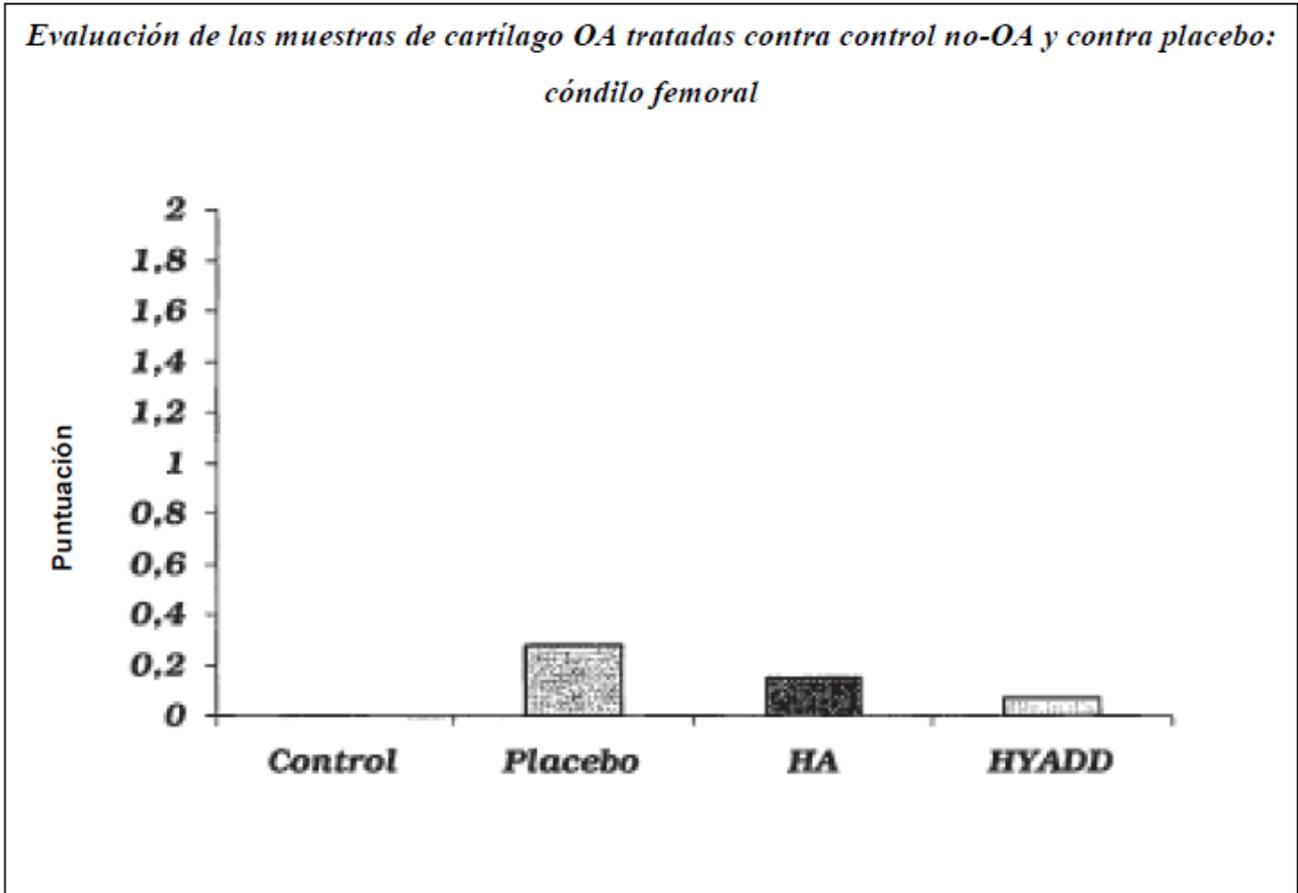
**FIG. 3**



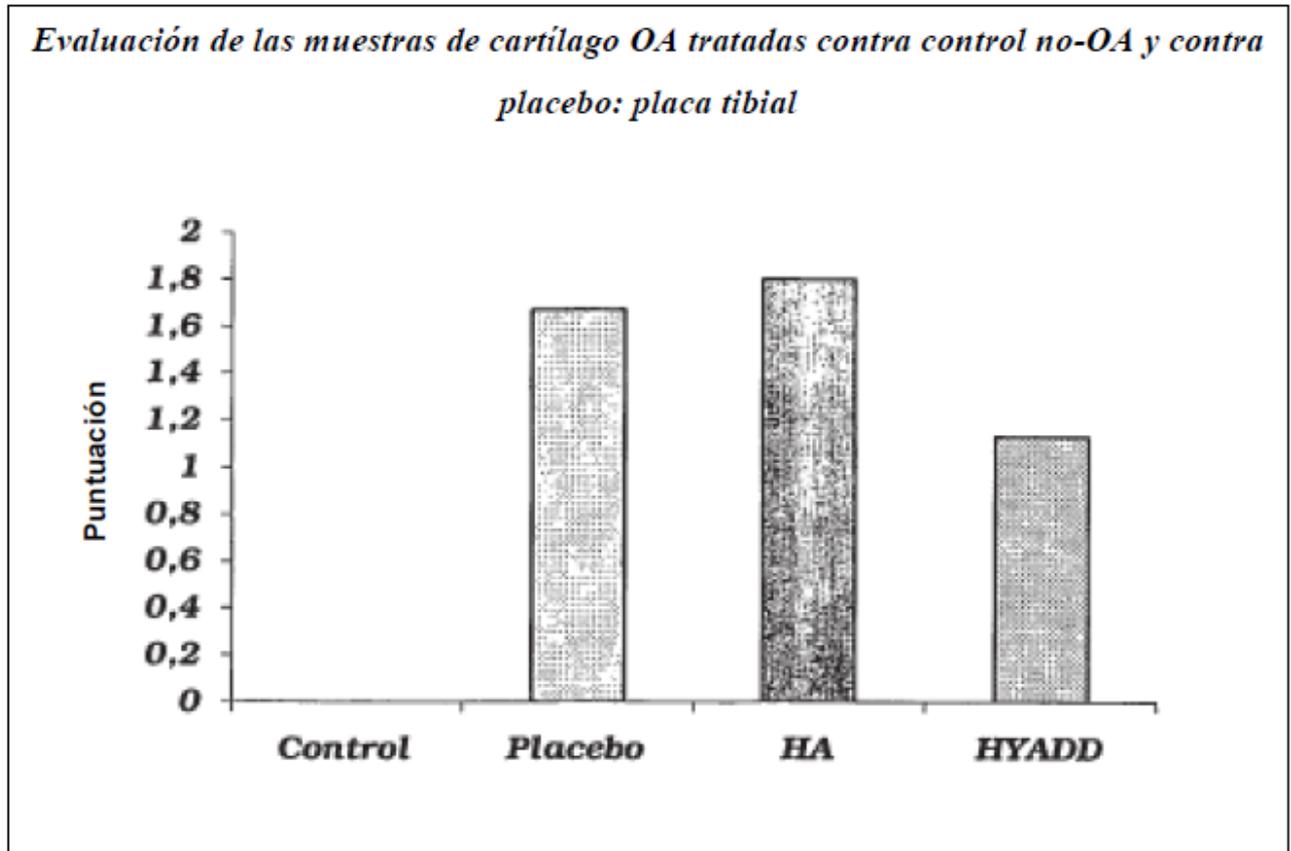
**FIG. 4**



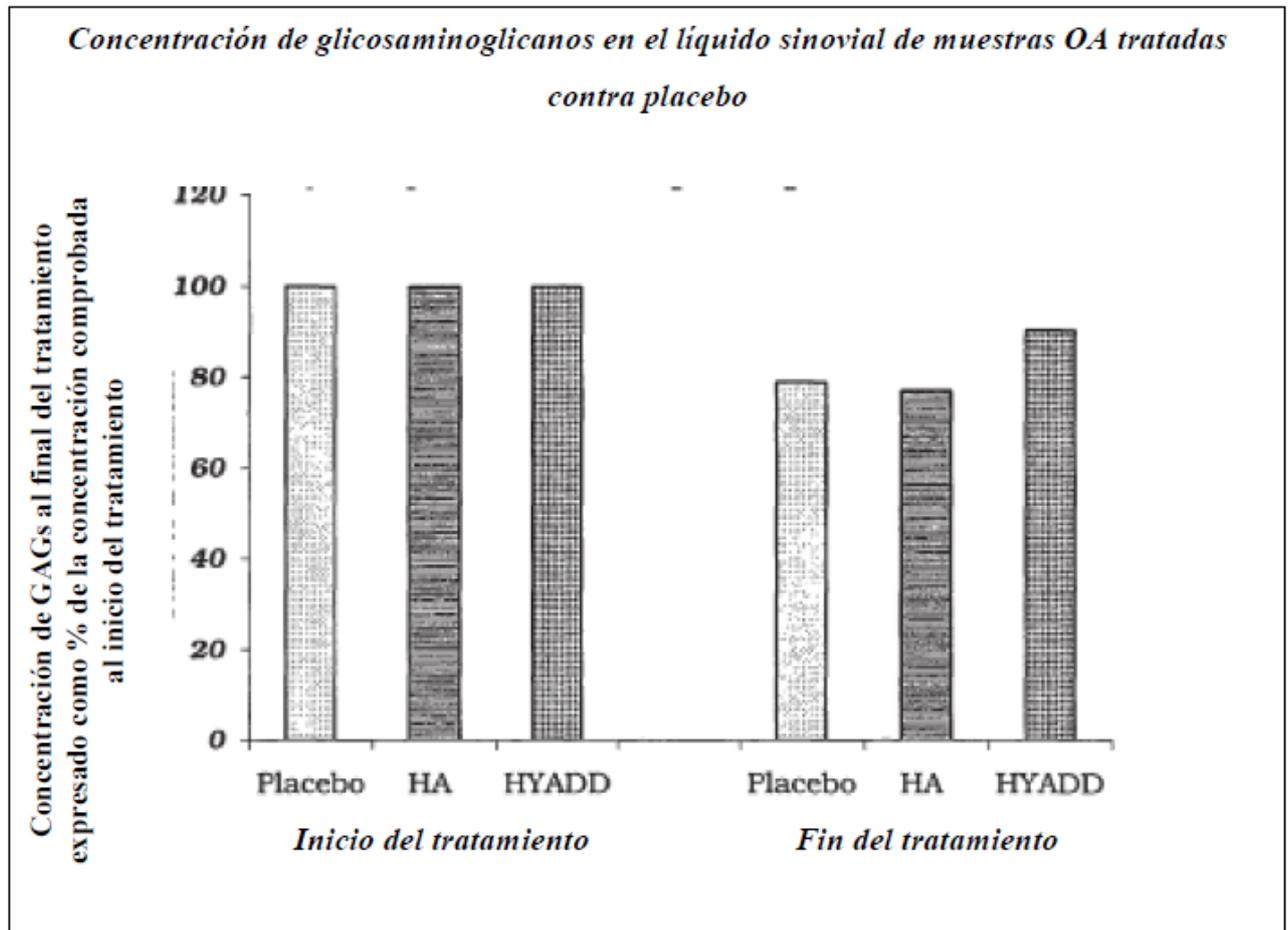
**FIG. 5**



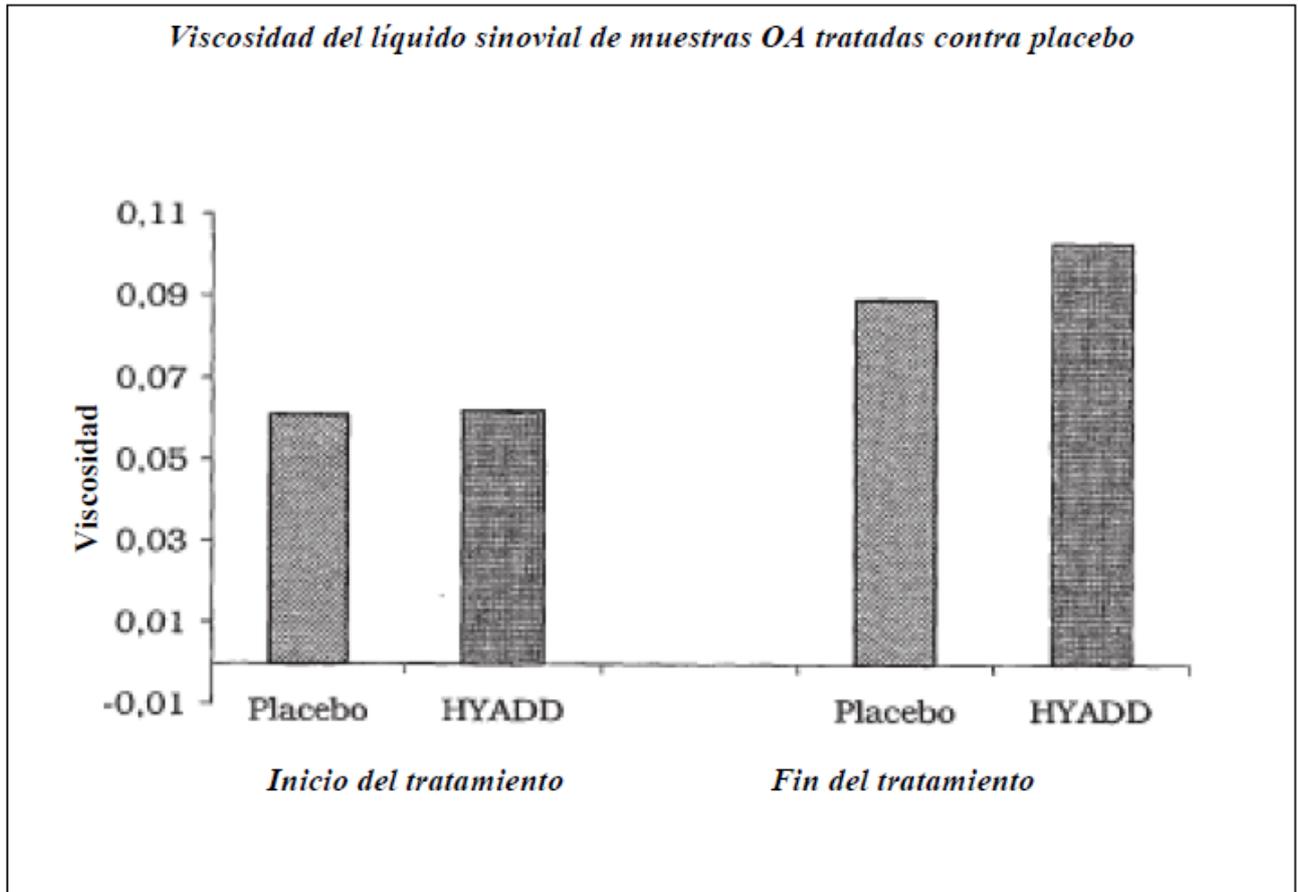
**FIG. 6**



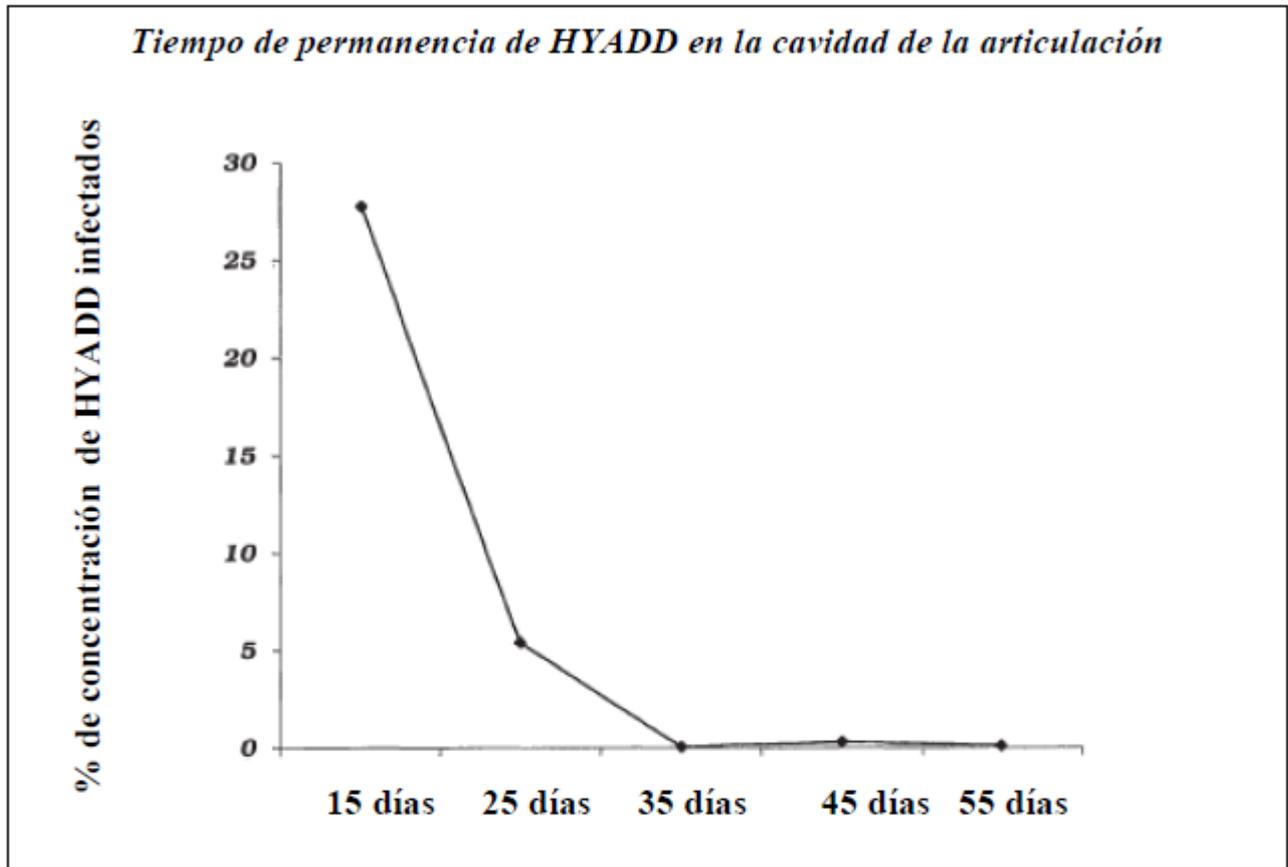
**FIG. 7**



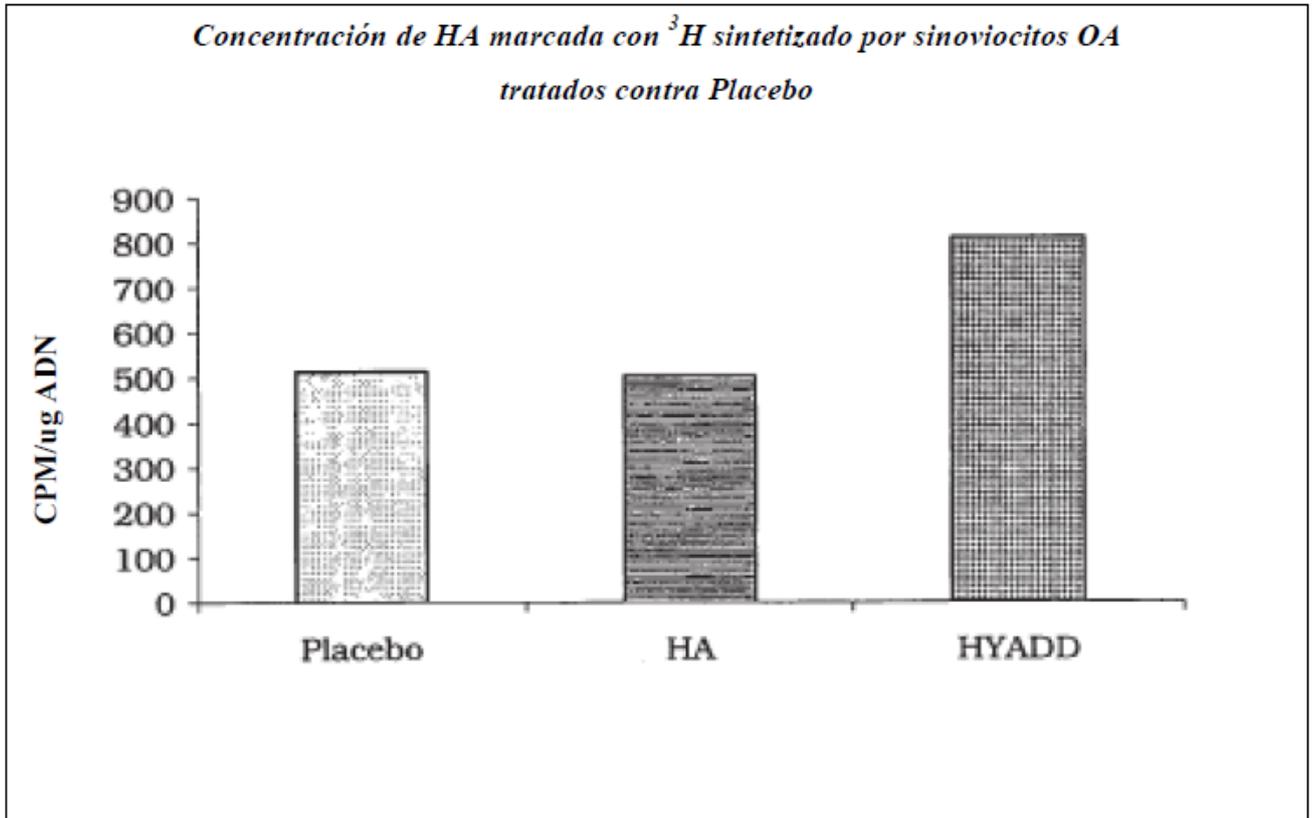
**FIG. 8**



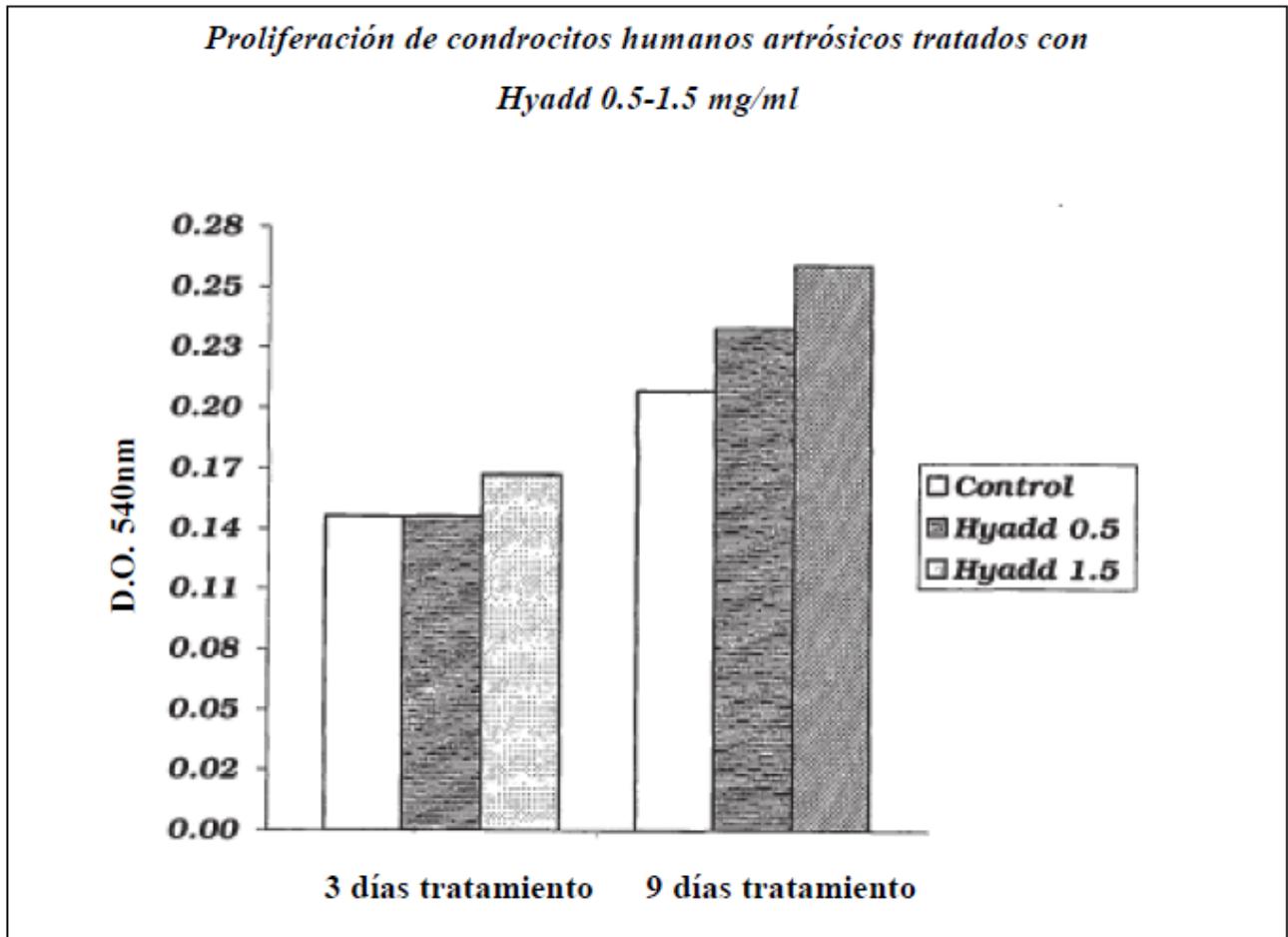
**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**