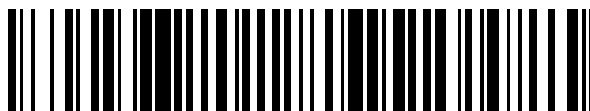


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 040**

51 Int. Cl.:

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011** **E 11181939 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014** **EP 2446884**

54 Título: **Composición para inhibir la inflamación que comprende ácido hialurónico y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa**

30 Prioridad:

29.10.2010 TW 099137186

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

01.10.2014

73 Titular/es:

**CHINA MEDICAL UNIVERSITY (100.0%)
No. 91, Hsueh-Shih Road, North District
Taichung City, TW**

72 Inventor/es:

**LIN, FENG-HUEI;
HUANG, TENG-LE y
HSU, HORNG-CHAUNG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 501 040 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 inhibir la inflamación que comprende ácido hialurónico y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inhibir la inflamación, en especial a una composición farmacéutica útil para la artritis.

Descripciones de la técnica relacionada

10 La artritis es una enfermedad crónica común, que da lugar a dolor en las articulaciones debido a la degeneración del cartílago articular o a la inflamación del tejido conjuntivo y que influye además en el movimiento normal de la articulación. Según la posición y la causa de su aparición, la artritis se puede clasificar en más de cien tipos. Los tipos más comunes incluyen la osteoartritis (artritis degenerativa), la artritis reumatoide (AR), la artritis gotosa, la artritis bacteriana, la espondilitis anquilosante, el lupus eritematoso, etc.

15 En general, en el tratamiento de la artritis, al inicio se adopta un tratamiento conservador no quirúrgico. Cuando el tratamiento inicial no hace efecto, se aplica un tratamiento quirúrgico. El tratamiento inicial incluye tratamiento farmacológico y tratamiento con inyecciones. En el tratamiento farmacológico, se usan agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. Aunque el efecto de alivio del dolor de los agentes esteroideos es rápido y evidente, pueden provocar muchos efectos secundarios, tales como osteoporosis, heridas sin cicatrizar, hemorragias gastrointestinales superiores e incluso pueden agravar afecciones existentes, tales como la hipertensión, la diabetes, etc. Por tanto, actualmente los agentes esteroideos se usan solamente en determinadas condiciones limitadas. En
20 cuanto a los agentes no esteroideos, aunque también tienen buena actividad de alivio del dolor, si se usan durante un periodo de tiempo prolongado, pueden provocar efectos secundarios como úlceras pépticas, edema de las extremidades inferiores, alteración de la función renal, etc. Por consiguiente, en la aplicación práctica los agentes no esteroideos están limitados.

25 Está extendido el uso de inyecciones de ácido hialurónico en el tratamiento de la osteoartritis, en el que una solución de inyección que contiene ácido hialurónico se inyecta directamente en la articulación para aliviar moderadamente la inflamación y el dolor de los pacientes. Aunque el mecanismo del ácido hialurónico sigue sin aclarar, se sabe que el ácido hialurónico puede servir como lubricante para ayudar en el movimiento de la articulación y mejorar al mismo tiempo la función de la articulación. Sin embargo, aunque el ácido hialurónico puede aliviar eficazmente el dolor, en
30 ocasiones provoca reacciones inflamatorias transitorias en un plazo de dos días a una semana desde de su entrada en el cuerpo humano e incluso da lugar a inflamación crónica (véase Leopold et al., *Increased frequency of acute local reaction to intra-articular hylan GF-20 (Synvisc)*) en pacientes que reciben más de un curso de tratamiento. *J Bone Joint Surg*, 2002; 84: 1619-23; Bemardeau et al., *Acute arthritis after intra-articular hyaluronate injection: onset of effusions without crystal. Ann Rheum Dis*, 2001; 60: 518-20; y Kroesen et al., *Induction of an acute attack of calcium pyrophosphate dihydrate arthritis by intra-articular injection of hylan G-F 20 (Synvisc). Clin Rheumatol*, 2000; 19: 147-9. Por tanto, el efecto antiinflamatorio de los productos de formulación de ácido hialurónico del mercado
35 actual no es ideal. Si se puede administrar ácido hialurónico a una dosificación más baja para proporcionar el efecto antiinflamatorio deseado, se pueden aliviar o evitar las posibles reacciones inflamatorias posteriores provocadas por el ácido hialurónico.

40 Se ha divulgado un procedimiento para mejorar la formulación de ácido hialurónico (véase Homma et al., *Novel hyaluronic acid-methotrexate conjugates for osteoarthritis treatment, Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17 (2009), 4647-4656). En este procedimiento, se enlaza el ácido hialurónico a metotrexato (MTX) con actividad antiinflamatoria por medio de un polipéptido para formar un conjugado usando un planteamiento de síntesis química y el producto resultante tiene un efecto antiinflamatorio mejorado. No obstante, de acuerdo con la divulgación de este documento, una mezcla formada simplemente mezclando ácido hialurónico y MTX no puede proporcionar el efecto de mejora; en
45 otras palabras, es necesaria la síntesis del conjugado. Sin embargo, la preparación del conjugado requiere el uso de materiales polipeptídicos e implica etapas de síntesis complicadas, que aumentarán el coste de fabricación de una formulación de ácido hialurónico. Por tanto, este procedimiento no solo presenta dificultades en la producción en masa, sino que también aumenta la carga económica de los usuarios y es bastante limitado en la aplicación clínica. Por lo tanto, en el mercado sigue existiendo la necesidad de proporcionar un medicamento o un procedimiento que
50 pueda mejorar eficazmente la actividad antiinflamatoria del ácido hialurónico y que sea sencillo y conveniente en términos del proceso de fabricación.

La presente invención es un logro en investigación para la demanda anterior. Los autores de la presente invención descubrieron que una combinación de un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y ácido hialurónico tiene efecto antiinflamatorio mejorado, proporcionando así el efecto antiinflamatorio deseado a una
55 dosificación más baja de ácido hialurónico, tal como para aliviar o evitar las posibles reacciones inflamatorias provocadas por el ácido hialurónico.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para inhibir la inflamación, que comprende (a) ácido hialurónico, (b) un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para inhibir la inflamación en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una composición que comprende ácido hialurónico y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa.

10 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un kit para inhibir la inflamación, que comprende (i) una primera parte que comprende una cantidad eficaz de ácido hialurónico y (ii) una segunda parte que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa.

En los siguientes párrafos se describen la tecnología detallada y los modos de realización preferentes implementados para la presente invención acompañados por los dibujos adjuntos para que los expertos en este campo aprecien bien las características de la invención que se reivindica.

Breve descripción de los dibujos

15 La **FIG 1** es un gráfico de barras estadístico que muestra el nivel de expresión del mediador inflamatorio TNF- α en los sinoviocitos fibroblásticos (SF); y

La **FIG 2** es un gráfico de barras estadístico que muestra el nivel de expresión del mediador inflamatorio IL-8 en los SF.

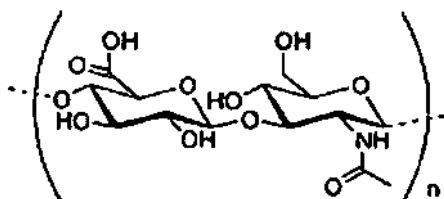
Descripción del modo de realización preferente

20 A menos que se indique lo contrario en el presente documento, se entenderá que los términos "un(a)", "el/la" o similares usados en esta memoria descriptiva (especialmente en las reivindicaciones que figuran más adelante en el presente documento) engloban tanto la forma singular como la forma plural.

25 Como se indica anteriormente, en ocasiones el ácido hialurónico puede provocar reacciones inflamatorias transitorias en un plazo de dos días a una semana desde su entrada en el cuerpo humano e incluso dar lugar a una inflamación crónica, influyendo así en el efecto antiinflamatorio del mismo. Por otro lado, el procedimiento preparando el conjugado de ácido hialurónico y MTX tiene muchos límites. La presente invención puede mejorar los inconvenientes de las formulaciones convencionales de ácido hialurónico con un planteamiento sencillo combinando ácido hialurónico y un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa.

30 Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la inflamación, que comprende (a) ácido hialurónico y (b) un inhibidor de la HMG-CoA reductasa.

35 El ácido hialurónico es uno de los principales componentes que constituyen la matriz extracelular y está presente ampliamente en el tejido endotelial, el tejido conjuntivo, el tejido epidérmico y el tejido nervioso y es importante para la actividad fisiológica de las células, como la proliferación, la migración, etc. Además, debido a que el ácido hialurónico es un componente humidificador importante de la dermis de la piel y tiene una viscosidad y elasticidad excelentes, es un relleno ideal y se usa habitualmente en productos cosméticos y en cirugía plástica. El ácido hialurónico es un glucosaminoglucono que no contiene azufre, cuya estructura básica es un polisacárido grande que consiste en dos unidades de azúcar, ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina y que tiene una fórmula química de la siguiente fórmula (I):



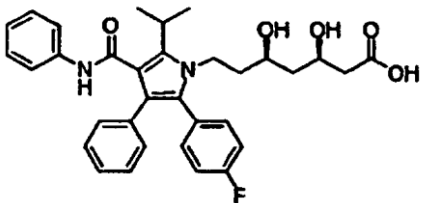
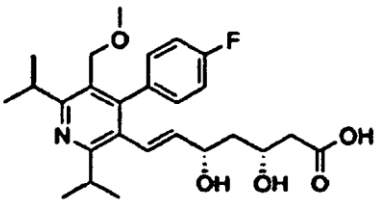
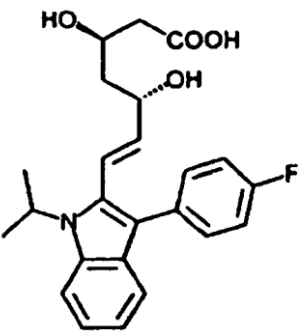
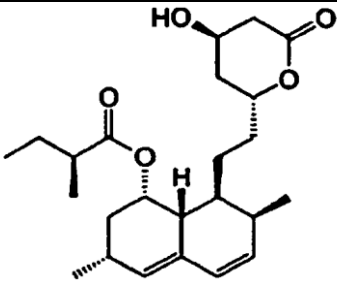
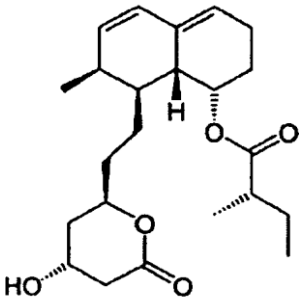
(I).

40 No existe un límite en particular para el ácido hialurónico usado en la composición farmacéutica de la presente invención. No obstante, el ácido hialurónico, como componente (a) en la composición farmacéutica de la presente invención, preferentemente tiene un peso molecular promedio que va desde aproximadamente 300.000 hasta aproximadamente 6.000.000 dalton y más preferentemente tiene un peso molecular promedio que va desde aproximadamente 500.000 hasta aproximadamente 3.000.000 dalton.

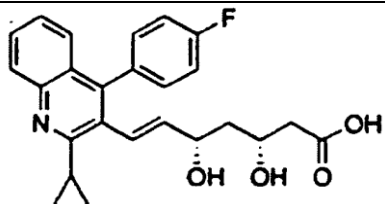
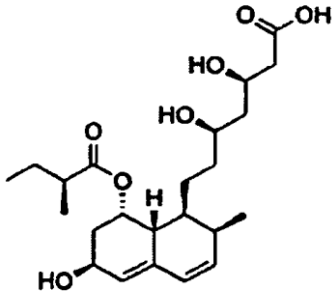
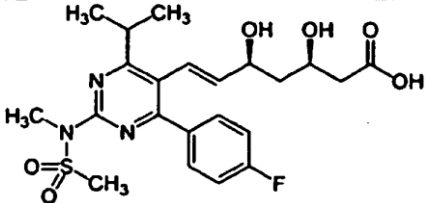
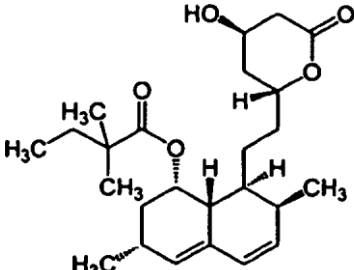
5

El componente (b) en la composición farmacéutica de la presente invención es un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa (en lo sucesivo denominado inhibidor de la "HMG-CoA" reductasa). El inhibidor de la HMG-CoA reductasa puede ser, por ejemplo, de un tipo de agentes para reducir los lípidos de la sangre llamados "estatinas" (véase AKASAKI Y et al., Mevastatin reduces cartilage degradation in rabbit experimental osteoarthritis through inhibition of synovial inflammation, *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 17, n.º: 2, 1 de febrero de 2009 (1-2-2009), páginas 235-243). Los ejemplos de las estatinas incluyen compuestos que se enumeran en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Nombre	Fórmula	Nombre comercial
Atorvastatina		Lipitor o Torvast
Cerivastatina		Lipobay o Baycol
Fluvastatina		Lescol o Lescol XL
Lovastatina		Mevacor, Altacor o Altoprev
Mevastatina		Ninguno

(continuación)

Nombre	Fórmula	Nombre comercial
Pitavastatina		Livalo o Pitava
Pravastatina		Pravachol, Selektine o Lipostat
Rosuvastatina		Crestor
Simvastatina		Zocor o Lipex

Por tanto, los inhibidores de la HMG-CoA reductasa adecuados como componente (b) de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden seleccionar de un grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina y combinaciones de los mismos. Preferentemente el componente (b) es lovastatina. Como se muestra en los ejemplos siguientes, aunque el uso de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa individualmente puede exacerbar la inflamación, si se usa un inhibidor de la HMG-CoA reductasa junto con ácido hialurónico, sorprendentemente, se puede potenciar el efecto antiinflamatorio del ácido hialurónico.

- 5
- 10 En la composición farmacéutica de la presente invención, no existe un límite en particular para la proporción del contenido en componente (a) frente a componente (b). En general, el contenido en componente (a) es del 80 % en peso al 99,9 % en peso y el contenido en componente (b) es del 0,1 % en peso al 20 % en peso, en base al peso total de los componentes (a) y (b). Preferentemente, el contenido en componente (a) es del 85 % en peso al 99,5 % en peso y el contenido en componente (b) es del 0,5 % en peso al 15 % en peso, en base al peso total de los componentes (a) y (b).
- 15

La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar en medicina veterinaria y humana y puede estar en cualquier forma y administrarse de cualesquiera maneras apropiadas. Por ejemplo, pero sin limitación, se puede administrar la composición farmacéutica por administración oral e inyección subcutánea, intravenosa o intraarticular, etc. Puede estar contenido en la composición farmacéutica de la presente invención un vehículo farmacéuticamente aceptable como componente (c), dependiendo de la forma de administración o de la aplicación de la composición farmacéutica.

20

Tomando como un ejemplo un medicamento adecuado para administración oral, se pueden incorporar en la

composición farmacéutica de la presente invención vehículos farmacéuticamente aceptables que no afecten de forma perjudicial la actividad del ácido hialurónico y de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, por ejemplo, un disolvente, un disolvente oleoso, un diluyente, un estabilizante, un retardante de la absorción, un disgregante, un emulsionante, un antioxidante, un aglutinante, un lubricante, un absorbente de humedad, o similares. Por ejemplo, el disolvente se puede seleccionar de un grupo que consiste en agua y soluciones de sacarosa; el diluyente se puede seleccionar de un grupo que consiste en lactosa, almidón y celulosa microcristalina; el retardante de la absorción se puede seleccionar de un grupo que consiste en quitosano y glucosaminoglucanos; el lubricante puede ser carbonato de magnesio; el disolvente oleoso se puede seleccionar de un grupo que consiste en aceites vegetales y aceites animales, tales como aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de bacalao, etc. Mediante el uso de cualquier procedimiento convencional adecuado, se puede formular la composición de la presente invención en una forma adecuada para administración oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, extractos líquidos, soluciones, jarabes, suspensiones, emulsiones, tinturas, etc.

Cuando se desea una forma de medicamento adecuada para inyección subcutánea, intravenosa o intraarticular, se pueden incorporar en la composición farmacéutica de la presente invención uno o más componentes, tales como una solución isotónica, una solución tampón salina (p. ej., una solución tampón de fosfato o una solución tampón de citrato), un solubilizante, un emulsionante, otros vehículos o similares, para preparar una inyección de líquido intravenosa, una inyección de emulsión intravenosa, una inyección de polvo seco, una inyección de suspensión, una inyección de suspensión de polvo seco, o similares. Los disolventes que se pueden adoptar incluyen, por ejemplo, agua, solución salina normal, alcoholes (p. ej., etilenglicol, propanol, glicerina, etc.), soluciones de azúcares (p. ej., soluciones de glucosa o soluciones de manosa) o combinaciones de los mismos.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender opcionalmente además aditivos tales como un agente aromatizante, un tóner de color, un agente colorante y similares para mejorar la sensación en la boca y la experiencia visual cuando se toma el medicamento resultante; asimismo, se puede añadir un conservante, un antiséptico un antibiótico (tal como alcohol bencílico), un antimicótico o similar en una cantidad razonable para mejorar la capacidad de almacenamiento del medicamento resultante.

Además, en la composición farmacéutica de la presente invención se pueden incorporar opcionalmente uno o más componentes activos diferentes para potenciar adicionalmente la eficacia de la composición o para aumentar la flexibilidad para fabricar formulaciones. Por ejemplo, en la composición farmacéutica de la presente invención pueden estar contenidos uno o más de los siguientes componentes activos: agentes antiinflamatorios esteroideos, agentes antiinflamatorios no esteroideos y glucosamina así como otros componentes activos, con la condición de que el/los otro(s) componente(s) activo(s) no afecten de forma perjudicial a la eficacia del ácido hialurónico y los inhibidores de la HMG-CoA reductasa.

Debido a que la composición farmacéutica de la presente invención puede promover el efecto antiinflamatorio del ácido hialurónico, se puede usar para inhibir la inflamación, en especial se puede usar para inhibir la artritis, incluida la osteoartritis (artritis degenerativa), la artritis reumatoide (AR), la artritis gotosa, la artritis bacteriana, la espondilitis anquilosante, el lupus eritematoso, etc. Preferentemente, la composición farmacéutica es útil para inhibir la osteoartritis y la artritis reumatoide. En un modo de realización, la composición farmacéutica de la presente invención se prepara en forma de una inyección para el tratamiento de inyección intraarticular.

En comparación con las formulaciones convencionales de ácido hialurónico, que no pueden tratar eficazmente la artritis reumatoide, una de las ventajas de la composición farmacéutica de la presente invención es que la composición de la presente invención puede proporcionar un efecto excelente de inhibición de la artritis reumatoide y por tanto se puede usar especialmente en el tratamiento de la artritis reumatoide. Además, la presente invención es diferente de la combinación conocida de ácido hialurónico y MTX, que requiere un planteamiento complicado y el uso de polipéptidos para formar el conjugado para proporcionar un efecto antiinflamatorio deseado. En la composición farmacéutica de la presente invención, solamente se necesita una mezcla sencilla de mezclar ácido hialurónico y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y por tanto la presente invención tiene ventajas como preparación fácil y producción en masa.

Debido a que la composición farmacéutica de la presente invención puede mejorar los inconvenientes de las formulaciones convencionales de ácido hialurónico, también se puede usar en cualesquiera aplicaciones conocidas de ácido hialurónico, no se limita a contra la artritis. Por ejemplo, la composición de la presente invención se puede aplicar en productos cosméticos o cirugía plástica; por ejemplo, se puede añadir en productos para el cuidado de la piel o en inyecciones faciales de ácido hialurónico.

La presente invención también proporciona un procedimiento para inhibir la inflamación en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una composición que comprende ácido hialurónico y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. El peso molecular promedio del ácido hialurónico, la especie del inhibidor de la HMG-CoA reductasa y la proporción del contenido de ácido hialurónico y del inhibidor de la HMG-CoA reductasa son según se definen anteriormente. En un modo de realización de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención, en forma de una inyección, se inyecta en la articulación de un sujeto para lograr el efecto de tratar la artritis.

Dependiendo de las exigencias del sujeto que recibe la administración, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar con diferentes frecuencias, tales como una vez al día, varias veces al día, una vez cada varios días, etc. Por ejemplo, cuando se usa en un cuerpo humano para tratar la artritis reumatoide, la composición se puede administrar en una cantidad, en base a los componentes (a) y (b), de 25 mg/kg de peso corporal al día a 50 mg/kg de peso corporal al día. En el presente documento, la unidad "mg/kg de peso corporal" se refiere a una cantidad de la composición que se va a administrar por kg de peso corporal. Sin embargo, para pacientes con afecciones agudas (p. ej., para pacientes con gota), se puede aumentar la cantidad de administración en varias veces o en varias decenas de veces dependiendo de las condiciones prácticas.

La presente invención también proporciona un kit para inhibir la inflamación. El kit comprende (i) una primera parte que comprende una cantidad eficaz de ácido hialurónico y (ii) una segunda parte que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa. El peso molecular promedio de ácido hialurónico, la especie del inhibidor de la HMG-CoA reductasa y la proporción ácido hialurónico e inhibidor de la HMG-CoA reductasa son según se definen anteriormente.

En el kit de la presente invención, la forma de la primera y la segunda parte no tiene límites en particular. Por ejemplo, para un kit útil para inyección intraarticular, la primera y la segunda parte pueden estar independientemente en forma de una solución y estar dispuestas por separado en envases esterilizados diferentes (p. ej., una botella de plástico o una botella de vidrio como una ampolla), en los que cada envase puede comprender una dosificación de administración múltiple, pero preferentemente, una dosificación de administración única, de la primera o la segunda parte. En el presente documento, el kit de la presente invención puede comprender además una jeringuilla de inyección (p. ej., una jeringuilla de inyección desechable), u opcionalmente comprender además un manual de instrucciones. Cuando se lleva a cabo la inyección intraarticular, las dos partes se pueden cargar en la jeringuilla de inyección para administrar el medicamento de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual de instrucciones (incluyendo la información tal como el procedimiento de funcionamiento del kit, la proporción para mezclar las soluciones, etc.).

En otro aspecto, para un kit útil para administración oral, la primera y la segunda parte pueden estar independientemente en forma de un comprimido, cápsula o gránulos y las dos partes pueden estar dispuestas por separado en envases diferentes con una dosificación de administración múltiple o una dosificación de administración única. En el presente documento opcionalmente el kit de la presente invención puede comprender un manual de instrucciones. Cuando se lleva a cabo una administración oral, se pueden administrar las dos partes en combinación de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual de instrucciones (que incluye la información tal como el intervalo de tiempo de administración, sugerencias de dosificación, etc.).

A continuación en el presente documento, se ilustrará con más detalle la presente invención con referencia a los ejemplos siguientes. No obstante, estos ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos, no para limitar el alcance de la presente invención.

[Ejemplo de preparación] Preparación de una solución de inyección de ácido hialurónico para administración intraarticular

En un inyector de ácido hialurónico (adquirido de Ocean Bright, Co., Ltd., Taiwan), se añadió 1 ml de una solución isotónica y la solución contenía 5 a 20 mg de ácido hialurónico (el peso molecular promedio: de 600.000 a 800.000 dalton; adquirida de Ocean Bright, Co., Ltd., Taiwan) y 0,5 a 1,2 mg de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (lovastatina, M2147, adquirida de Sigma-Aldrich Co.) como componentes principales y se añadieron 5 a 20 mg de NaCl, NaHSO₄, NaH₂SO₄ y agua para inyección a la solución como excipientes, preparando así una solución de inyección de ácido hialurónico para administración intraarticular.

[Ejemplo 1] Ensayo celular para la solución de inyección de ácido hialurónico

Experimento A. Cultivo celular

Se recogieron e incubaron sinoviocitos de tipo fibroblástico (FLS) de siete pacientes con artritis reumatoide (AR). En primer lugar, se cortaron las cápsulas sinoviales articulares de los pacientes en trozos pequeños y se suspendieron en un medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco, que comprendía 1,5 g/l de bicarbonato de sodio (S6297, Sigma-Aldrich Co. San Luis, MO, EE.UU.), penicilina-estreptomicina-neomicina al 1 % (P4083, Sigma-Aldrich Co.) y suero fetal bovino al 10 % (04-001-1 A, Biological Industries, Grand Island, Nueva York, EE.UU.)) y se incubaron en el entorno a 37 °C, CO₂ al 5 % durante tres días.

Se retiraron por lavado las células no adherentes con una solución tamponadora de fosfato (PBS), se renovó el medio y se cultivaron las células adherentes retenidas durante dos semanas. Se repitió el procedimiento anterior de tres a seis veces y las células retenidas eran FLS, que se usaron en los experimentos siguientes.

Experimento B. Tratamiento de las células

Se incubaron las FLS preparadas a partir del experimento A en un medio que no contenía suero durante 24 horas

hasta que las células crecieron hasta un estado de subconfluencia y se incubaron las células en un medio DMEM que contenía suero fetal bovino al 10 %. Después se dividieron las células en cuatro grupos: 1) un grupo de control, en el que las células no se trataron ni estimularon; 2) un grupo de AH, en el que las células se trataron solamente con ácido hialurónico (el peso molecular promedio: 600.000 a 800.000 dalton) durante 24 horas; 3) un grupo de inhibidor de la HMG-CoA reductasa, en el que las células se trataron solamente con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (lovastatina, M2147, Sigma-Aldrich Co.) durante 24 horas; y 4) un grupo de mezcla, en el que se mezclaron 100 µg de ácido hialurónico (el peso molecular promedio: 600.000 a 800.000 Dalton) y 5 micromoles de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (lovastatina) en una solución (1 ml) y se trataron las células con la mezcla resultante durante 24 horas.

Después, se recogieron y centrifugaron las células en los cuatro grupos anteriores respectivamente y se recogieron los sobrenadantes para llevar a cabo los ensayos siguientes.

Experimento C. Cuantificación de proteínas relacionadas con la AR

Se midieron las concentraciones de dos factores relacionados con la AR, el TNF-α (la muestra patrón se adquirió de eBioscience, Ltd., 88-7340) y la IL-8 (la muestra patrón se adquirió de R&D systems, Inc., EE.UU., DY208), en los sobrenadantes recogidos a partir del experimento B usando un kit de ensayo de proteínas de unión de tipo sándwich o kits de ELISA de tipo sándwich (adquiridos de eBioscience, Ltd. y de R&D systems, Inc.) de acuerdo con el manual del fabricante y con curvas estándar para observar el nivel de expresión de los factores, determinando de este modo el estado de inflamación de las células. Se analizó dos veces cada muestra y se usó un lector de ELISA (Sunrise Remote, TECAN) para realizar la medida. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3 y en las figuras 1 y 2.

Tabla 2. Concentración de TNF-α

Grupo	Grupo de control	Grupo de AH	Grupo de inhibidor de la HMG-CoA reductasa	Grupo de mezcla
Concentración promedio (pg/ml)	347,00	296,46	355,07	260,28

Tabla 3. Concentración de IL-8

Grupo	Grupo de control	Grupo de AH	Grupo de inhibidor de la HMG-CoA reductasa	Grupo de mezcla
Concentración promedio (pg/ml)	736,00	353,40	703,94	347,76

[Resultados del experimento]

Las tablas 2 y 3 y las figuras 1 y 2 muestran que las células articulares FLS de los pacientes con AR segregaban una gran cantidad de mediadores inflamatorios TNF-α e IL-8, lo que indica que el grado de inflamación era grave (como se muestra en el grupo de control). Sin embargo, cuando las células se trataron solamente con ácido hialurónico, el grado de inflamación disminuía. Además, si el inhibidor de la HMG-CoA reductasa y el ácido hialurónico se combinaban para tratar las células, se potenciaba adicionalmente el efecto de inhibir la inflamación del ácido hialurónico (como se muestra en el grupo de mezcla).

Como un resultado, los ejemplos anteriores indican que, en comparación con el tratamiento usando solamente ácido hialurónico, la combinación de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y ácido hialurónico es más eficaz para reducir la concentración de los mediadores inflamatorios TNF-α e IL-8. En otras palabras, combinar el inhibidor de la HMG-CoA reductasa y el ácido hialurónico tiene un efecto antiinflamatorio mejor que usar ácido hialurónico solamente. Este resultado demuestra que la composición farmacéutica de la presente invención puede potenciar el efecto antiinflamatorio del ácido hialurónico y que tiene un efecto mejor de inhibición de la inflamación para la artritis reumatoide.

La divulgación anterior se refiere a los contenidos técnicos detallados y a las características de invención de los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la inflamación, que comprende (a) ácido hialurónico, (b) un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, que comprende de aproximadamente el 80 % en peso a aproximadamente el 99,9 % en peso de ácido hialurónico y de aproximadamente el 0,1 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso del inhibidor de la HMG-CoA reductasa, en base al peso total de ácido hialurónico y del inhibidor de la HMG-CoA reductasa.
- 10 3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, que comprende de aproximadamente el 85 % en peso a aproximadamente el 99,5 % en peso de ácido hialurónico y de aproximadamente el 0,5 % en peso a aproximadamente el 15 % en peso del inhibidor de la HMG-CoA reductasa, en base al peso total de ácido hialurónico y del inhibidor de la HMG-CoA reductasa.
- 15 4. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio que va desde aproximadamente 300.000 hasta aproximadamente 6.000.000 dalton.
5. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en la que el ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio que va desde aproximadamente 500.000 hasta aproximadamente 3.000.000 dalton.
- 20 6. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa se selecciona de un grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina y combinaciones de las mismas.
7. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es lovastatina.
8. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es contra la artritis.
- 25 9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, que es contra la osteoartritis, contra la artritis reumatoide o contra la artritis gotosa.
10. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, que es contra la artritis reumatoide.
11. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que está en forma para administración oral, inyección subcutánea, inyección intravenosa o inyección intraarticular.
- 30 12. Un kit para su uso en la inhibición de la inflamación, que comprende(i) una primera parte que comprende una cantidad eficaz de ácido hialurónico y (ii) una segunda parte que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa.
13. El kit para su uso según la reivindicación 12, en el que la primera y la segunda parte están independientemente en forma de una solución para administración por inyección.
14. El kit para su uso según la reivindicación 13, que comprende además una jeringuilla de inyección.
- 35 15. El kit para su uso según la reivindicación 12, en el que la primera y segunda parte están independientemente en forma de un comprimido, cápsula o gránulos.

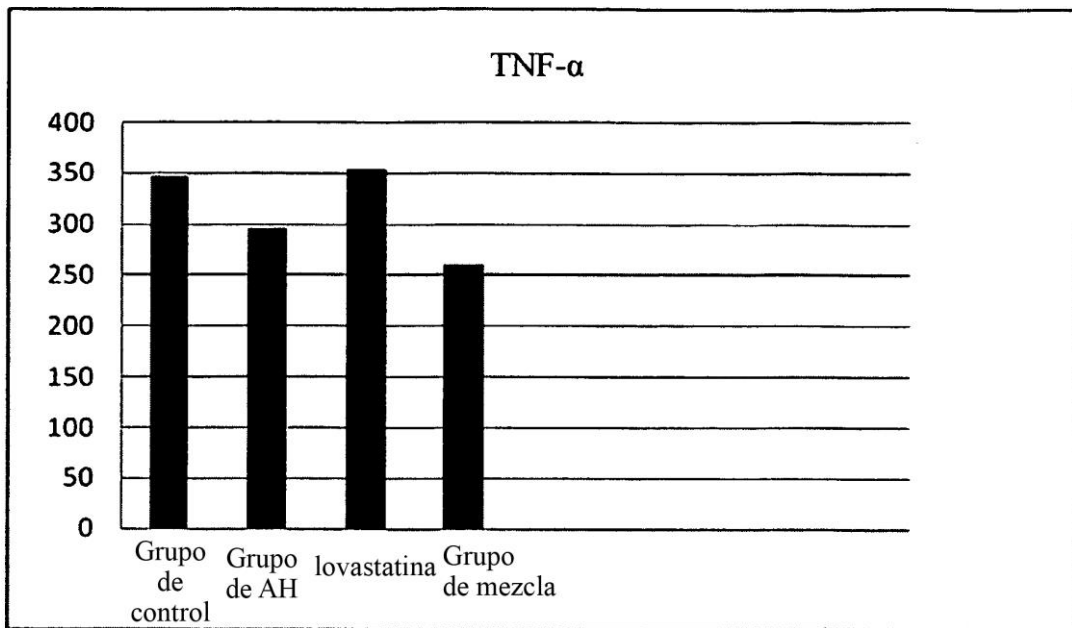


FIG. 1

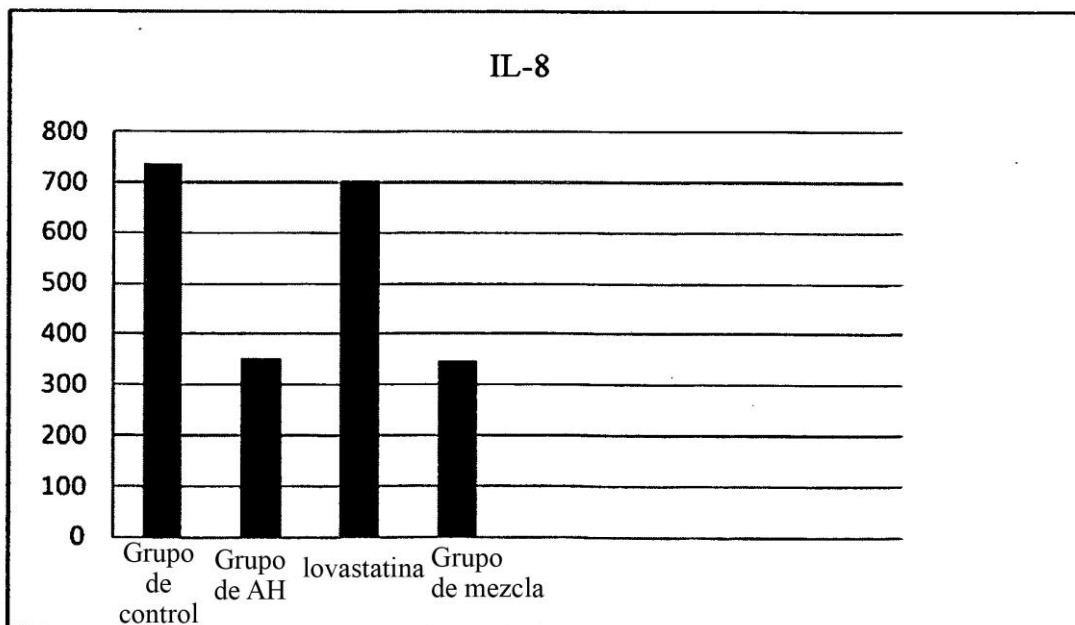


FIG. 2