

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 088**

51 Int. Cl.:

A61K 31/185 (2006.01)
C07C 61/29 (2006.01)
C07J 63/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2009 E 09700319 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2231139**

54 Título: **Formulaciones terapéuticas basadas en ácido asiático y sales seleccionadas del mismo**

30 Prioridad:

11.01.2008 US 6432 P

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

05.05.2015

73 Titular/es:

**SHANGHAI INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL
INDUSTRY (100.0%)
NO. 1320 WEST BEIJING ROAD
SHANGHAI 200040, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, YING;
LIU, QUANHAI;
QIN, YAN;
WU, TONG;
XU, ZHIRU;
LIU, MIN-YU;
LI, FEI;
LI, YAN y
NEWMAN, MICHAEL J.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 535 088 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

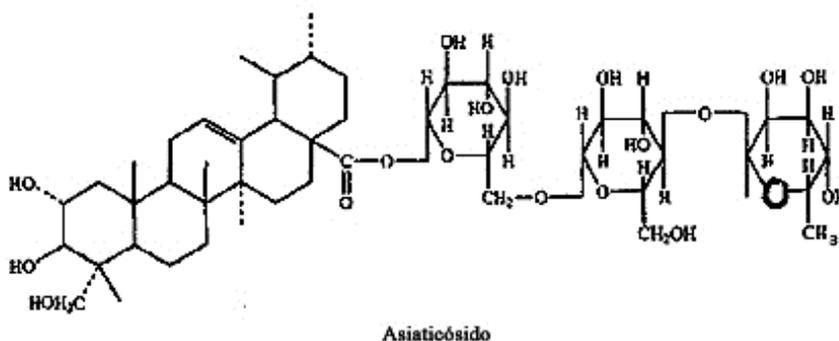
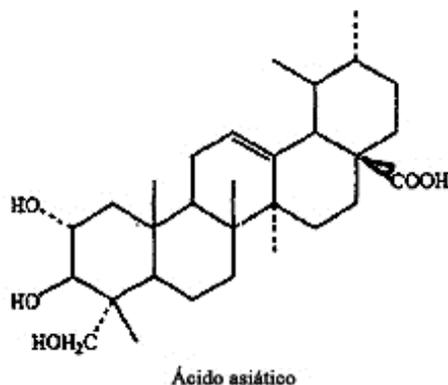
Formulaciones terapéuticas basadas en ácido asiático y sales seleccionadas del mismo

5 REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente US nº 61/006.432, presentada el 11 de enero de 2008, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Tal como informa Bontems, Bull. Sci. Pharmacol. 49: 186-91, 1941, el ácido asiático y su trisacárido asiaticósido, pueden extraerse de *Centella asiatica*, una planta anual herbácea de pequeño tamaño nativa de la cuenca asiática del Pacífico, que es un miembro de la familia de la zanahoria y el eneldo, *Apiaceae*. A continuación se muestran las estructuras químicas del ácido asiático y el asiaticósido:



Ver Polonsky, Compt. Rend. 232: 1878-80, 1951, y Bull. Soc. Chim. 173-80, 1953.

20 El control de las cicatrices en la piel y las úlceras crónicas ilustra los usos conocidos de los extractos de *C. asiatica* que contienen ácido asiático y asiaticósido. Análogamente, la literatura da a conocer también la utilización de extractos de *C. asiatica* en el tratamiento de la deformidad de la piel asociada a la tuberculosis y la lepra. Por ejemplo, ver Boiteau *et al.*, Bull. Soc. Chim. 31: 46-51, 1949.

25 Para dicha cicatrización de heridas, se ha asociado el modo farmacológico de acción a la inducción de la queratinización, ver May, Eur. J. Pharmacol. 4: 331-39, 1968, particularmente a través de la inducción de la proliferación de fibroblastos de la piel y la síntesis de componentes de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno I. Por ejemplo ver Lu *et al.*, Int'l J. Dermatol. 43: 801-07, 2004; Skukla *et al.*, J. Ethnopharmacol. 65: 1-11, 1999. Según Bonte *et al.*, Planta Med. 60: 133-35, 1994, una comparación entre el asiaticósido y el ácido indica que las fracciones sacáridas del primero aparentemente resultan innecesarias para dicha actividad biológica. Tal como se
30 comenta en Grimaldi *et al.*, J. Ethnopharmacol. 28: 235-41, 1990, además, el asiaticósido es completamente convertido en ácido asiático plasmático tras la administración oral en sujetos humanos.

35 El conocimiento de estas propiedades de cicatrización de heridas se utilizado en propuestas, en la patente US nº 5.834.437, de agentes dermatológicos que incluyen ácido asiático o uno de sus derivados. Ver también la patente US nº 6.417.349, en la que se informa de un efecto paliativo, en un modelo animal de fibrosis hepático, que se

consigue mediante la administración por vía peritoneal de un extracto soluble en agua de asiaticósido y madecasósido, un compuesto relacionado también producido por *C. asiatic a*. Además de las propiedades de cicatrización de heridas y antifibrótica, el asiaticósido administrado por vía oral se ha informado que reduce los niveles de células del bazo y de moléculas inflamatorias, incluyendo COX-2, PGE2, FNT-alfa e IL-6, con la resultante inhibición o reducción de múltiples parámetros de la artritis, tales como la hinchazón de patas, la puntuación de artritis y la hiperplasia sinovial en un modelo estándar de roedor de artritis (inducida con colágeno). Ver Li *et al.*, Yao Xue Xue Bao (Acta Pharma. Sinica) 42: 698-703, 2007.

Aunque estas exposiciones y otras implican un potencial terapéutico para el ácido asiático y el asiaticósido, la materialización de su potencial se ha visto perjudicada por el hecho de que la extracción de cualquiera de estos compuestos ha demostrado ser difícil, con rendimientos relativamente pobres y una baja pureza. Además, se conoce poco sobre la producción de sales de ácido asiático para la utilización en composiciones terapéuticas. La patente estadounidense nº 6.891.063 describe determinadas sales de ácido asiático, principalmente con un catión amonio, que se afirma que resultan adecuadas para el tratamiento tópico.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una sal producida a partir de ácido asiático de alta pureza. La sal es una sal potásica o una sal trometamol preferentemente con una pureza de 98%. La presente invención proporciona una forma de administración sólida que comprende una o más cualesquiera de las sales anteriormente indicadas.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición terapéutica que es el producto de un procedimiento que comprende formular una sal de ácido asiático de alta pureza de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable con el fin de proporcionar una forma de administración que consiste esencialmente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal de ácido asiático.

Según un aspecto adicional, la presente invención proporciona dichos productos para la utilización en una metodología para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad fibrótica. La metodología comprende administrar en un sujeto que sufre o que presenta un riesgo de sufrir dicha enfermedad, una composición terapéutica tal como se ha indicado anteriormente. En el presente contexto es ejemplar de la enfermedad fibrótica, neumonitis y fibrosis inducidas por radiación, fibrosis pulmonar idiopática, nefropatía diabética y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En todavía otro aspecto de la invención, se proporcionan las sales anteriormente indicadas para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad inflamatoria, que comprende la administración en un sujeto que sufre o que presenta el riesgo de sufrir dicha enfermedad, una composición terapéutica tal como se ha indicado anteriormente. A este respecto, la categoría de enfermedad inflamatoria se ilustra con la artritis, la enfermedad intestinal inflamatoria y la soriasis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los trazados superpuestos de HPLC de materia de partida de ácido asiático y las sales producidas.

La figura 2 muestra el análisis espectroscópico de RMN-¹H en DMSO-d₆ de ácido asiático lote nº 071109 y sal sódica nº AJF09.99b, a 300 MHz.

La figura 3 muestra el análisis espectroscópico de RMN-¹³C en DMSO-d₆ de ácido asiático lote nº 071109 y sal sódica nº AJF09.99b, a 300 MHz.

La figura 4 muestra el análisis espectroscópico de RMN-¹³C en DMSO-d₆ de ácido asiático lote nº 071109 y sal sódica nº AJF09.99b, a 300 MHz, de 11 ppm a 41 ppm.

La figura 4a muestra el espectro de RMN-¹H completo del ácido asiático en DMSO-d₆.

La figura 4b muestra una vista ampliada del espectro de RMN-¹H del ácido asiático.

La figura 4c muestra el espectro de RMN-¹H completo de la sal sódica del ácido asiático (nº AJF09.99b).

La figura 4d muestra una vista ampliada del espectro de RMN-¹H del ácido asiático.

La figura 4e muestra el espectro de RMN-¹³C del ácido asiático en DMSO-d₆.

La figura 4f muestra una vista ampliada del espectro de RMN-¹³C del ácido asiático.

La figura 4g muestra el espectro de RMN-¹³C completo de la sal sódica del ácido asiático en DMSO-d₆.

La figura 4h muestra una vista ampliada del espectro de RMN-¹³C de la sal sódica del ácido asiático.

La figura 5a muestra el PXRd del ácido asiático.

La figura 5b muestra el PXRd de una sal sódica del ácido asiático.

La figura 6 muestra el espectro de FTIR del ácido asiático.

La figura 7 muestra el espectro de FTIR de una sal sódica del ácido asiático (AJF09.82).

La figura 8 muestra el espectro de FTIR de una sal sódica del ácido asiático (AJF09.99b).

La figura 9 muestra el espectro de FTIR de una sal sódica del ácido asiático (AJF09.99a).

La figura 10 muestra el termograma de TGA del ácido asiático.

La figura 11 muestra el termograma de TGA de la sal sódica del ácido asiático AJF09.82.

La figura 12 muestra el termograma de TGA de la sal sódica del ácido asiático AJF09.99b.

La figura 13 ilustra una curva de linealidad estándar.

La figura 14 proporciona una representación esquemática de un procedimiento para la producción de asiaticósido.

5 La figura 15 proporciona una representación esquemática de un procedimiento para la producción de ácido asiático de grado farmacéutico.

La figura 16a muestra el espectro de RMN-¹H de la sal potásica del ácido asiático.

La figura 16b muestra el espectro de RMN-¹H de la sal trometamol del ácido asiático.

La figura 16c muestra el RMN-¹H de una sal sódica de ácido asiático-fosfonato sódico.

La figura 16d muestra el espectro de RMN-¹H del derivado triacetato-amida de ácido asiático.

10 La figura 17a muestra la espectroscopía de masas de una sal potásica del ácido asiático.

La figura 17b muestra la espectroscopía de masas de una sal trometamol del ácido asiático.

La figura 17c muestra la espectroscopía de masas de una sal sódica de ácido asiático-fosfonato sódico.

La figura 17d muestra la espectroscopía de masas del derivado triacetato-amida de ácido asiático.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

En la presente memoria se describe un protocolo fácilmente implementado para obtener tanto asiaticósido como ácido asiático de alta pureza, adecuado para el desarrollo farmacológico. Además, según la presente invención, los inventores han producido y caracterizado las sales anteriormente indicadas de ácido asiático que presentan las propiedades físicas necesarias para la formulación terapéutica, particularmente para tratar condiciones asociadas a inflamación y fibrosis.

I. Producción de ácido asiático de grado farmacéutico

25 A. Preparación de asiaticósido de 92% de pureza

El asiaticósido en bruto en polvo se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Guangxi Changzhou Natural product Co. Ltd. (www.changzhou-centella.com).

30 Al asiaticósido en bruto en polvo se añadió 4X EtOH al 60% (v/p). La mezcla se sometió a reflujo bajo calentamiento en un intervalo de temperaturas de entre aproximadamente 70°C y aproximadamente 90°C (por ejemplo 80°C) hasta la disolución del sólido. Se enfrió la solución y se introdujo en una sala fría a 5°C para la cristalización durante 16 horas. Se formó un precipitado amorfo y se separó mediante filtración. El precipitado recuperado se lavó con EtOH al 60% hasta que su color se tornó blanco. A continuación, el precipitado se secó en un horno en un intervalo de temperaturas de entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 70°C (por ejemplo 60°C) y a una presión reducida en un intervalo de entre aproximadamente -0,09 y -0,11 MPa, por ejemplo a -0,10 MPa.

40 Al precipitado seco se añadió 30X solución acuosa de acetona al 80% (v/p). La mezcla se sometió a reflujo bajo calentamiento durante 1 hora antes de la disolución del sólido. Se filtró la solución y se introdujo el filtrado en una sala fría a 10°C para la cristalización durante 24 horas. Se formó un precipitado amorfo y se separó mediante filtración. El precipitado recuperado se lavó con acetona al 80% hasta que su color se tornó blanco. Se secó el precipitado y el sólido seco se molió, rindiendo asiaticósido en polvo. La figura 14 muestra un resumen del procedimiento.

45 B. Preparación de ácido asiático de 98% de pureza

Se disolvieron en 8X de solución de NaOH al 4%/EtOH al 50% (1.600 ml) 200 gramos de asiaticósido en polvo tal como se ha indicado anteriormente (pureza de aproximadamente 92%). La solución resultante se sometió a reflujo durante aproximadamente 3 a 4 horas en un baño de agua a 80°C y después se enfrió hasta la temperatura ambiente o a una temperatura similar a la ambiente.

55 A continuación, se ajustó el pH de esta solución a un valor entre 4 y 5 mediante la adición de HCl diluido (prediluido 1~2 veces) gradualmente en porciones pequeñas (por ejemplo aproximadamente 10 ml cada vez) bajo agitación continua. Se obtuvo continuamente un precipitado en el procedimiento, formando finalmente una pasta pegajosa.

Esta pasta se introdujo en un embudo Buchner de 200 mm para la filtración de vacío a presión reducida. Se descartó el filtrado. El precipitado se lavó con agua bajo vacío hasta que el color del filtrado que salía era prácticamente incoloro. A continuación, el precipitado se lavó con EtOH al 30% hasta que el color del filtrado que salía era prácticamente incoloro. Se descartaron los filtrados de estos dos lavados.

60 Se añadió 8X de EtOH anhidro (v/p) (aproximadamente 1.600 ml) al precipitado y seguidamente la mezcla se sometió a reflujo bajo calentamiento en un baño de agua a 80°C hasta la disolución completa del precipitado. A continuación se añadió 2X carbón activo (aproximadamente 400 g) y la solución se sometió a reflujo continuamente durante 30 minutos adicionales. Se separó el carbón mediante filtración, mientras la solución se mantenía todavía caliente, con un embudo Buchner de 200 mm con filtración de vacío a una presión reducida. El carbón activo ya

utilizado se descartó. A continuación, se añadió al filtrado otro lote de carbón activo del mismo peso. La mezcla se sometió a reflujo durante 30 minutos adicionales y se filtró al vacío mientras todavía estaba caliente, con un embudo Buchner de 200 mm a una presión reducida.

5 Se enfrió el filtrado hasta la temperatura ambiente. Al filtrado se añadió agua en lotes, cada uno de aproximadamente 100 a 200 ml, hasta que ya no salía precipitado blanco adicional. El volumen de agua total necesario fue de aproximadamente 4.000 ml. A continuación se filtró al vacío la solución con un embudo Buchner de 200 mm a una presión reducida. Se descartó el filtrado. Seguidamente el sólido blanco en el embudo se secó y el sólido seco se molió, rindiendo un material de ácido asiático de 98% de pureza (p/p). La figura 15 muestra un resumen del procedimiento.

II. Actividad farmacológica del ácido asiático

15 El tratamiento con bleomicina de las ratas es el enfoque preferente para establecer un modelo animal de fibrosis. Tal como se describe en mayor detalle posteriormente, las composiciones de ácido asiático y asiaticósido de la presente invención incrementan significativamente la supervivencia de las ratas tratadas con bleomicina, con independencia de si el tratamiento se inicia un día o siete días después de la administración de la bleomicina. Éste es un resultado inesperado, a la luz del hecho de que la dexametasona, utilizada convencionalmente para tratar la fibrosis pulmonar, no incrementa significativamente la supervivencia de las ratas en este contexto.

20 Debido a que los efectos principales de la dexametosa se producen en rutas de inflamación, los resultados obtenidos con la presente invención indican que, además de los efectos de inhibición sobre los procesos inflamatorios, el ácido asiático y el asiaticósido también ejercen efectos sobre otras rutas que están relacionadas o que participan directamente en la fibrosis. Por ejemplo, según se ha determinado mediante histopatología pulmonar, el ácido asiático reduce el grado de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Resulta más eficaz que la dexametasona en el caso de que el tratamiento con ácido asiático o dexametasona se inicie siete días después del insulto de bleomicina, indicando que el ácido asiático no sólo se dirige al proceso inflamatorio sino que también presenta un efecto más directo que la dexametasona sobre la fibrosis.

30 Mucho mejor que la dexametosa, el ácido asiático y el asiaticósido reducen significativamente la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, medida mediante la proporción de peso pulmonar a peso corporal, con independencia de si el tratamiento se inicia un día o siete días después del insulto de bleomicina.

35 El ácido asiático y el asiaticósido también reducen significativamente la fibrosis inducida por bleomicina, medida por los niveles séricos de hidroxiprolina (precursor del colágeno) y de colágeno de tipo III. El impacto del ácido asiático en este contexto es tan bueno o ligeramente mejor que la dexametasona, con independencia de si el tratamiento se inicia un día o siete días después de la exposición a bleomicina.

40 El ácido asiático reduce significativamente los niveles séricos inducidos por bleomicina de las citoquinas mediadoras de fibrosis factor de crecimiento transformante beta (FCT- β) y factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), que es comparable a la dexametasona, con independencia de si el tratamiento se inicia un día o siete días después de la exposición a bleomicina.

III. Indicaciones terapéuticas y formulaciones

45 De esta manera, los resultados detallados en la presente descripción subrayan la utilidad del ácido asiático de grado farmacéutico y el asiaticósido de alta pureza para el tratamiento de un abanico de enfermedades asociadas a inflamación, así como las asociadas a la acumulación de fibroblastos y matriz ("enfermedades fibróticas"). Es ilustrativo de la clase de enfermedades inflamatorias, la soriasis, la enfermedad intestinal inflamatoria, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, y la artritis, incluyendo la artritis reumatoide, la osteoartritis y la artritis soriática. La progresión de estas enfermedades está marcada por una activación aberrante del sistema inmunológico y niveles elevados de moléculas inflamatorias, tales como COX-2 y determinadas citoquinas y prostaglandinas. Es ilustrativo de la clase de las enfermedades fibróticas, la neumonitis y fibrosis inducidas por radiación, la fibrosis pulmonar idiopática y la nefropatía diabética, la progresión de las cuales está marcada por la fibrosis renal.

55 En la presente memoria se describen composiciones terapéuticas preparadas mediante la formulación de ácido asiático o asiaticósido de alta pureza con otros componentes utilizados convencionalmente para producir un medicamento, especialmente para el uso interno. De esta manera, una composición terapéutica de la invención puede incluir uno o más portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tal como se describe en, por ejemplo, Remington - The Science and Practice of Pharmacy, 21a edición, 2005, con la condición de que el efecto antifibrótico del ácido asiático o asiaticósido de alta pureza no resulte adversamente afectado por el otro u otros componentes de la composición.

65 En parte como función del modo de administración deseado, podría formularse una composición terapéutica de la invención para inyección, tal como para la administración parenteral. Con este fin podría producirse la composición

terapéutica en forma de una solución acuosa, que comprende un tampón fisiológicamente aceptable, tal como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico.

5 Según la invención, una sal reivindicada del ácido asiático (ver la sección siguiente) se combinaría en un compuesto con una matriz sólida farmacéuticamente aceptable a fin de proporcionar una forma de dosificación sólida que resulte adecuada para la administración oral, bucal, sublingual, rectal o vaginal, entre otras. Según dicho aspecto de la invención, la composición terapéutica sería el producto de combinar una sal reivindicada de ácido asiático con uno o más excipientes sólidos, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando seguidamente la mezcla, posiblemente tras la adición de auxiliares adecuados, con el fin de obtener tabletas o núcleos de gragea. Los excipientes adecuados a este respecto con rellenos, tales como azúcares (lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, etc.) y preparaciones de celulosa, por ejemplo almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetil-celulosa (CMC) sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP: povidona). También puede añadirse un agente desintegrante, tal como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato sódico.

15 Se proporciona núcleos de gragea con recubrimientos adecuados. Con este fin pueden utilizarse soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol (PEG) y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Pueden añadirse tintes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de gragea para la identificación o para caracterizar diferentes dosis de combinaciones de compuesto activo.

20 Entre las composiciones terapéuticas de la invención que resultan adecuadas para la administración oral se encuentran las cápsulas de cierre a compresión ("push-fit") realizadas en gelatina, así como las cápsulas selladas blandas realizadas en gelatina, y un plastificador, tal como glicerol o sorbitol, para contener una formulación sólida producida con ácido asiático o asiaticósido de alta pureza. De acuerdo con la descripción anteriormente proporcionada, una cápsula push-fit a este respecto podría contener el componente activo mezclado con relleno, tal como lactosa; ligantes, tales como almidones, y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, opcionalmente con uno o más estabilizadores. En las cápsulas blandas, el componente activo podría encontrarse en solución o suspendido en un líquido adecuado, tal como un aceite graso, parafina líquida o polietilenglicol (PEG) líquido, nuevamente con la adición opcional de uno o más estabilizadores.

25 Otra manera de administrar una composición terapéutica de la presente invención es mediante inhalación o insuflado, que administra un agente terapéutico directamente en el tracto respiratorio. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.607.915 y las solicitudes publicadas de patente PCT nº WO 97/39745 y nº WO 99/47196. Con este fin la invención contempla una formulación líquida que resulta adecuada para la administración con un nebulizador, dispositivo de pulverización líquida o un dispositivo de aerosol electrohidrodinámico (EHD).

30 En una realización, dicha composición incluiría un portador farmacéuticamente aceptable que es un líquido, tal como un alcohol, agua, polietilenglicol o un perfluorocarburo. Opcionalmente, puede añadirse otro material para alterar las propiedades de aerosol de la solución o suspensión del ingrediente activo, tal como se describe en la presente memoria. Este otro material podría ser un líquido, tal como un alcohol, glicol, poliglicol o un ácido graso. Se encuentran disponibles otros enfoques para la formulación de una solución o suspensión líquida, según la invención, que resulta adecuada para la utilización en dispositivos de aerosol. Ver las patentes US nº 5.112.598 y nº 5.556.611.

35 40 45 Para la administración de una composición de la invención transportada por el aire, otro formato utiliza un portador de polvos secos, adecuados para un inhalador de polvos secos. Son ilustrativos de dichos portadores: los monosacáridos, tales como la fructosa, el manitol, la arabinosa, el xilitol y la dextrosa (glucosa) y sus nionohidratos; disacáridos, tales como la lactosa, la maltosa o la sacarosa, y polisacáridos, tales como los almidones, las dextrinas y los dextranos. Por ejemplo, una sal de ácido asiático de la invención podría formularse en unos polvos secos con uno o más de estos materiales portadores, utilizando un micronizador tal como se describe de manera general en la patente US nº 5.376.386.

IV. Producción y caracterización de sales de ácido asiático para la utilización farmacológica

55 En vista de la buena solubilidad del ácido asiático en metanol, la presente descripción contempla la formación de sales de ácido asiático, por ejemplo mediante la disolución del ácido en soluciones de hidróxido sódico metanólico, carbonato sódico metanólico y hidróxido amónico metanólico, respectivamente. La producción y caracterización de las sales de ácido asiático se describe en mayor detalle posteriormente.

60 *A. Cribado de sales para ácido asiático*

En vista de la buena solubilidad del ácido asiático en metanol (ver posteriormente), pueden formarse sales de ácido asiático mediante la disolución del ácido en soluciones de hidróxido sódico metanólico, carbonato sódico metanólico y hidróxido amónico metanólico, respectivamente.

1. Ácido asiático - carbonato sódico (AJF09, 82) (comparativo)

5 Se disolvió ácido asiático (0,992 g) en 27,5 ml de metanol. Se añadió carbonato sódico anhidro (2,0043 g) en la solución de metanol y se agitó vigorosamente. Se transfirió la solución de metanol-ácido asiático a un matraz de fondo redondo y se evaporó a sequedad. Se produjeron unos polvos blancos finos de sal sódica de ácido asiático y se secaron en un horno de vacío a 100°C durante 2 horas; se recuperó aproximadamente 1 g de muestra.

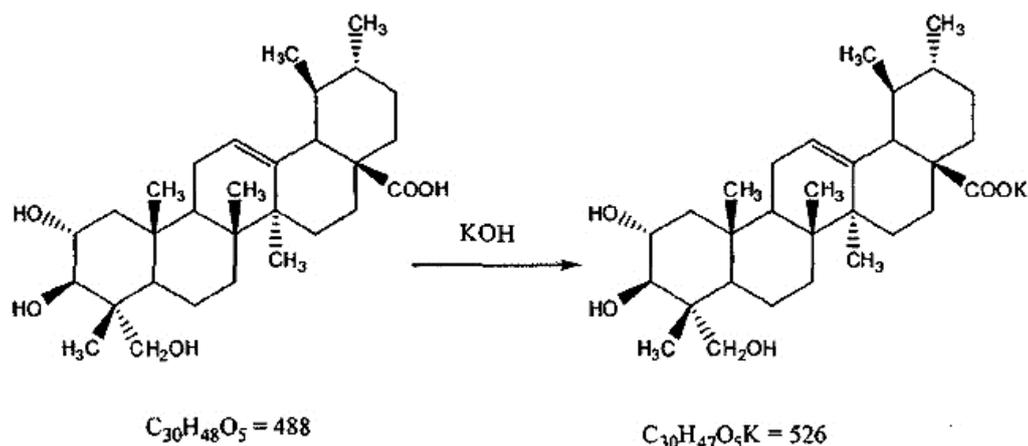
2. Ácido asiático en hidróxido amónico metanólico (AJF09, 99a) (comparativo)

10 Se añadieron gota a gota aproximadamente 6 ml de hidróxido amónico metanólico a 0,4923 g de ácido asiático. La mayoría de la muestra se había solubilizado y empezó a aparecer nuevo material escamoso. Se añadió 1 ml adicional de hidróxido amónico metanólico y la solución se dejó bajo agitación durante la noche. Se formó un precipitado y se recogió mediante filtración y se recuperaron 0,0741 g de sal amónica de ácido asiático.

15 3. Ácido asiático en hidróxido sódico metanólico (AJF09, 99b) (comparativo)

20 Se disolvió ácido asiático (0,4961 g) en 7,0 ml de hidróxido sódico metanólico 0,2 M. Tras la disolución total, se añadió gota a gota solución saturada de cloruro sódico hasta enturbiarse la solución y producirse la precipitación. Se añadió agua desionizada (7,0 ml) para disolver cualquier NaCl presente. Se recogió precipitado mediante filtración y se secó en un horno de vacío a 100°C durante 2 horas; se recuperaron 0,4938 g de sal sódica de ácido asiático.

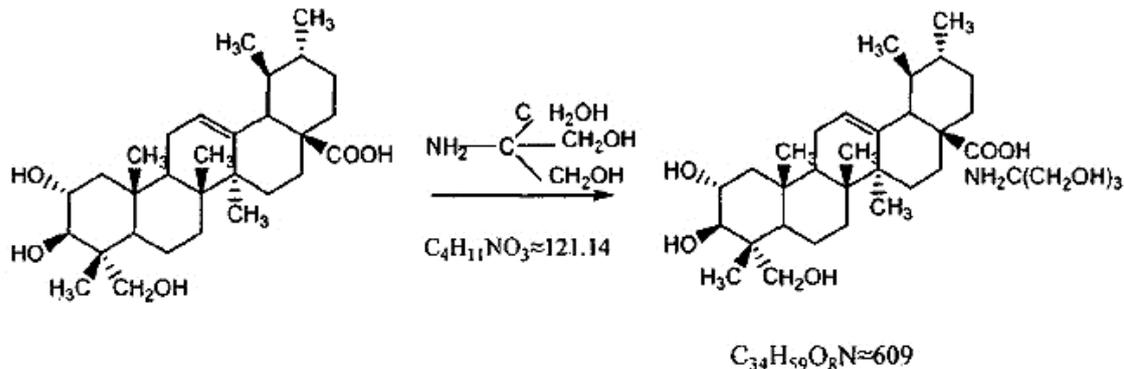
4. Sal potásica de ácido asiático (invención)



25 Con referencia al Esquema 4, anteriormente, se añadió ácido asiático, 4 g (8,196 mmoles) a metanol (30 ml). Se calentó la mezcla para la disolución. A la solución se añadió una solución preparada a partir de KOH, 0,56 g (8,187 mmoles), y 20 ml de metanol, hasta alcanzar un pH de 8-9. A continuación, se decoloró la solución resultante con carbón activo y se concentró. A la solución concentrada se añadió una cantidad suficiente de acetona para homogeneizar y se enfrió la solución. Se formó un precipitado y se separó mediante filtración, rindiendo 3,5 g de sal potásica de ácido asiático en forma de cristales blanquecinos. La figura 16a muestra la RMN-¹H del producto. La figura 17a muestra la espectroscopía de masas del producto.

30

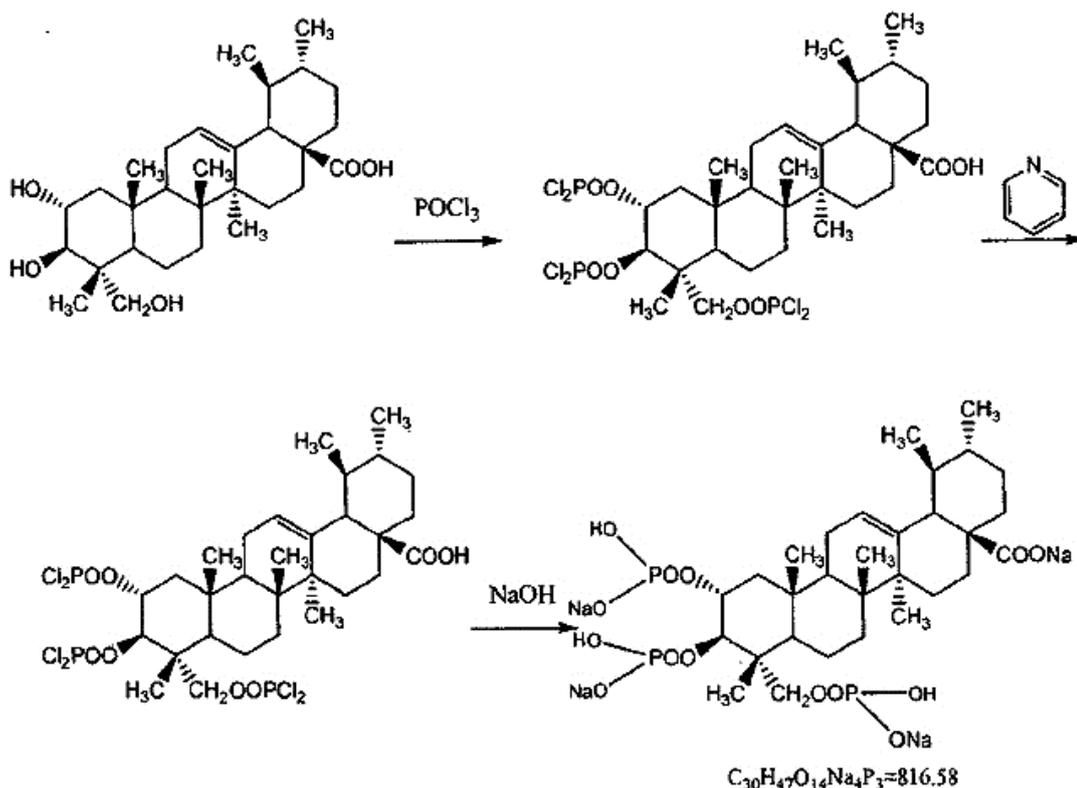
5. Sal trometamol de ácido asiático (invención)



35 Con referencia al Esquema 5, anteriormente, se añadió ácido asiático, 2g (4,09 mmoles) y 0,59 g (4,623 mmoles) trihidroximetilaminometano (trometamina) a metanol (30 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24

5 horas y se sometió a reflujo durante 0,5 horas. Se concentró la solución, a la que se añadió una pequeña cantidad de agua. Se formó un precipitado que después se separó mediante filtración. La torta de filtración se introdujo en metanol para disolverla con calor. La solución resultante se filtró para eliminar las sustancias insolubles y después se concentró. A la solución concentrada se añadió una cantidad suficiente de acetona para homogeneizarla. Se enfrió la solución. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración y se secó a 50°C, rindiendo 1,5 g de sal trometamol de ácido asiático en forma de un sólido beige. La figura 16b muestra la RMN-¹H del producto. La figura 17b muestra la espectroscopía de masas del producto.

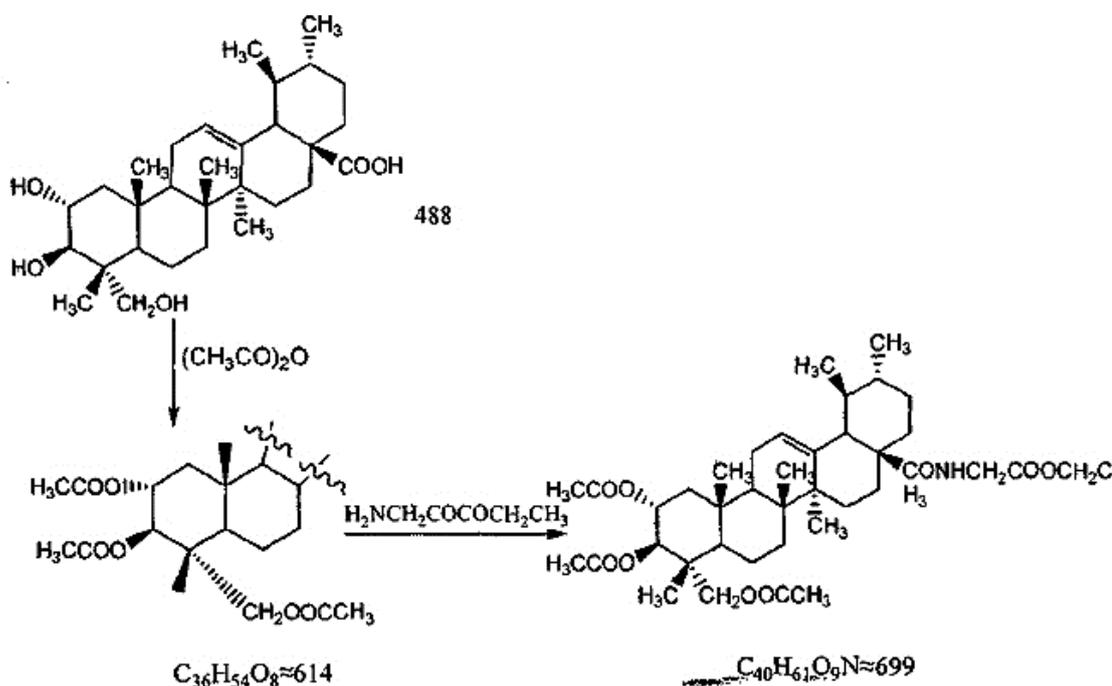
6. Sal sódica-fosfonato sódico de ácido asiático (comparativo)



10 En referencia a la primera etapa del Esquema 6, anteriormente, se enfrió piridina (12 ml) con agua salada helada a -10°C, a la que se añadieron 2,2 g de hidróxido de fosfonio (0,01435 moles) en gotas. Dos minutos después se añadió una solución de 2 g de ácido asiático (0,004098 moles) y piridina (6 ml) en gotas. La mezcla se agitó para la reacción durante 1,5 horas. A la mezcla de reacción se añadieron lentamente 40 ml de agua helada. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se evaporó la mayor parte del solvente, proporcionando un sólido que se secó bajo presión reducida. Se añadió el sólido a HCl 4 N (20 ml), precipitando un material gelatinoso, que se separó mediante filtración. La torta de filtración se lavó con agua, rindiendo un producto en bruto. El producto en bruto se disolvió en metanol. Se decoloró la solución con carbón activo y se concentró. A la solución concentrada se añadió una cantidad suficiente de acetona para homogeneizarla. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración, rindiendo un éster de fosfato de tipo gelatinoso.

25 En referencia a la última etapa del Esquema 6, el producto en bruto anteriormente indicado se disolvió en metanol. A la solución se añadió una solución en metanol de hidróxido sódico 1N hasta alcanzar un pH de 8-9. Se decoloró la solución con carbón activo y se concentró. A la solución concentrada se añadió una cantidad suficiente de acetona para homogeneizarla. Se enfrió la solución. Se formó un precipitado, que se filtró y se secó a 50°C, proporcionando 2,2 g de sal sódica-fosfonato sódico de ácido asiático en forma de un sólido beige. La figura 16c muestra la RMN-¹H del producto. La figura 17c muestra la espectroscopía de masas del producto.

7. Derivado triacetato-amida de ácido asiático (comparativo)



En referencia a la primera etapa del Esquema 7, anteriormente, se disolvió ácido asiático (5 g) en piridina (10 ml) bajo agitación. La solución se enfrió a 10°C y se añadieron 15 ml de anhídrido acético. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas y después se añadieron 200 ml de agua helada. Se formó un precipitado, que se separó mediante filtración y se lavó con agua y después se secó a 50°C, rindiendo 6,28 g de triacetato de ácido asiático en forma de unos polvos blancos.

En referencia a la segunda etapa del Esquema 7, se añadieron 6,5 g de triacetato de ácido asiático (0,01058 moles) a 100 ml de diclorometano. La solución se enfrió con agua helada y después se añadieron 1,2 g de trietilamina (0,01186 moles), 1,55 g de hidrócloruro de etilglicinato (0,0111 moles) y 0,2 g de 4-dimetilamino-piridina (0,00164 moles). La mezcla se agitó a 0-5°C durante 0,5 horas. A la mezcla se añadió una solución de DCC 2,37 g (0,0115 moles) y diclorometano (50 ml) en gotas durante 0,5 horas. La reacción se agitó a 0-5°C durante 2 horas y después se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas. Se separó el sólido mediante filtración. El filtrado se lavó con HCl 1 N, con solución saturada de NaHCO₃ y después con agua hasta pH neutro. Se evaporó el solvente bajo presión reducida, rindiendo 9 g de derivado triacetato-amida de ácido asiático en forma de un material de tipo gelatinoso.

El producto de tipo gelatinoso en bruto se introdujo en una columna de gel de sílice y se eluyó con diclorometano+acetona (20:1). Se recogió la fracción de producto y se concentró. Se separó el sólido mediante filtración y el filtrado se secó al vacío, rindiendo 2,82 g de cristales blancos. La figura 16 muestra la RMN-¹H del producto. La figura 17d muestra la espectroscopía de masas del producto.

B. Análisis de HPLC de las sales de ácido asiático

Determinadas sales de ácido asiático, producidas tal como se ha indicado anteriormente, se sometieron a análisis de HPLC.

Preparación estándar

Se transfirieron aproximadamente 5 mg de ácido asiático a un matraz volumétrico de 25 ml y se añadió 1 ml de metanol y se mezcló bien, hasta la disolución del ácido en el metanol. A continuación, se llevó el matraz volumétrico a volumen con fase móvil y se mezcló bien.

Parámetros cromatográficos

Columna:	Agilent, Zorbax Eclipse XDBC8, 250 mm x 4,6 mm
Fase móvil:	KH ₂ PO ₄ (3 g/l) pH 2,5 / Acetonitrilo (55:45)
Caudal:	1,0 ml/min
Longitud de onda:	204 nm

Volumen de inyección:	10 µl
Temperatura de la columna:	30°C
Tiempo de análisis:	20 minutos

Idoneidad del sistema

5 Se demostró la reproducibilidad del sistema para cada tanda cromatográfica ejecutada con seis (6) réplicas de inyección de la solución de trabajo estándar (200 µg/ml de ácido asiático en metanol). Se calculó la desviación estándar relativa en porcentaje (DER %) para las réplicas de inyección. El factor de cola y el número de platos teóricos para el ácido asiático se calculó en la primera inyección de solución estándar de trabajo, utilizada para la DER.

10 Criterios de aceptación

- la DER % de la respuesta de área de pico para el Pico 1 a partir de seis (6) réplicas de inyección no puede ser superior a 3,0%.
 - el número de platos teóricos debe ser NLT 10000.
 - el factor de cola debería ser NMT 1,5.
- 15 ▪ resolución NLT 2,0.

Resultados

	Ácido asiático
DER %	0,5
Nº de platos teóricos	15322
Factor de cola	1,0
Resolución	2,7

20 Se calculó la recuperación de cada sal y material de partida (Tabla 1). El tiempo de retención de las sales de ácido asiático era igual al del material de partida de ácido asiático, confirmando de esta manera que las sales no habían experimentado ningún cambio estructural significativo (figura 1).

Tabla 1: recuperación de ácido asiático y sales

	Área de respuesta (µV*s)	Área de respuesta media (µV*s)	% de recuperación (µV*s)
Estándar de ácido asiático	1005566	1005566	100,00
Sal sódica (a partir de carbonato)	905119	903820,5	92,69
	902523		
Sal sódica a partir de metanólico NaOH	945697	948293,5	96,52
	950890		
Sal amónica	1077786	1080050,75	101,12
	1082316		

25 Solubilidad en agua y metanol

30 Se obtuvieron los resultados de solubilidad para el ácido asiático y una de las sales sódicas (AJF09, 99b) en agua y metanol. La Tabla 2 proporciona los resultados. El ácido asiático sólo era moderadamente soluble en agua (0,03 mg/ml), mientras que la sal sódica era 228 veces más soluble. Ésta es evidencia fuerte de la formación de sal y subraya un incremento muy significativo de la utilidad farmacéutica, con respecto a la preparación de formas de dosificación.

35 Preparación de muestras

Las soluciones saturadas obtenidas a partir de material de partida y sal en metanol y agua se filtraron y se diluyeron con fase móvil. No se llevó a cabo dilución para el ácido asiático en agua. Las muestras se prepararon por triplicado, excepto para la sal sódica preparada en metanol, para la que se produjeron dos preparaciones.

Tabla 2: resultados de solubilidad

Nombre de muestra	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Solubilidad [mg/ml]
Material de partida de ácido asiático para iny. 1A (agua)	121575,00	0,03
Material de partida de ácido asiático para iny. 1B (agua)	181180,00	0,04
Material de partida de ácido asiático para iny. 1C (agua)	84600,00	0,02
Material de partida de ácido asiático para iny. 1A (MeOH)	600450,00	34,87
Material de partida de ácido asiático para iny. 1B (MeOH)	468690,00	27,22
Material de partida de ácido asiático para iny. 1C (MeOH)	640580,00	37,20
Sal Na de ácido asiático NaOH para iny. 1A (H ₂ O) dil.	210980,00	6,86
Sal Na de ácido asiático NaOH para iny. 1B (H ₂ O) dil.	195600,00	6,36
Sal Na de ácido asiático NaOH para iny. 1C (H ₂ O) dil.	224970,00	7,32
Sal Na de ácido asiático NaOH para iny. 1A (MeOH)	438105,00	25,44
Sal Na de ácido asiático NaOH para iny. 1B (MeOH)	414550,00	24,08

C. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

5 Preliminarmente se llevó a cabo análisis espectroscópico RMN-¹H y RMN-¹³C en DMSO-d₆ en un instrumento Varian 300 MHz tanto con material de partida de ácido asiático como la sal sódica AJF09, 99b. Generalmente el espectro de RMN de protones obtenida pone de manifiesto desplazamientos químicos y patrones de división (multiplicidad) consistentes con la estructura del ácido asiático (figura 2). Mediante la comparación de los espectros de ambos compuestos resulta evidente que algunas señales han modificado los desplazamientos químicos, especialmente entre 4,0 y 4,6 ppm. Lo anterior es indicativo de cambios electrónicos consistentes con la formación de sal.

10 Los datos de RMN-¹³C muestran los desplazamientos químicos de carbonos consistentes con la estructura del ácido asiático. Las figuras 3 y 4 ilustran espectros representativos de ¹³C tanto de material de partida de ácido asiático como de una sal sódica del mismo. Las señales de carbono con desplazamientos químicos en torno a 36, 24 y 17 ppm en los espectros del ácido asiático han cambiado en los espectros de la sal sódica, indicando también la formación de sal.

20 Se llevó a cabo un análisis de RMN adicional a 400 MHz con el fin de obtener un perfil de mejor resolución y para confirmar los resultados preliminares. Un análisis detallado de RMN tanto de protones como de carbonos (ver las figuras 4a-h) revela que la estructura molecular de la sal sódica permanece esencialmente igual, excepto por las diferencias observadas de desplazamiento químico generadas por el efecto del nuevo carboxilato sódico. Entre las diferencias más relevantes que apoyan la incidencia de formación de sal se encuentran:

- 25 a. el ácido asiático muestra un protón en 11,9 ppm habitualmente correlacionado con un grupo funcional ácido carboxílico. Esta señal no se encuentra presente en la sal sódica.
 b. El desplazamiento químico del carbono carboxílico único es diferente en ambos materiales analizados; nuevamente, la conversión de carboxílico en carboxilato explicaría este comportamiento.

30 D. Difracción de rayos X de los polvos

Se llevó a cabo un análisis de difracción de rayos X utilizando un Shimadzu Lab X, XRD-600 de conformidad con USP <941>. La figura 5a muestra el difractograma para el ácido asiático. La banda ancha observada es característica de los materiales amorfos. Al escalar el protocolo indicado anteriormente, en la sección IV.A.3, para producir la sal sódica a la escala de 2 gramos, los resultados del análisis de HPLC seguían los detallados en la sección IV.B, anteriormente, y los datos de difracción de rayos X de los polvos eran consistentes con un carácter cristalino del material obtenido (ver la figura 5b).

E. Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (EITF)

40 Se llevó a cabo el análisis espectroscópico de EITF del ácido asiático, de las sales sódicas AJF09, 82 y AJF09, 99b, y de la sal amónica (AJF09, 99a). La figura 6 es ejemplar del espectro de infrarrojos resultante del ácido asiático y es típica de un ácido carboxílico, tal como pone de manifiesto la presencia de la banda carbonilo del ácido próxima a 1.697 cm⁻¹.

45 Los espectros de infrarrojos obtenidos para las sales sódicas AJF09, 82 (figura 7) y AJF09.99b (figura 8) ponen claramente de manifiesto la intensidad reducida de la banda del carbonilo en proximidad a 1.697 cm⁻¹ y la aparición de bandas próximas a 1.545 y 1.390 cm⁻¹. La presencia de estas bandas es atribuible a la presencia de un grupo carboxilato, y no de un grupo ácido carboxílico. Es evidencia espectroscópica de la formación de sal. El espectro de infrarrojos de la sal amónica AJF09, 99a (figura 9) muestra la presencia de una banda en proximidad a 1.390 cm⁻¹,

análogamente indicativa de una sal. La banda característica de los ácidos carboxílicos en proximidad a 1.690 cm^{-1} todavía se encuentra presente, lo que podría reflejar una conversión incompleta del ácido en la sal.

F. Análisis termogravimétrico (ATG)

Se llevó a cabo un ATG utilizando un aparato TA Instruments modelo Q5000. Se llevó a cabo la verificación de la calibración del instrumento conforme a USP<891>, utilizando un estándar de níquel. Se analizó el ácido asiático y dos sales sódicas, AJF09, 82 y AJF09, 99b (figuras 10-12). El material de partida de ácido asiático se degradó a 400°C , tal como muestra el termograma. Los termogramas obtenidos para ambas sales reflejan una mayor tolerancia a la temperatura, un fenómeno observado con frecuencia al formarse una sal a partir de un compuesto.

G. Determinación del contenido de sodio

Se determinó el contenido de sodio con un espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 300 de Perkin Elmer, dotado de un horno de grafito HGA 850 y utilizando una llama oxidante de aire-acetileno y la detección a 589 nm. Se prepararon soluciones estándares de sodio a partir de una solución madre de cloruro sódico a una concentración de 1.000 mg/l. Típicamente, el análisis del sodio mediante esta técnica se lleva a cabo en presencia de una sal de álcali, tal como cesio, para controlar la ionización. En este caso, se llevaron a cabo experimentos preliminares para determinar la cantidad de cesio (en forma de CsCl) que resultaría necesaria para maximizar la sensibilidad para el sodio. Basándose en estos experimentos se utilizó CsCl al 0,3% para todas las preparaciones de muestra y estándares.

Solución madre estándar 1 (1.000 ppm de Na)

Se preparó mediante la disolución de una cantidad pesada con precisión de cloruro sódico (2,53 g) en un matraz volumétrico de 1,0 l y llevando a volumen con agua desionizada tras la disolución.

Cloruro sódico al 0,3%

Se preparó mediante la disolución de una cantidad pesada con precisión de cloruro de cesio (3 g) en un matraz volumétrico de 100 ml y llevando a volumen con agua desionizada tras la disolución.

Cloruro de cesio al 0,3% (diluyente)

Se preparó mediante la disolución de una cantidad pesada con precisión de cloruro de cesio (6 g) en un matraz volumétrico de 2,0 l y llevando a volumen con agua desionizada tras la disolución.

Solución madre diluida 1 (100 ppm de Na en CsCl al 0,3%)

Se preparó mediante la transferencia de 10,0 ml de solución estándar 1 (1.000 ppm de Na) y 10,0 ml de cloruro de cesio al 3% a un matraz volumétrico de 100 ml con agua desionizada utilizada para llevar a volumen.

Solución madre diluida 2 (10 ppm de Na en CsCl al 0,3%)

Se preparó mediante la transferencia de 10,0 ml de solución diluida 1 (100 ppm de Na en CsCl al 0,3%) a un matraz volumétrico de 100 ml con cloruro de cesio al 0,3% (diluyente) utilizado para llevar a volumen.

Linealidad de la respuesta

La linealidad de un procedimiento de ensayo es su capacidad de proporcionar resultados de ensayo directamente proporcionales a la concentración del analito en un intervalo dado. Se llevó a cabo un estudio de la absorción frente a la concentración de sodio correspondiente. Para cada grupo de análisis, se prepararon soluciones estándares de NaCl mediante la transferencia precisa de 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml y 6,0 ml de solución diluida 2 (10 ppm de Na en CsCl al 0,3%) en matraces volumétricos separados de 50 ml y llevando cada uno a volumen con diluyente con el fin de producir estándares a concentraciones de 0,4 ppm, 0,6 ppm, 0,8 ppm, 1,0 ppm y 1,2 ppm, respectivamente. Cada solución se leyó tres (3) veces con el instrumento y se utilizó la media de las tres lecturas para generar la curva de linealidad (figura 13).

Se analizaron las sales sódicas de ácido asiático AJF09.82 y AJF09.99b. Se proporcionan los resultados en la Tabla 3.

Tabla 3: contenido de sodio de sales de ácido asiático

Material	Nº de lote	Masa de muestra (mg)	Absorción	Absorción media	Na (ppm) a partir de la curva de linealidad	% de Na en la muestra
Asia-Na en NaOH	AJF09-99	3,01	0,125	0,127	0,77	5,13
			0,127			

Material	Nº de lote	Masa de muestra (mg)	Absorción	Absorción media	Na (ppm) a partir de la curva de linealidad	% de Na en la muestra
			0,130			
Asia-Na en carbonato	AJF09,82	2,13	0,067	0,067	0,92	8,67
			0,067			
			0,066			

Bajo la premisa de que hay una molécula de sodio por cada molécula de sal de ácido asiático, se esperaría un contenido de aproximadamente 4,5% de sodio en la muestra.

- 5 La presente invención se describe en mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos adicionales, posteriormente, que son ilustrativos y no limitativos de la invención.

Efecto sobre la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en ratas 1. Objetivo

- 10 Con el fin de observar el efecto del ácido asiático y el asiaticósido sobre la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en ratas, se llevó a cabo la administración los días 2º y 7º, respectivamente, tras establecer el modelo de enfermedad.

2. Materiales y métodos

- 15 Animal: ratas SD (macho); peso: 250-300 g, de Shanghai SLACC Co. Ltd
 kit de FCT-β, kit ELISA 96T humano importado por Shanghai Jingmei
 kit de FNT-α, kit ELISA 96T humano importado por Shanghai Jingmei
 Asiaticósido (pureza ≥ 92%)
 20 Ácido asiático (pureza ≥ 98%)
 Bleomicina para el uso para inyección de Tianjin Taihe Pharmaceutical, espec: 8 mg/Ap
 Dexametasona Shanghai Sinepharm, espec: 5 mg/Ap

3. Dosificación y vía de administración

Ácido asiático	3, 9, y 27 mg/kg	oral (p.o.) × 28 días
Asiaticósido	36 mg/kg	p.o. × 28 días
Dexametasona	0,6mg/kg	p.o. × 28 días
Bleomicina	5 mg/kg	p.o. × 28 días

- 25 4. Métodos

- 30 Ratas SD macho, peso corporal: 250-300 g. Los animales fueron anestesiados con seconal al 3%, se tumbaron y se fijaron en la mesa quirúrgica. Se desinfectó el cuello de los animales con alcohol y se cortó para exponer la tráquea. Se insertó una aguja a través del espacio entre los anillo traqueales centripetamente y se inyectaron 5 mg/kg de bleomicina. Las ratas se mantuvieron verticales y se hicieron girar, con el fin de mantener una distribución uniforme de la solución en los pulmones. A continuación se suturaron las incisiones.

- 35 Tras recuperar la conciencia las ratas fueron asignadas aleatoriamente a grupos. Los animales se dividieron en (i) un grupo que recibió la administración al día siguiente tras establecer el modelo, e (ii) un grupo que recibió la administración 7 días después del establecimiento del modelo. Se incluyeron grupos de 27, 9 y 3 mg/kg p.o. x 28 d de ácido asiático, un grupo de 0,6 mg/kg p.o. x 28 d de dexametasona, un grupo de 36 mg/kg p.o. x28 d de asiaticósido, un grupo de modelo y un grupo de blanco. Se administró solución salina normal en el grupo de modelo y en grupo de blanco. El día 28 tras la administración de ácido asiático y de asiaticósido, se midió la supervivencia y la proporción en peso de los pulmones, y se llevó a cabo el examen patológico y examen sérico.

Tabla 4. Mortalidad durante el experimento, días 7-28

Grupo	Dosificación iniciada el 2º día				Dosificación iniciada el 7º día		
	Número de muestra en el grupo	Número de muestra el día 7	Muestras remanentes al final del estudio	Número de muertes	Número de muestra en el grupo	Muestras remanentes al final del estudio	Número de muertes
Normal	10	10	10	0	10	10	0
Ácido asiático-H	15	13	13	0	13	13	0
Ácido asiático-M	15	14	13	1	13	12	1

Grupo	Dosificación iniciada el 2º día				Dosificación iniciada el 7º día		
	Número de muestra en el grupo	Número de muestra el día 7	Muestras remanentes al final del estudio	Número de muertes	Número de muestra en el grupo	Muestras remanentes al final del estudio	Número de muertes
Ácido asiático-L	15	13	11	2	13	12	1
Asiaticósido	15	14	12	2	13	11	2
Dexametasona	15	14	6	8	13	6	7
Modelo	15	13	5	8	13	7	6

Efecto sobre el índice de peso pulmonar de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en ratas tratadas con ácido asiático

Se midió el peso corporal y el peso pulmonar tras el sacrificio de las ratas.

5 Proporción en peso de pulmones = (peso pulmonar/peso corporal) x 100%.

Se muestran los resultados en las Tablas 5 y 6. En las tablas siguientes un asterisco (*) indica una diferencia que es significativa (P<0,05) en comparación con el grupo modelo; dos asteriscos (**) indican una diferencia muy significativa (P<0,01).

10

Tabla 5. Índice de peso pulmonar tras la administración de 28 días de ácido asiático iniciada el segundo día

Grupo	N	peso (g) X±SD	Peso pulmonar (g) X±SD	Proporción de peso pulmonar (%)
Grupo de control de blanco	10	438,90±18,98	2,20±0,14	0,50**
Grupo modelo 5 mg/kg	5	234,60±47,44	3,37±0,56	1,44
Grupo de dexametasona 0,6 mg/kg	6	157,33±16,74	2,06±0,52	1,31
Grupo de asiaticósido 36 mg/kg	10	311,30±28,76	2,62±0,38	0,84**
Grupo de ácido asiático 3 mg/kg	10	328,33±31,64	2,74±0,54	0,84**
Grupo de ácido asiático 9 mg/kg	10	316,80±49,73	2,49±0,40	0,78**
Grupo de ácido asiático 27 mg/kg	10	347,8±59,3	2,41±0,38	0,69**

Tabla 6. Índice de peso pulmonar tras la administración de 28 días de ácido asiático iniciada 7 días después de establecer el modelo con bleomicina

Grupo	N	peso (g) X±SD	Peso pulmonar (g) X±SD	Proporción de peso pulmonar (%)
Grupo de control de blanco	10	438,90±18,98	2,20±0,14	0,50**
Grupo modelo 5 mg/kg	7	248,40±28,23	3,02±0,56	1,22
Grupo de dexametasona 0,6 mg/kg	6	179,00±16,01	2,05±0,40	1,14
Grupo de asiaticósido 36 mg/kg	10	324,60±44,06	2,59±0,33	0,80**
Grupo de ácido asiático 3 mg/kg	10	317,70±44,19	2,64±0,33	0,83**
Grupo de ácido asiático 9 mg/kg	10	329,30±30,54	2,69±0,53	0,82**
Grupo de ácido asiático 27 mg/kg	10	343,30±49,57	2,52±0,25	0,73**

15

Tal como se muestra en las Tablas 5 y 6, la proporción de peso pulmonar de las ratas en los grupos de ácido asiático a dosis alta, intermedia y baja, desde el 2º día o el 7º día, fue significativamente más baja que en el grupo modelo. Los resultados del grupo de asiaticósido fueron similares a los de los grupos de ácido asiático. Los índices de peso pulmonar en el grupo de dexametasona fueron relativamente más altos, probablemente debido a una reducción del peso corporal causada por la dexametasona.

20

Efecto serológico del tratamiento de ácido asiático sobre algunas citoquinas en ratas con fibrosis pulmonar inducida con bleomicina

25 Se prepararon muestras de suero siguiendo un protocolo estándar (centrifugación a 3.000 rpm, 10 minutos después de la recolección) y se almacenaron a -20°C. Se llevaron a cabo los ensayos siguiendo las instrucciones del kit. Se muestran los resultados en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de ensayos serológicos del ácido asiático

Grupo/valor de DO	TFG-β (2 ^o día) X±SD	TFG-β (7 ^o día) X±SD	TFG-α (2 ^o día) X±SD	TFG-α (7 ^o día) X±SD
Grupo de control de blanco	0,665±0,137**	0,829±0,273**	0,024±0,008**	0,053±0,010**
Grupo modelo 5 mg/kg	1,134±0,166	1,795±0,396	0,066±0,006	0,109±0,031
Grupo de dexametasona 0,6 mg/kg	0,751±0,214**	0,717±0,197**	0,073±0,006	0,060±0,006*
Grupo de asiaticósido 36 mg/kg	0,670±0,155**	1,181±0,364**	0,064±0,013	0,091±0,027*
Grupo de ácido asiático 3 mg/kg	0,726±0,220**	1,494±0,273	0,055±0,008*	0,084±0,018*
Grupo de ácido asiático 9 mg/kg	0,642±0,139**	1,165±0,412	0,056±0,016*	0,096±0,036*
Grupo de ácido asiático 27 mg/kg	0,653±0,157**	1,049±0,363**	0,050±0,007**	0,047±0,013**

El análisis patológico de los efectos del ácido asiático sobre la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en ratas.

5 Se fijaron los tejidos pulmonares en formalina al 10% durante 1 semana. Se deshidrataron los tejidos de los lóbulos inferiores de los dos pulmonares y se sumergieron en parafina y se llevó a cabo la inclusión en parafina y realización de cortes. El grosor de las secciones fue de 3-4 μm. Se llevó a cabo tinción rutinaria de hematoxilina-eosina (HE). Se llevó a cabo tinción especial dual de las fibras de colágeno y fibras elásticas con el fin de detectar el grado de fibrosis. Se observó la tinción de los dos grupos de secciones y se proporcionan los resultados a continuación.

Grupo que recibió la administración al día siguiente de establecer el modelo con bleomicina

Grupo normal

15 Las estructuras morfológicas de los tejidos pulmonares de los animales se encontraban intactas y no se había producido hemorragia, proliferación ni edema. Sin embargo, se produjo infiltración de unas cuantas células inflamatorias en los tejidos pulmonares de la mayoría de animales. Se produjo infiltración de unas cuantas células inflamatorias. Se produjo infiltración grave de células inflamatorias y congestión en algunas áreas locales en algunos animales.

La tinción dual de fibras de colágeno y fibras elásticas demostró que el septo alveolar se encontraba ligeramente engrosado y la proliferación de unos cuantos fibroblastos.

25 Grupo modelo

Se produjo infiltración de células inflamatorias (principalmente linfocitos) e hiperplasia del septo alveolar en los tejidos pulmonares de los animales. Se produjo un engrosamiento localizado moderado a grave del septo alveolar e hiperplasia moderada de los fibroblastos en las lesiones engrosadas. Se produjo alveolitis grave y la fibroplasia podría implicar el área periférica de los bronquiolos terminales, de manera que prácticamente no había alveolos pulmonares en algunas áreas. Se produjo una atrofia leve de alveolos pulmonares o enfisema bajo la pleura pulmonar.

35 La tinción dual de fibras de colágeno y fibras elásticas demostró que se había producido proliferación de un gran número de fibras de colágeno y fibras elásticas en los tejidos pulmonares. En algunos campos la ausencia de alveolos pulmonares era prácticamente total. Se produjo hiperplasia de fibras de colágeno y fibras elásticas en algunas paredes de vasos. Los lúmenes eran pequeños y se produjo hiperplasia de un gran número de fibras de colágeno y fibras elásticas en torno a los vasos sanguíneos.

40 Grupo de dexametasona

Se produjo una infiltración leve de células inflamatorias (principalmente linfocitos) en los tejidos pulmonares. Se produjo infiltración de unas cuantas células inflamatorias en los alveolos pulmonares y se produjo hiperplasia leve del septo alveolar. Se produjo una proliferación leve de los fibroblastos, se formaron bulas pulmonares, y atrofia pulmonar leve y enfisema bajo las pleuras pulmonares.

La tinción de las fibras de colágeno y fibras elásticas demostró que se había producido poca proliferación de las fibras de colágeno y las fibras elásticas en los tejidos pulmonares.

50 Grupo de administración de asiaticósido

Se produjo una inflamación leve y alveolitis (principalmente linfocitos) en los tejidos pulmonares. Se produjo hiperplasia leve del septo alveolar y se observó atrofia pulmonar leve o enfisema bajo el septo. El grado y extensión de los cambios patológicos anteriormente indicados eran similares a los observados en el grupo de administración de dexametasona, aunque menos graves que los del grupo modelo.

5 Los resultados de las tinciones de las fibras de colágeno y de las fibras elásticas fueron similares a los del grupo de administración de dexametasona.

Grupo de dosis baja de ácido asiático

10 Se produjo una inflamación leve y alveolitis (principalmente linfocitos) en los tejidos pulmonares. Se produjo hiperplasia leve del septo alveolar; el septo alveolar se encontraba ligeramente engrosado; se produjo proliferación de unos cuantos fibroblastos y se observó atrofia pulmonar leve o enfisema bajo el septo. El grado y extensión de los cambios patológicos anteriormente indicados eran similares a los del grupo de asiaticósido.

15 Los resultados de las tinciones de las fibras de colágeno y de las fibras elásticas fueron similares a los del grupo de dexametasona.

Grupo de dosis intermedia de ácido asiático

20 Se produjo una infiltración leve de células inflamatorias (principalmente linfocitos) en los tejidos pulmonares. La inflamación implicaba los alveolos pulmonares y se produjo un engrosamiento e hiperplasia leves del septo alveolar. Se produjo una proliferación leve de los fibroblastos y atrofia leve de los alveolos pulmonares y enfisema bajo las pleuras pulmonares.

25 La tinción de fibras de colágeno y fibras elásticas reveló la proliferación fibroblástica, que era significativamente más leve que la del grupo modelo. La extensión y grado en la mayoría de las ratas eran similares a las del grupo de dosis baja, aunque en unas cuantas ratas en este grupo los cambios patológicos eran más leves que los observados en el grupo de dosis baja.

30 Grupo de dosis alta de ácido asiático

35 Se produjo una infiltración leve de células inflamatorias (principalmente linfocitos) en los tejidos pulmonares. La inflamación implicaba los alveolos pulmonares y se produjo un engrosamiento leve del septo alveolar. Se produjo una proliferación leve de los fibroblastos y atrofia leve de los alveolos pulmonares y enfisema bajo las pleuras pulmonares.

40 La tinción de fibras de colágeno y fibras elásticas demostró sólo una ligera proliferación fibroblástica, que era similar a la del grupo normal en algunos campos. Los cambios patológicos en este grupo eran más leves que los observados en los grupos de dosis intermedia y baja y en el grupo de asiaticósido.

Grupo que recibió la administración 7 días después de establecer el modelo con bleomicina

45 Las condiciones del grupo normal y del grupo modelo eran similares a las del grupo que recibió la administración al día siguiente de establecer el modelo.

Grupo de dexametasona

50 Se produjo una infiltración leve de células inflamatorias (principalmente linfocitos) en los tejidos pulmonares. Se produjo infiltración de unas cuantas células inflamatorias en los alveolos pulmonares y se produjo un engrosamiento leve del septo alveolar. Se produjo una proliferación leve de los fibroblastos, se formaron muchas bulas pulmonares, y atrofia pulmonar leve y enfisema bajo las pleuras pulmonares. Los cambios patológicos eran significativamente más graves que los observados en el grupo que había recibido dexametasona el día siguiente al establecimiento del modelo.

55 La tinción de las fibras de colágeno y las fibras elásticas demostró la existencia de fibroplasia en tejidos pulmonares y el grosor de las paredes alveolares y el grado de fibroplasia eran significativamente más graves que los del grupo que había recibido dexametasona el día siguiente al establecimiento del modelo.

60 Las condiciones de cada grupo de dosis de asiaticósido y ácido asiático eran similares a las de los grupos que habían recibido la administración al día siguiente de establecer el modelo con bleomicina.

5. Análisis

La fibrosis pulmonar inducida con bleomicina es un modelo de "estándar de oro" para la investigación de los mecanismos de la fibrosis pulmonar y, en general, para el descubrimiento de terapéuticos antifibrosis y antiinflamatorios. Los cambios bioquímicos y morfológicos observados en los pulmones de muchas especies tras el tratamiento con bleomicina simulan los observados en el ser humano.

Las rutas inflamatoria y de la fibrosis activadas por el tratamiento de bleomicina son similares a las observadas en las enfermedades inflamatorias y fibróticas, tales como la nefropatía diabética (fibrosis renal). Además, Gaudie *et al.*, Proc. Am. Thorac. Soc. 3: 696-702, 2006, han presentado evidencia que indica que las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), incluyendo el enfisema, dependen de algunas de las mismas rutas desreguladas. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los resultados de la presente invención son consistentes con una utilidad de las composiciones terapéuticas, tal como se ha indicado anteriormente, en el tratamiento de enfermedades de inflamación y fibrosis, tales como la artritis, la enfermedad intestinal inflamatoria, la soriasis, la fibrosis pulmonar, la nefropatía diabética y EPOC.

Debido a que la neumonía causada por la bleomicina y la posterior fibrosis pulmonar son muy graves, el 50% a 70% de los animales murieron en el grupo modelo. Las muertes de los animales deberían considerarse relacionadas con la insuficiencia respiratoria causada por la inflamación y fibrosis crónicas. La dexametasona fue incapaz de proteger a las ratas de la muerte inducida por la bleomicina. Inesperadamente, el asiaticósido y el ácido asiático evitaron en gran medida la muerte inducida por la bleomicina.

Los resultados demuestran además que el ácido asiático puede reducir los niveles de FNT- α y FCT- β , siendo las dosis más altas ligeramente más eficaces.

Se adoptó la tinción de hematoxilina-eosina como ensayo rutinario, y se llevó a cabo la doble tinción de fibras de colágeno y fibras elásticas con el fin de observar mejor el efecto antifibrosis. Los resultados de patología demuestran que el ácido asiático resultó más eficaz contra la fibrosis pulmonar inducida con bleomicina, basándose en los resultados de dosis-respuesta. La eficacia en el grupo de dosis alta de ácido asiático fue superior a la del grupo de asiaticósido, mientras que en los grupos de dosis intermedia y baja fue similar a la del grupo de asiaticósido. Resulta interesante que no se produjo una diferencia patológica significativa entre el grupo de dexametasona con la administración iniciada el 2º día y el 7º día después del establecimiento del modelo: la fibrosis pulmonar fue más significativamente aliviada al iniciar la administración el 2º día. Lo anterior podría deberse a que la dexametasona ejerce su efecto antifibrosis mediante la inhibición de la inflamación. Una vez ha tenido lugar el estadio temprano de la inflamación, la eficacia de la dexametasona cae. El ácido asiático y el asiaticósido actúan tanto en el estadio inflamatorio temprano como en el estadio de fibrosis posterior; por lo tanto, la eficacia no varió tanto entre los grupos al administrar los compuestos el 2º y 7º días después del insulto.

De acuerdo con lo anterior, el ácido asiático y el asiaticósido purificados se ha demostrado que contrarrestan los efectos de la inflamación y fibrosis inducidas por la bleomicina.

La administración iniciada el día 7 después del tratamiento de bleomicina puede afectar a la eficacia de la dexametasona, pero no influyó significativamente sobre la eficacia del ácido asiático o el asiaticósido. Lo anterior sugiere que el asiaticósido y el ácido asiático no sólo actúan inhibiendo la inflamación, que aparece poco después del tratamiento de bleomicina. Por el contrario, los datos apoyan una acción inhibitoria directa del asiaticósido y el ácido asiático tanto sobre el proceso inflamatorio como sobre el proceso fibrótico.

Tabla 8. Valores medidos de hidroxiprolina en experimentos de ácido asiático antagonista de la fibrosis

Valores medidos de hidroxiprolina en experimentos de ácido asiático antagonista de la fibrosis (el 2º día)							
	Control de blanco	Control modelo	Dexametasona	Asiaticósido 36 mg/kg	Ácido asiático 3 mg/kg	Ácido asiático 9 mg/kg	Ácido asiático 27 mg/kg
1	16,35	35,62	19,86	28,56	19,57	28,26	17,64
2	18,65	29,55	23,31	28,69	28,21	15,05	25,36
3	17,11	28,92	21,69	19,63	24,03	29,14	25,18
4	19,25	24,69	24,63	25,34	19,66	28,98	24,36
5	24,36	29,58	25,36	28,11	25,61	27,69	20,19
6	15,36		25,87	20,54	26,55	19,03	18,6
7	25,16			25,36	26,34	19,46	19,36
8	14,11			19,47	24,09	18,22	20,97
9	19,5			25,25	19,07	24,01	27,69
10	21,93			20,11	29,99	19,56	17,11
X	19,18	29,67	23,45	24,11	24,31	22,94	21,65

Valores medidos de hidroxiprolina en experimentos de ácido asiático antagonista de la fibrosis (el 2º día)							
	Control de blanco	Control modelo	Dexametasona	Asiaticósido 36 mg/kg	Ácido asiático 3 mg/kg	Ácido asiático 9 mg/kg	Ácido asiático 27 mg/kg
SD	3,70	3,90	2,32	3,82	3,80	5,27	3,71
Valores medidos de hidroxiprolina en experimentos de ácido asiático antagonista de la fibrosis (el 7º día)							
	Control de blanco	Control modelo	Dexametasona	Asiaticósido 36 mg/kg	Ácido asiático 3 mg/kg	Ácido asiático 9 mg/kg	Ácido asiático 27 mg/kg
1	18,69	39,66	25,17	28,19	20,31	28,19	19,68
2	25,31	36,97	27,44	24,36	27,14	24,39	19,47
3	19,17	38,07	25,99	28,17	28,27	27,98	20,14
4	16,39	29,00	29,66	24,69	26,14	28,36	24,36
5	19,08	27,08	28,07	29,1	28,01	19,36	27,14
6	17,36	29,11	27,75	25,11	29,34	24,64	24,36
7	19,97	24,03		25,91	25,07	25,66	25,1
8	20,39			24,97	25,36	29,47	26,38
9	19,99			29,69	25,47	24,39	27,66
10	23,01			25,55	21,37	19,66	19,74
X	19,94	31,99	27,35	26,57	25,65	25,21	23,40
SD	2,60	6,13	1,59	2,00	2,90	3,52	3,32

Tabla 9. Contenido de colágeno de tipo III - resultados para la administración de ácido asiático desde el día 7

Contenido de colágeno de tipo III (tratamiento iniciado el día 7)		
Grupo	N	X±SD
Ácido asiático - dosis alta	10	0,387±0,287
Ácido asiático - dosis intermedia	10	0,515±0,398
Ácido asiático - dosis baja	10	0,764±0,826
Asiaticósido	10	Sin lectura: la reacción de color no funcionó para esta fila
Dex	6	0,518±0,527
Modelo - no tratado	5	1,260±0,934
Normal	10	0,147±0,045

REIVINDICACIONES

1. Sal producida a partir de ácido asiático, en la que dicha sal es una sal de potasio o una sal trometamol.
- 5 2. Sal según la reivindicación 1, en la que dicho ácido asiático se encuentra en una forma que es pura al 98%.
3. Forma de dosificación sólida que comprende una sal según la reivindicación 1.

Figura 1: superposición de material de partida ácido asiático y sales producidas

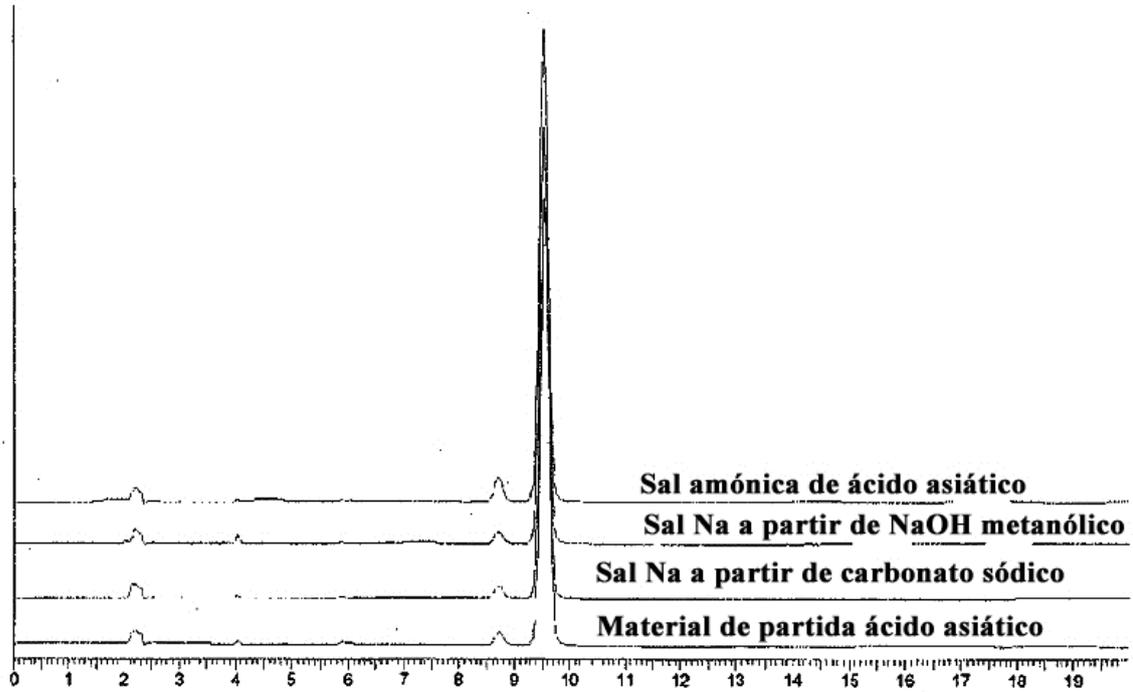


Figura 2: análisis espectroscópico de RMN-1H en DMSO-d6 de ácido asiático lote n° 071109 y sal sódica AFJ09.99b a 300 MHz

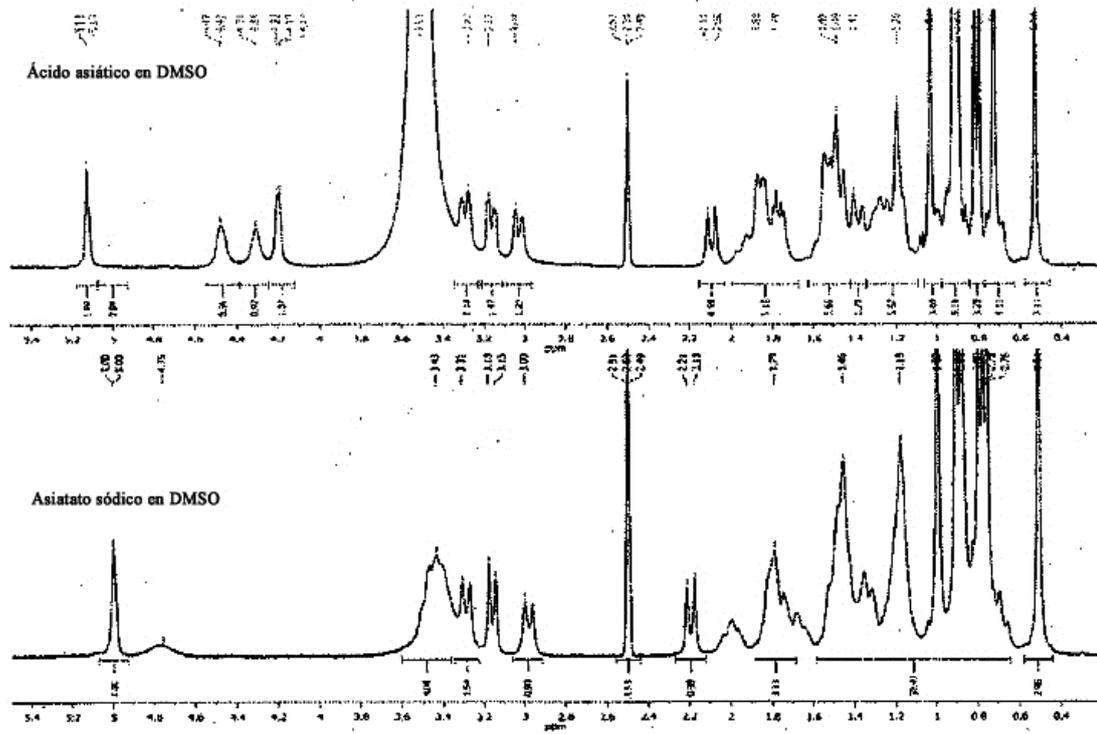


Figura 3: análisis espectroscópico de RMN-¹³C en DMSO-d₆ de ácido asiático lote n° 071109 y sal sódica AJF09.99b a 300 MHz

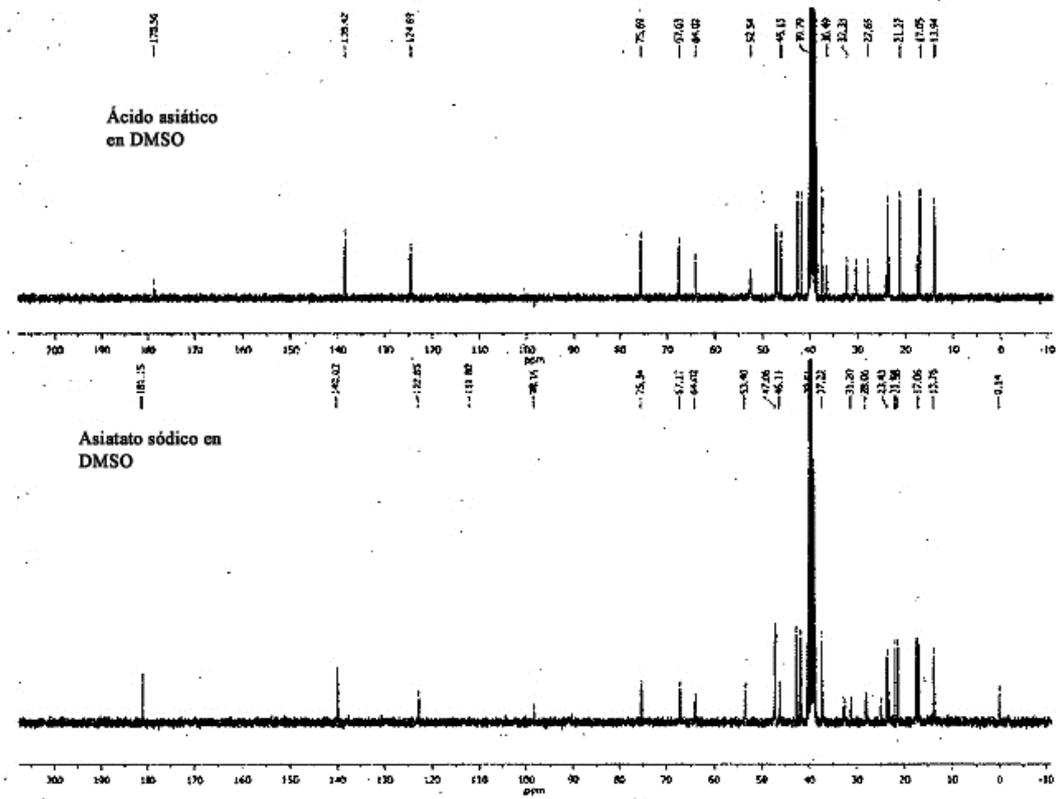


Figura 4. Análisis espectroscópico de RMN-13C en DMSO-d6 de ácido asiático y sal sódica AJF09.99b a 300 MHz (11 ppm-41 ppm)

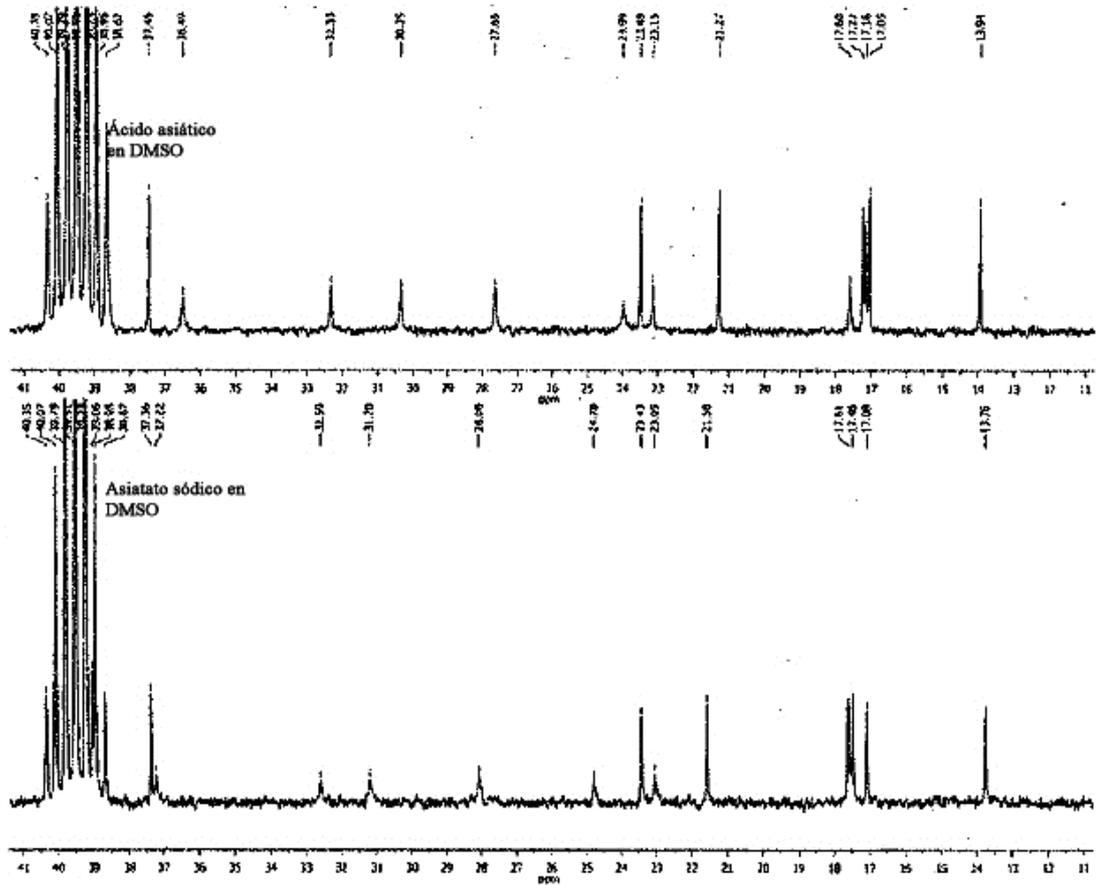


Figura 4a - espectro de RMN-¹H completo del ácido asiático en DMSO-d₆

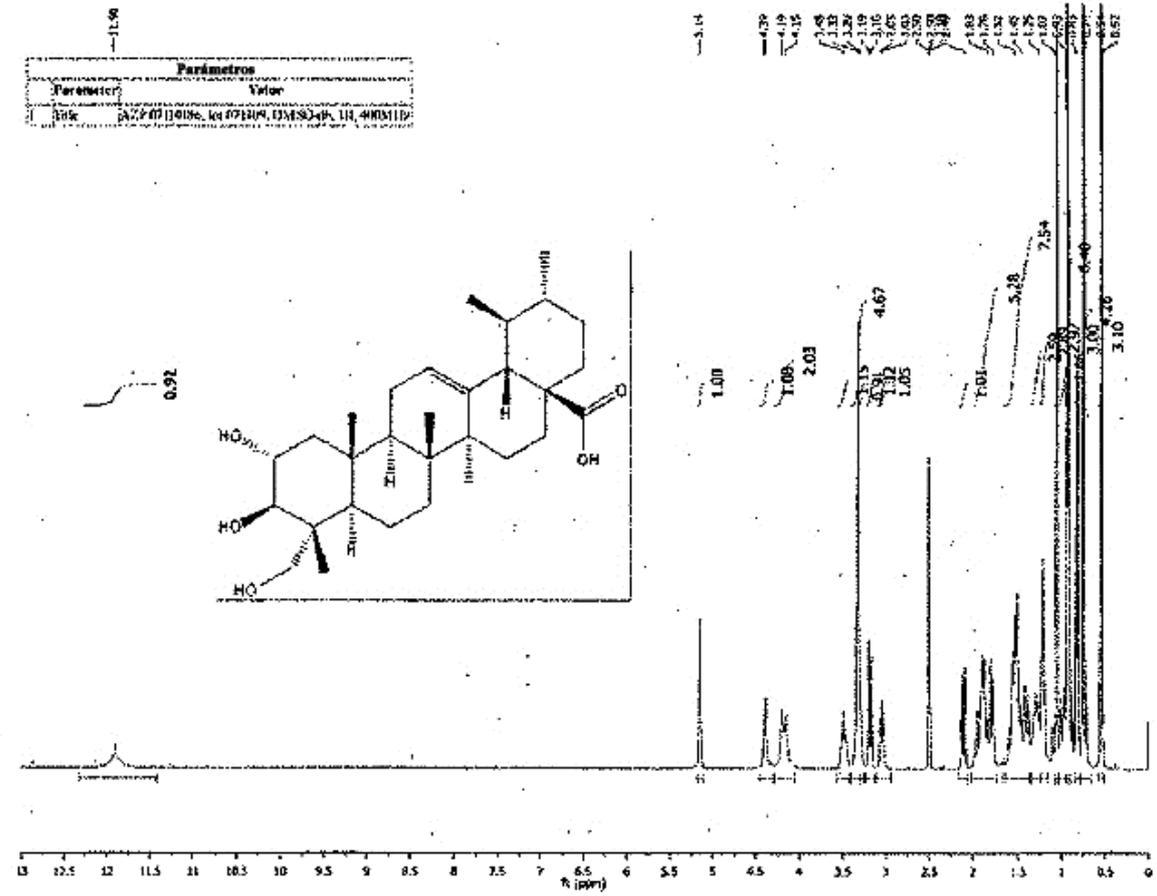


Figura 4b - Vista ampliada del espectro de RMN-¹H del ácido asiático

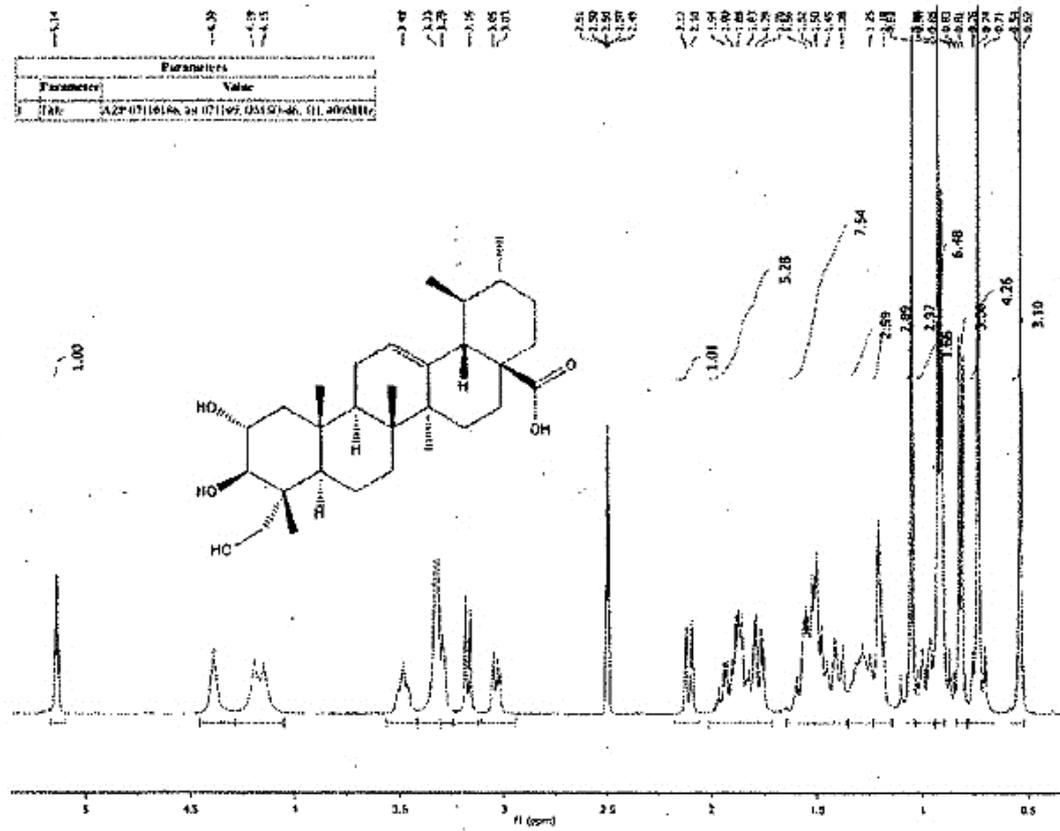


Figura 4c - espectro de RMN-1H completo de la sal sódica del ácido asiático (AJF09, 99b)

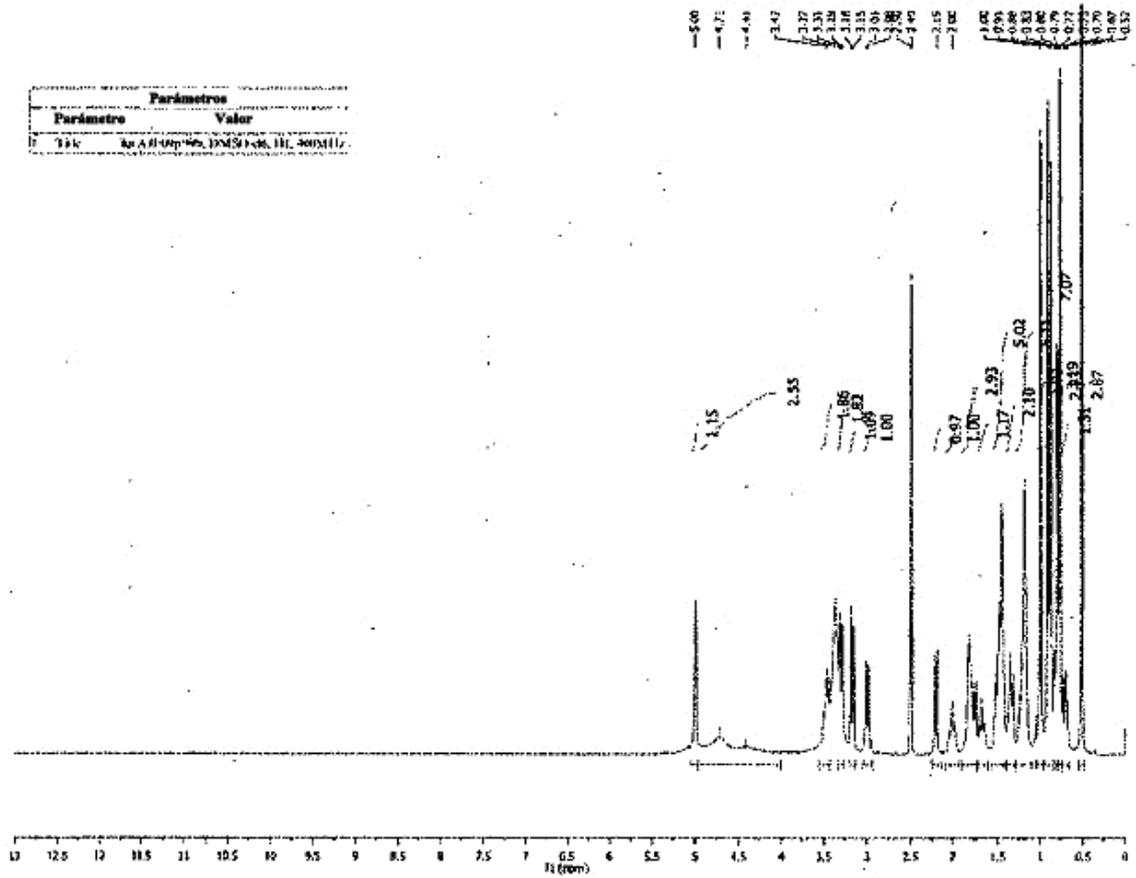


Figura 4d - Vista ampliada del espectro de RMN-¹H de la sal sódica del ácido asiático

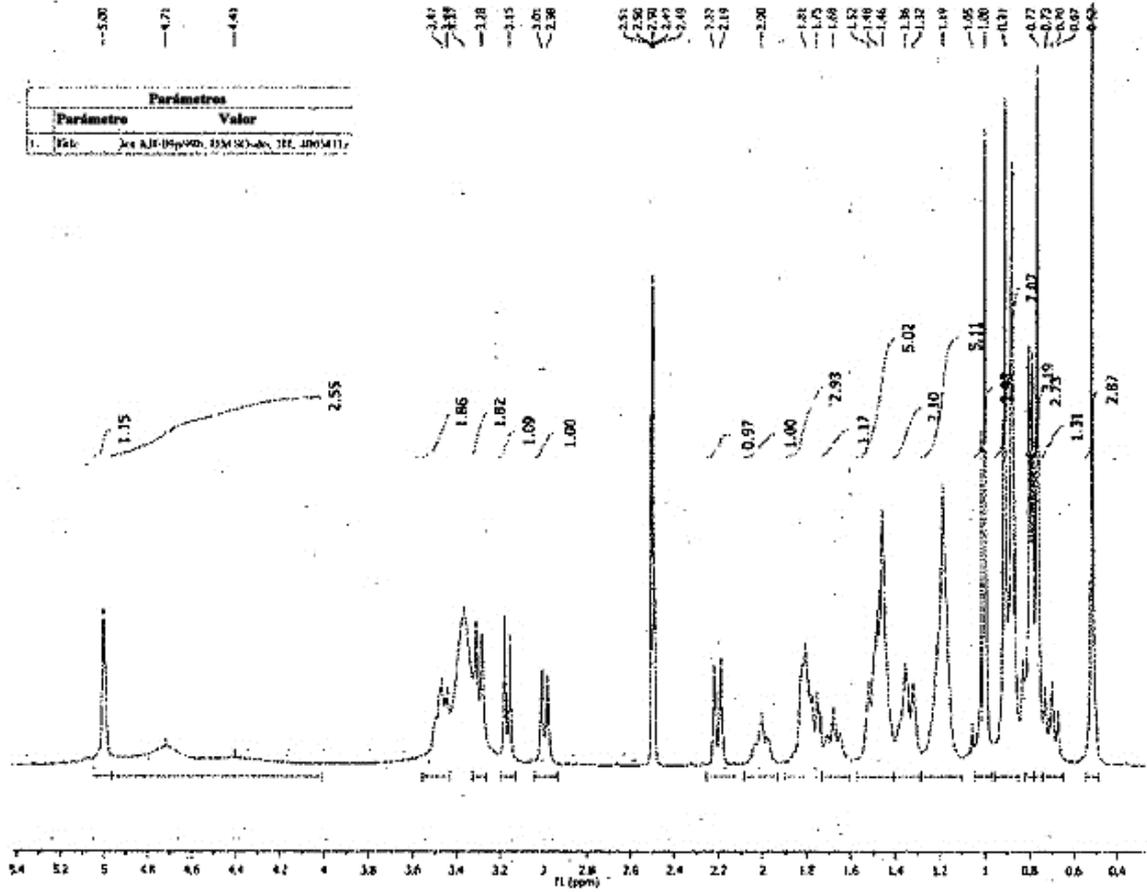


Figura 4e - espectro completo de RMN-¹³C del ácido asiático en DMSO-d₆

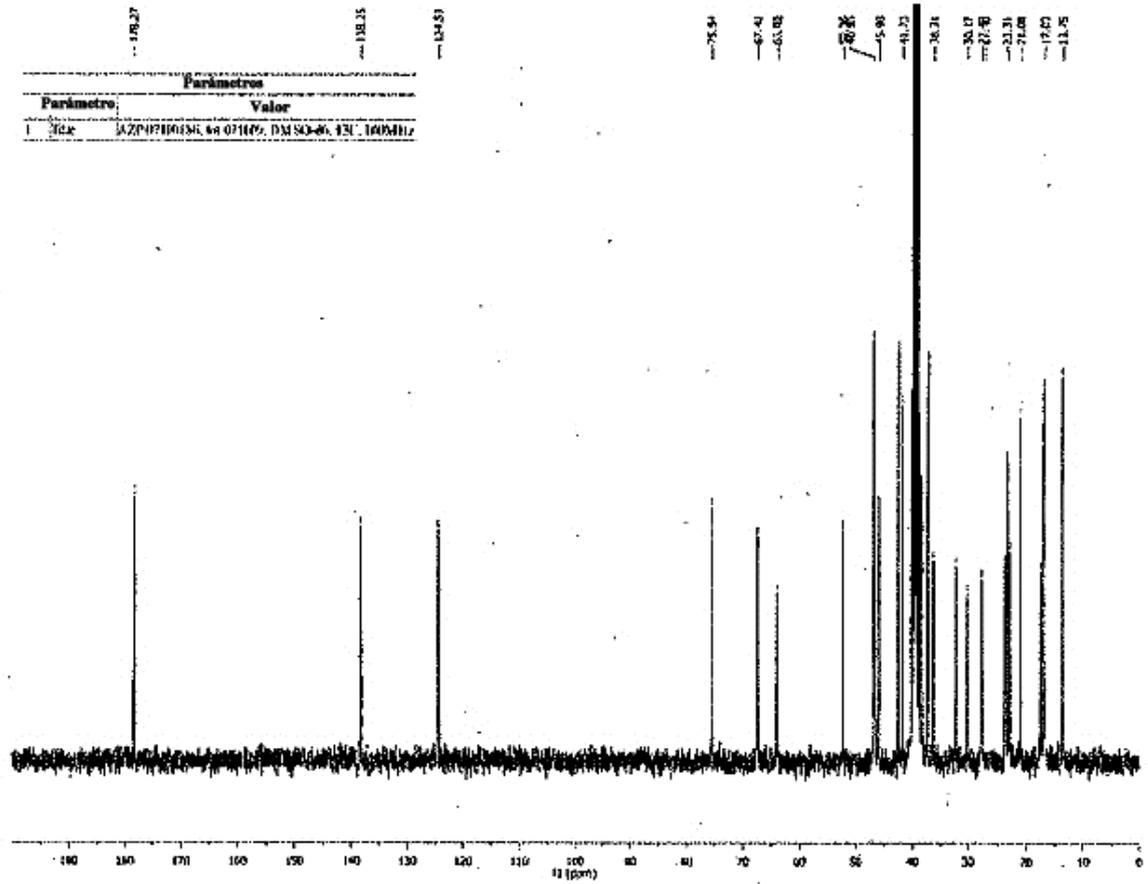


Figura 4f - Vista ampliada del espectro de RMN-¹³C del ácido asiático

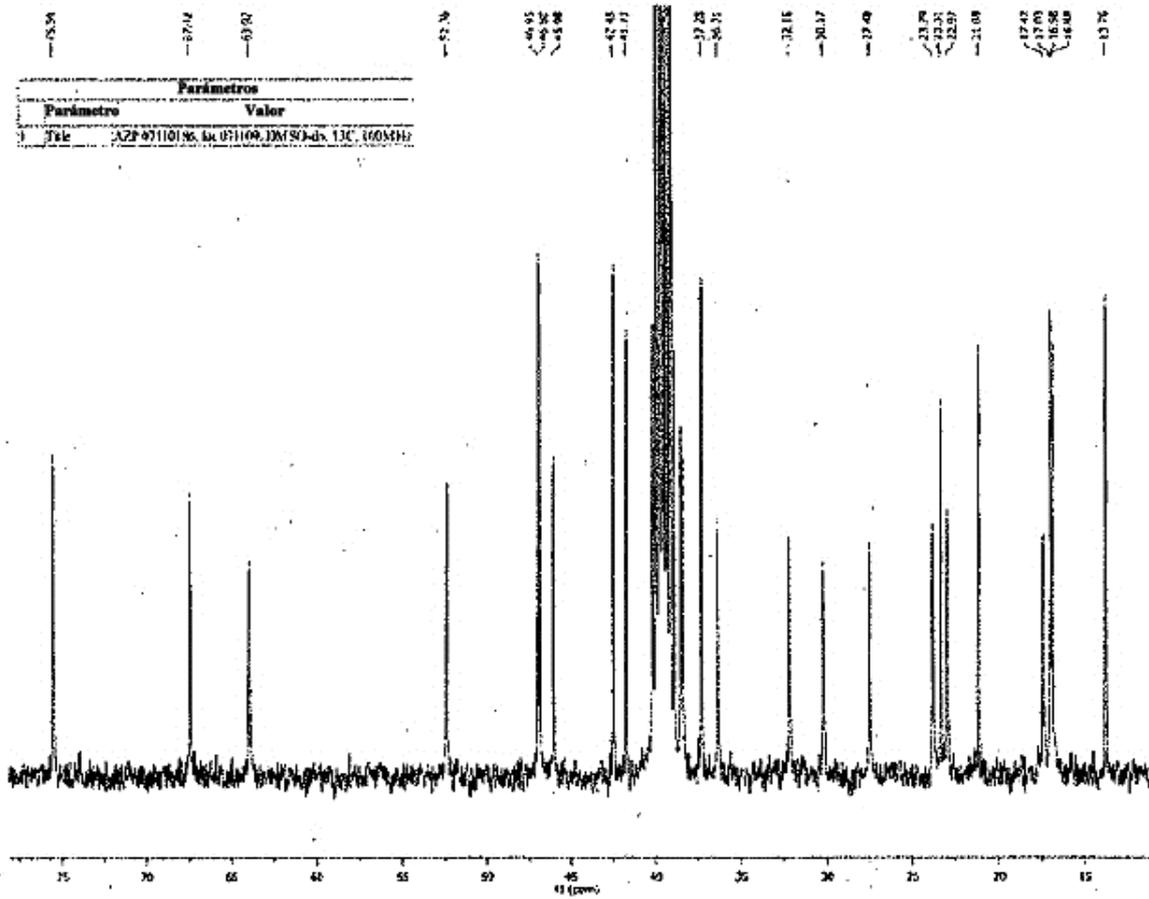


Figura 4h - Vista ampliada del espectro de RMN-¹³C de sal sódica del ácido asiático

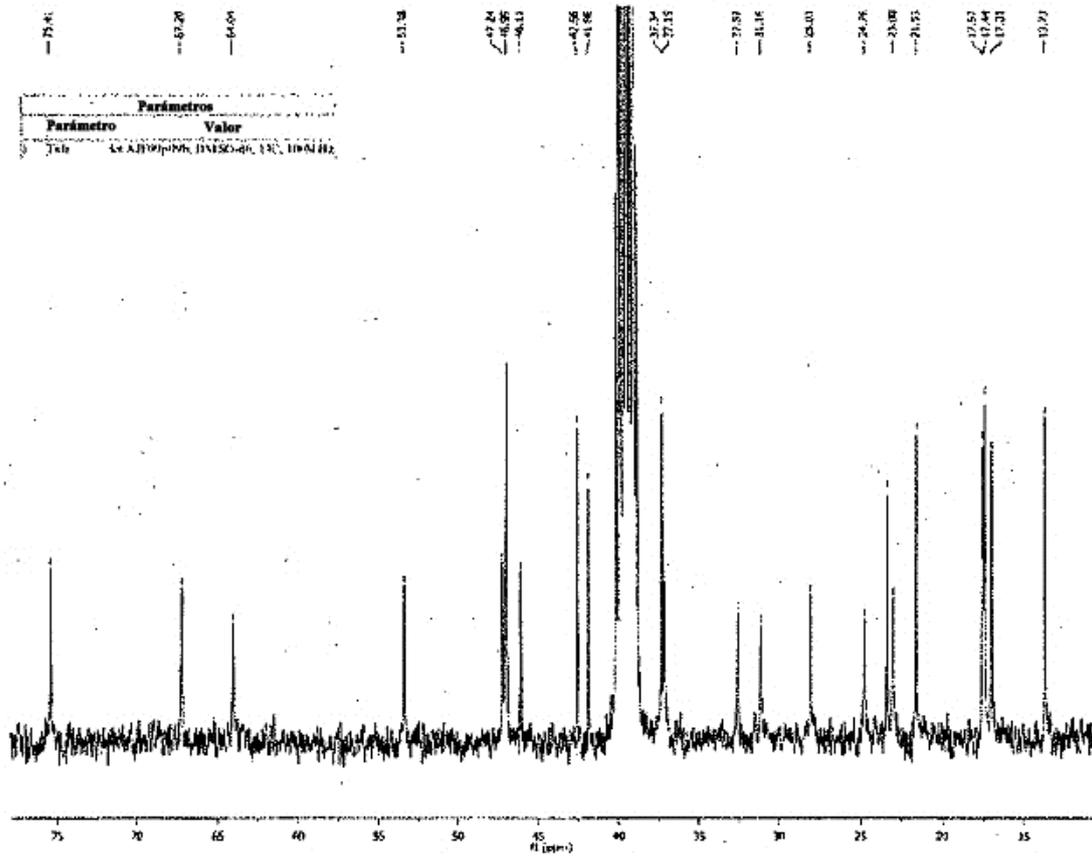


Figura 5a: PXRD del ácido asiático

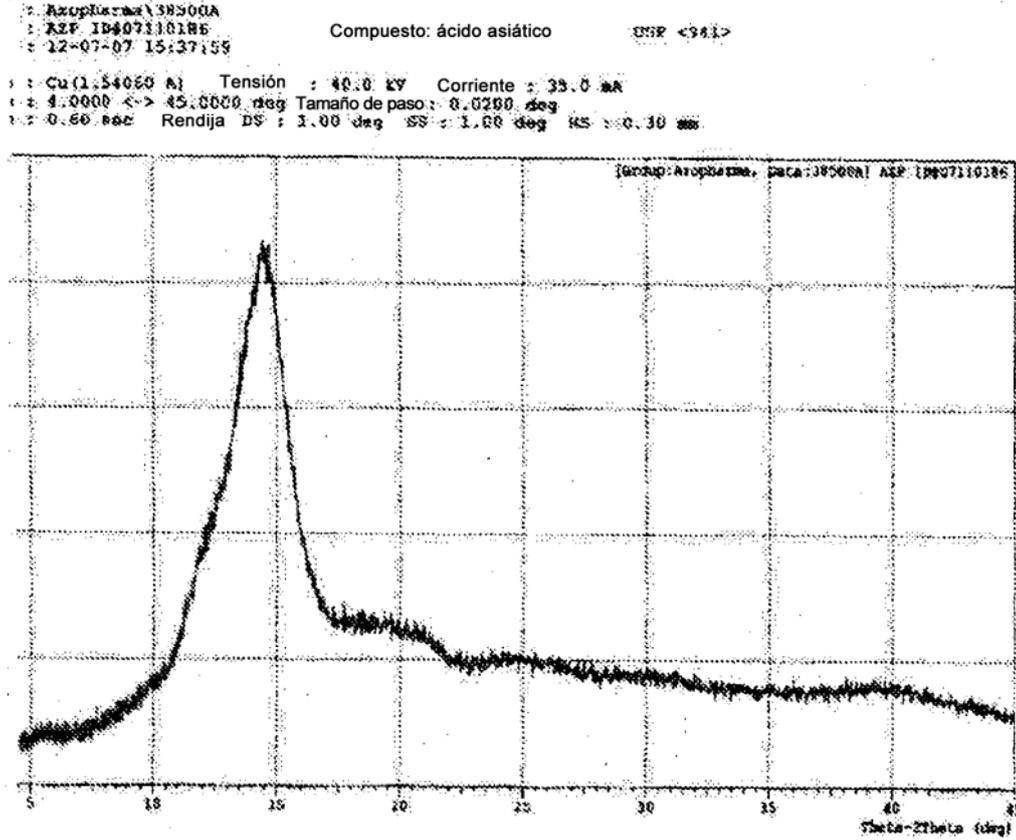


Figura 5b: PXRD de sal sódica del ácido asiático

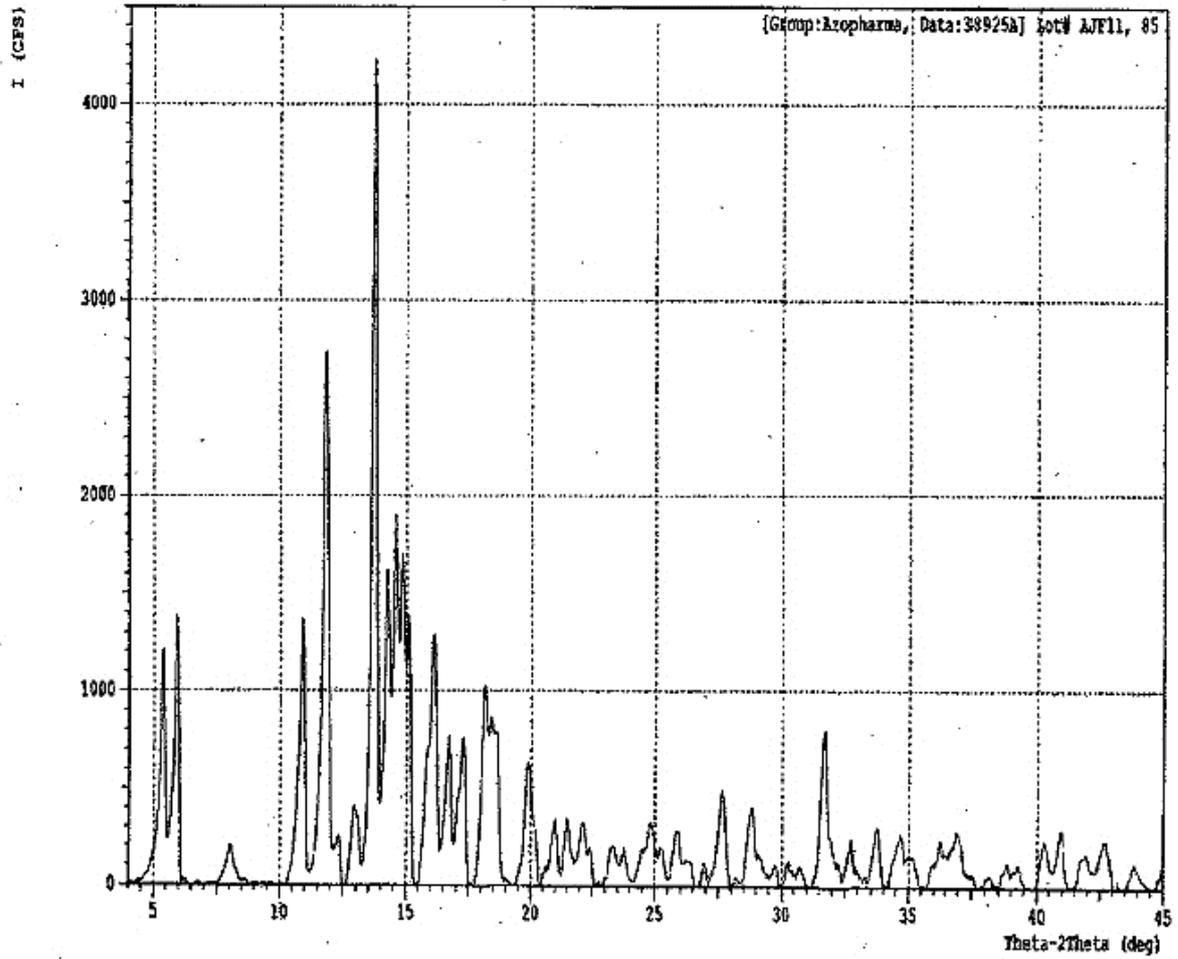


Figura 6: espectro de FTIR del ácido asiático

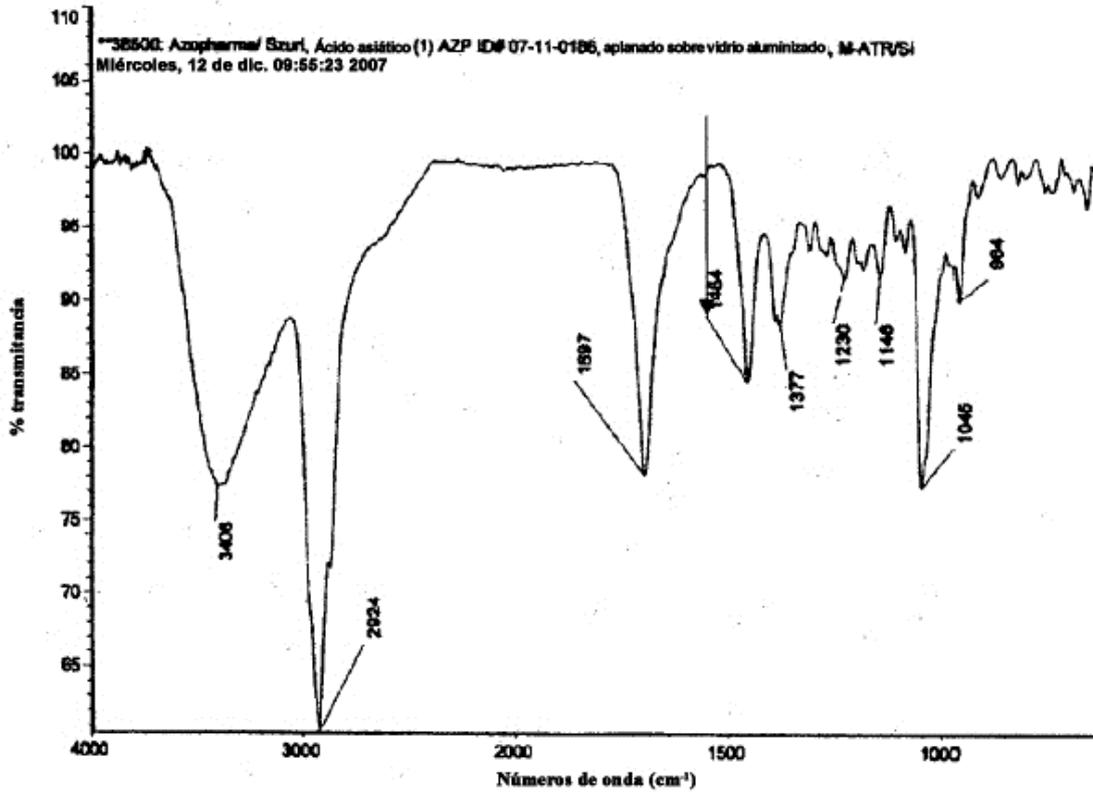


Figura 7: espectro de FTIR de sal sódica del ácido asiático, AJF09, 82

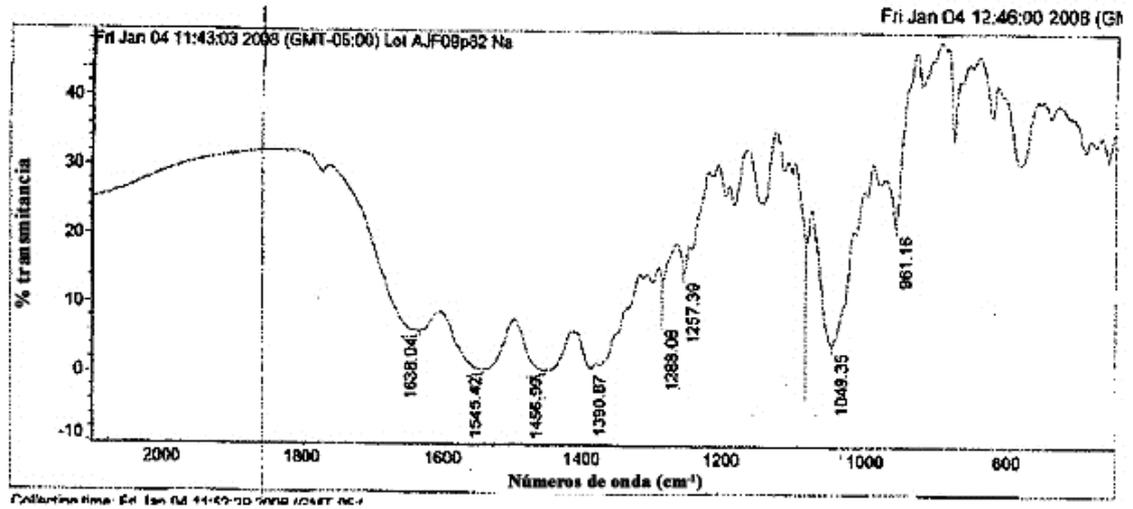


Figura 8: espectro de FTIR de sal sódica del ácido asiático, AJF09, 99b

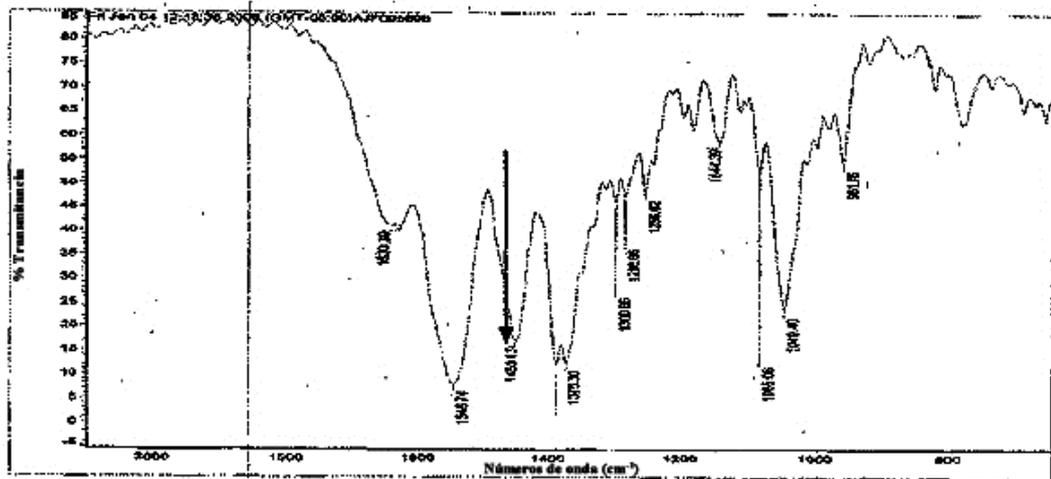


Figura 9: espectro de FTIR de sal amónica del ácido asiático, JF09, 99a

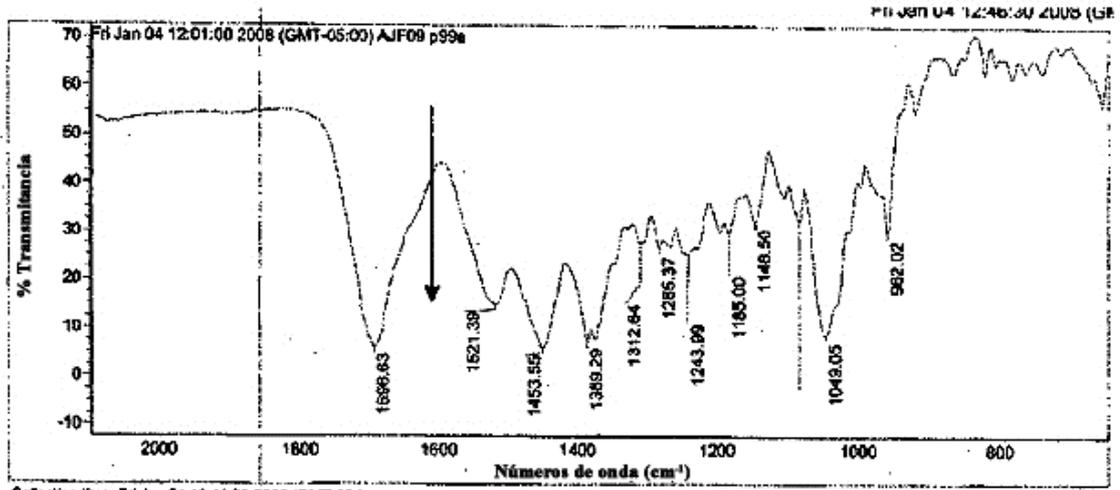


Figura 10: termograma de TGA del ácido asiático lote n° 071109

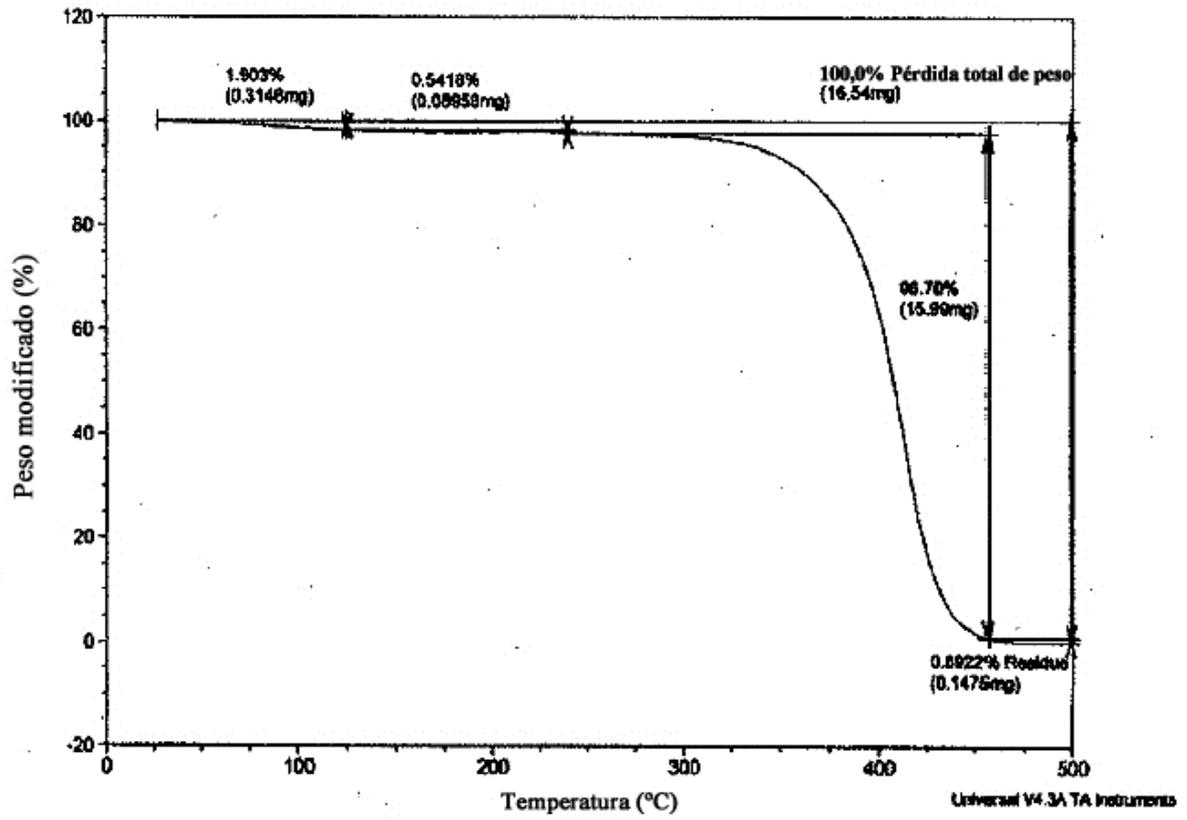


Figura 11: termograma de TGA de sal sódica del ácido asiático, AJF09, 82

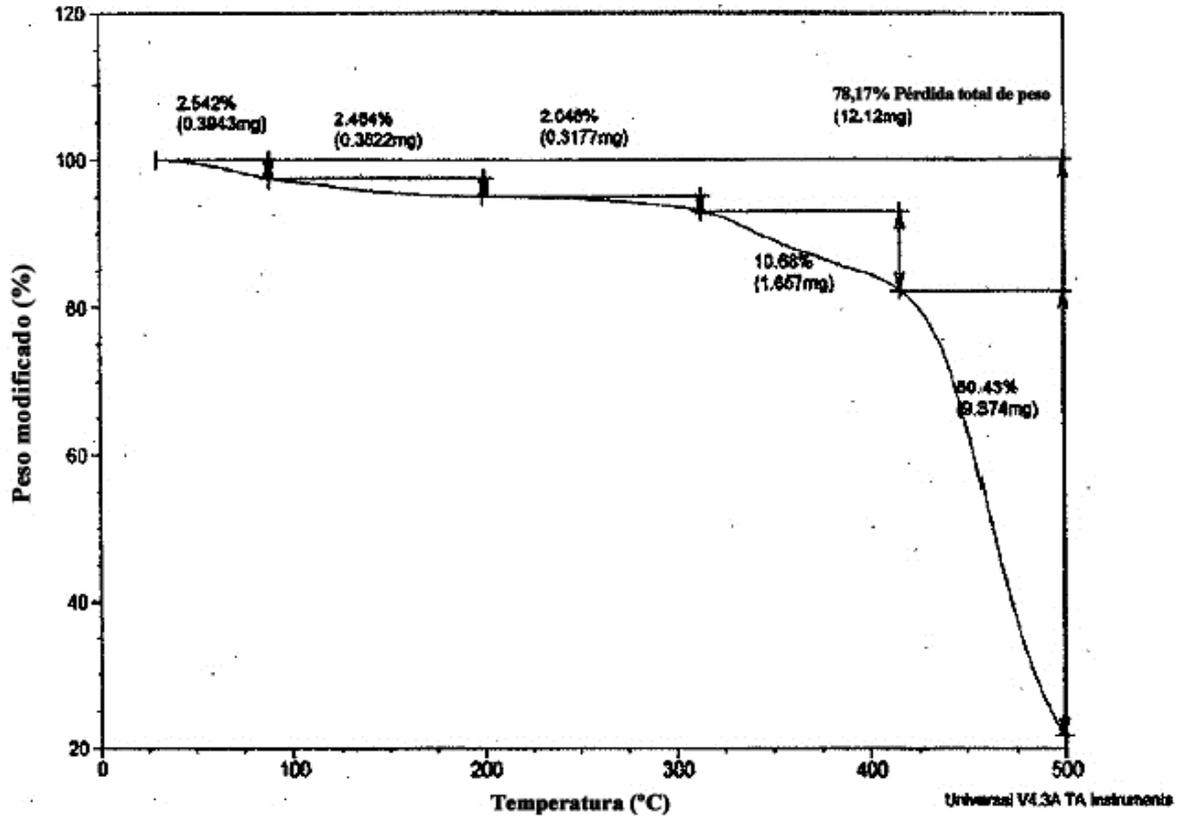


Figura 12: termograma de TGA de sal sódica del ácido asiático, AJF09, 99b

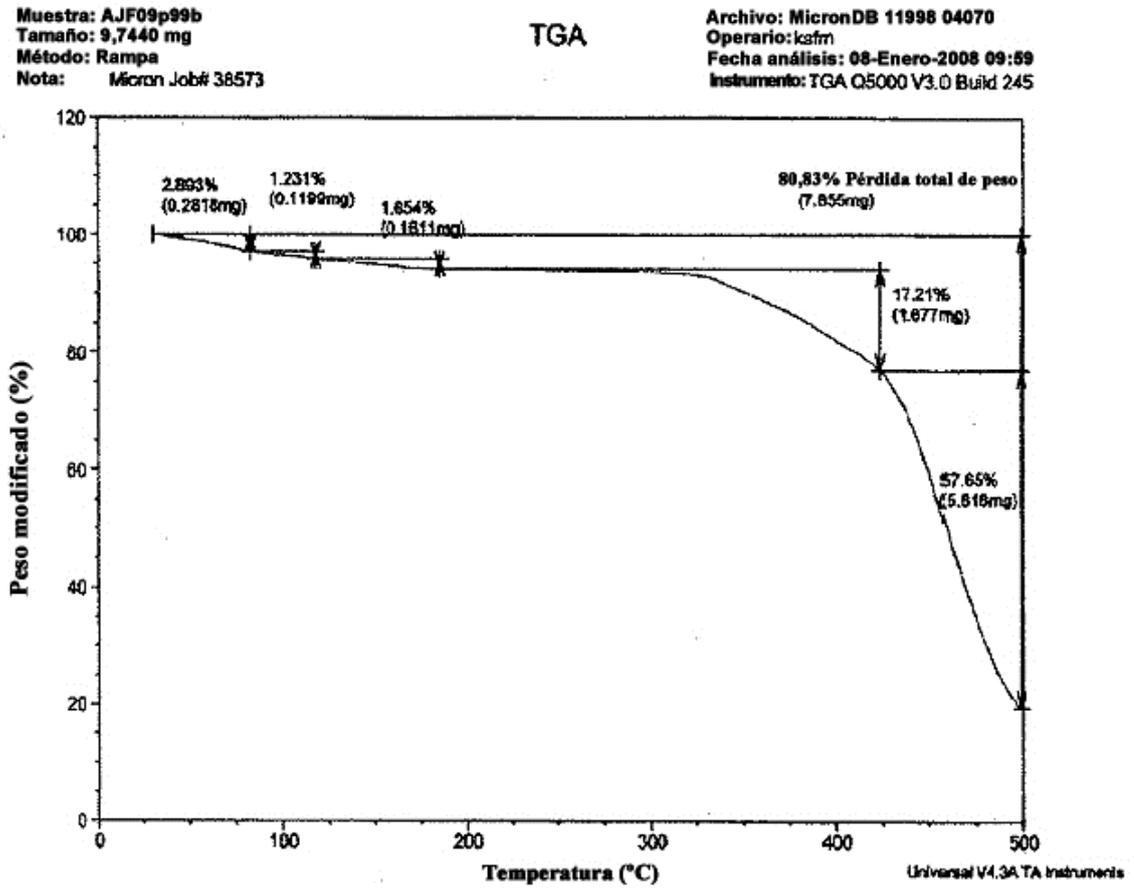


Figura 13: Curva de linealidad estándar

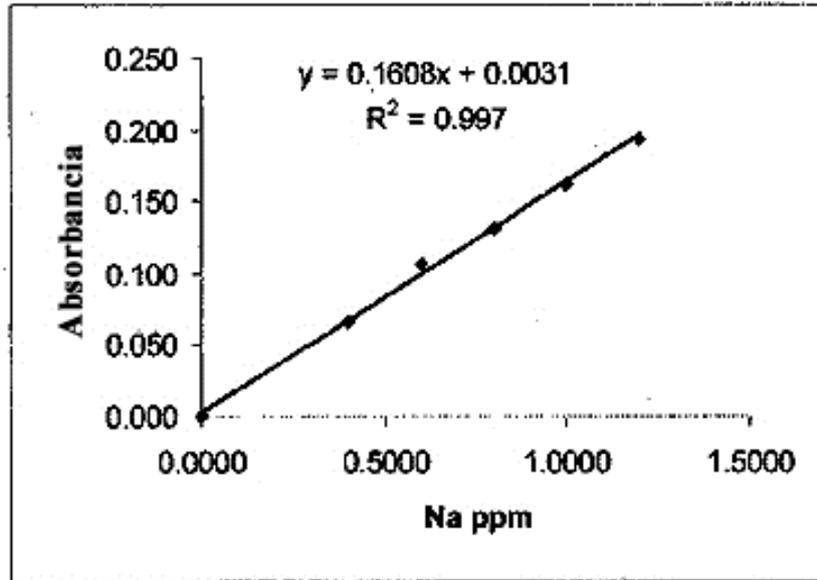


Figura 14: resumen del procedimiento de producción de asiaticósido

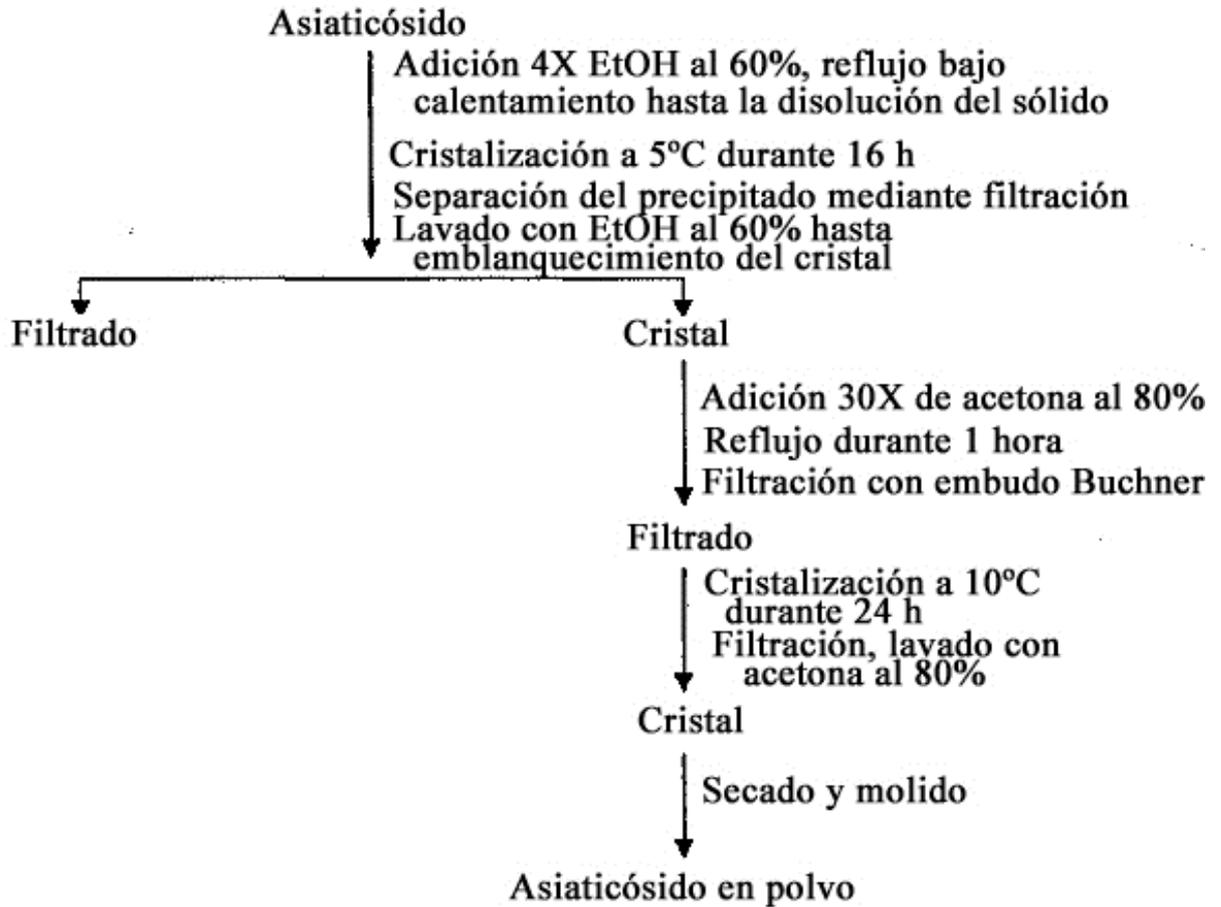
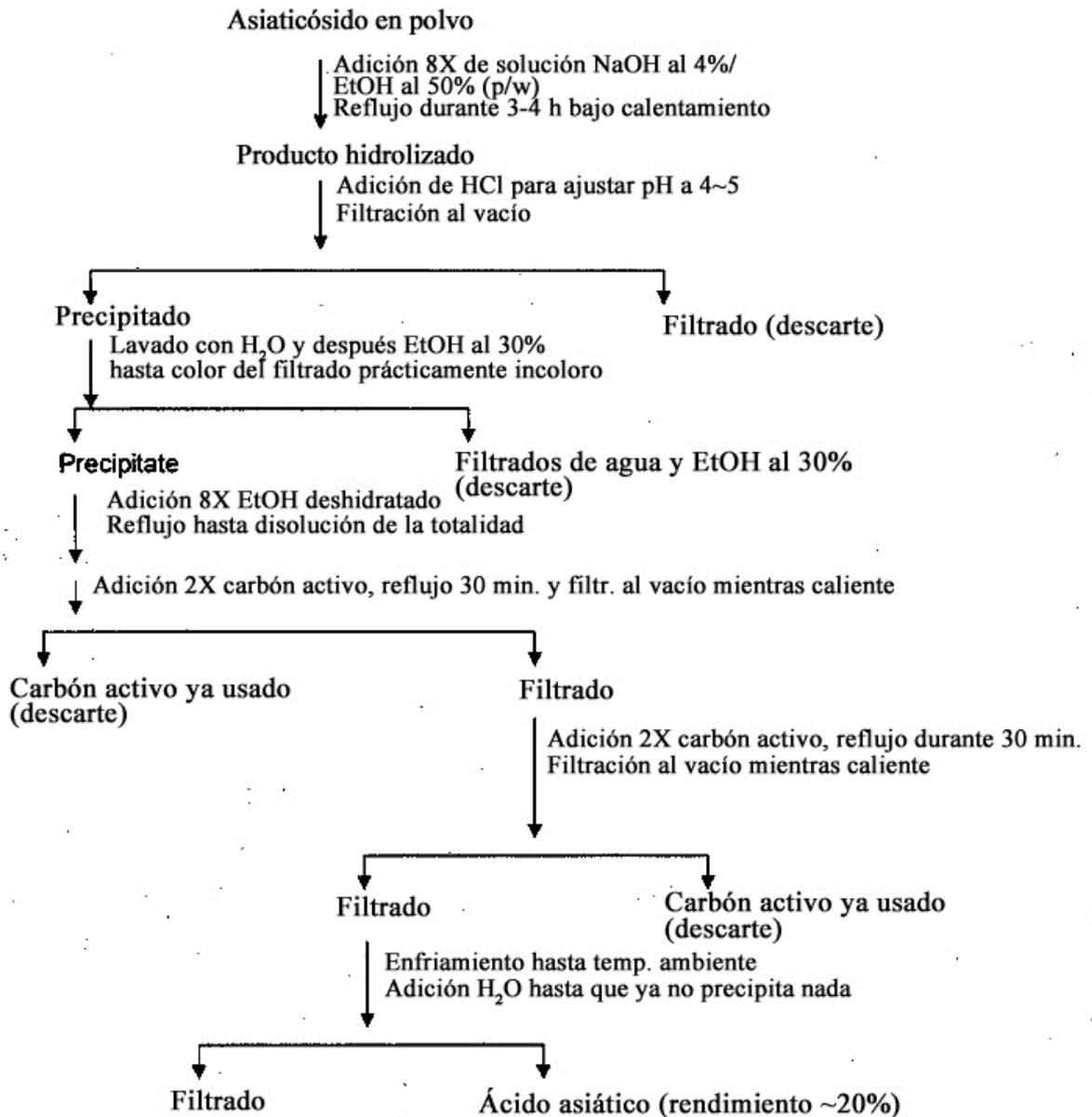


Figura 15: resumen del procedimiento de producción de ácido asiático de grado farmacéutico



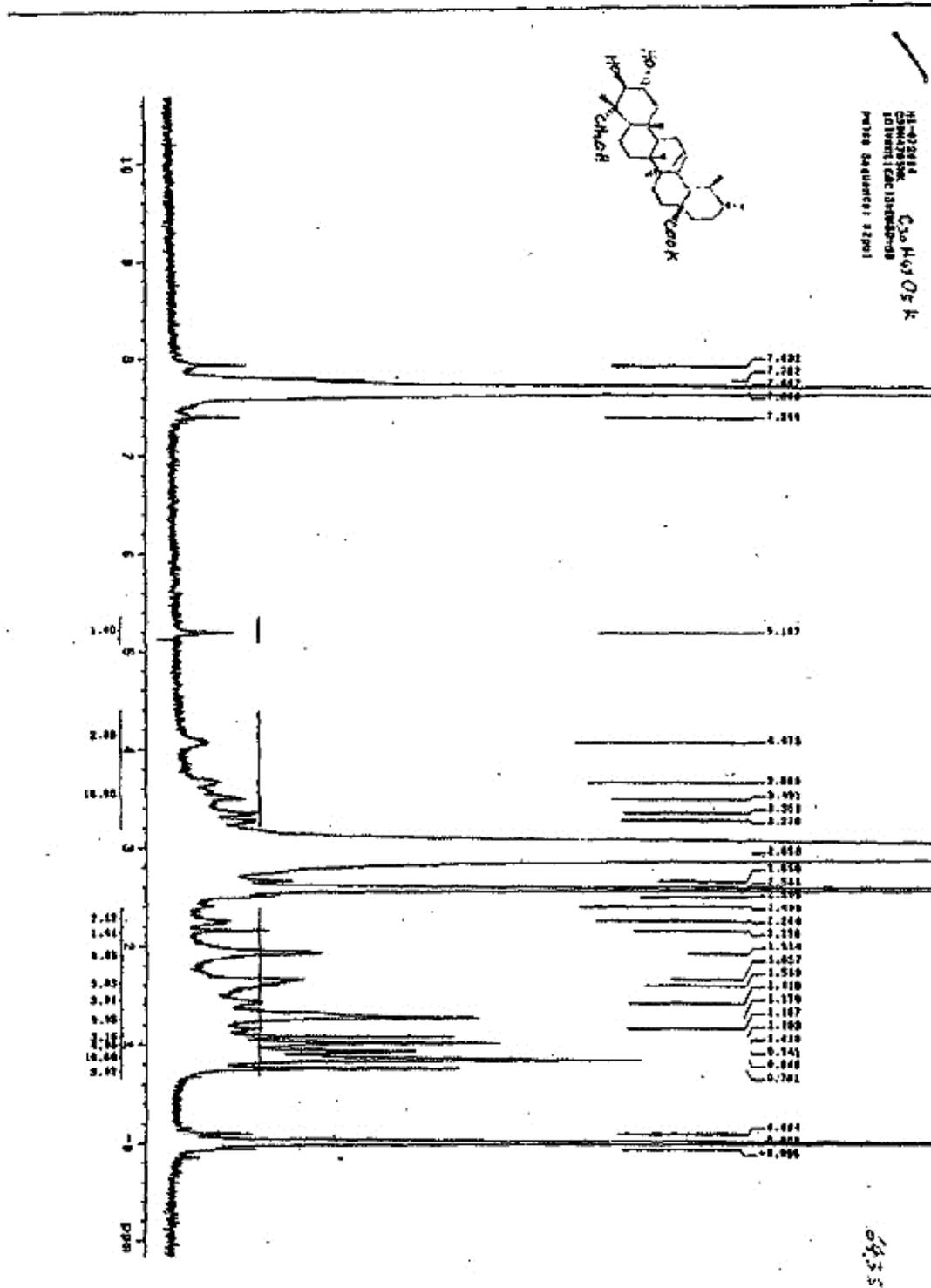


FIG. 16a

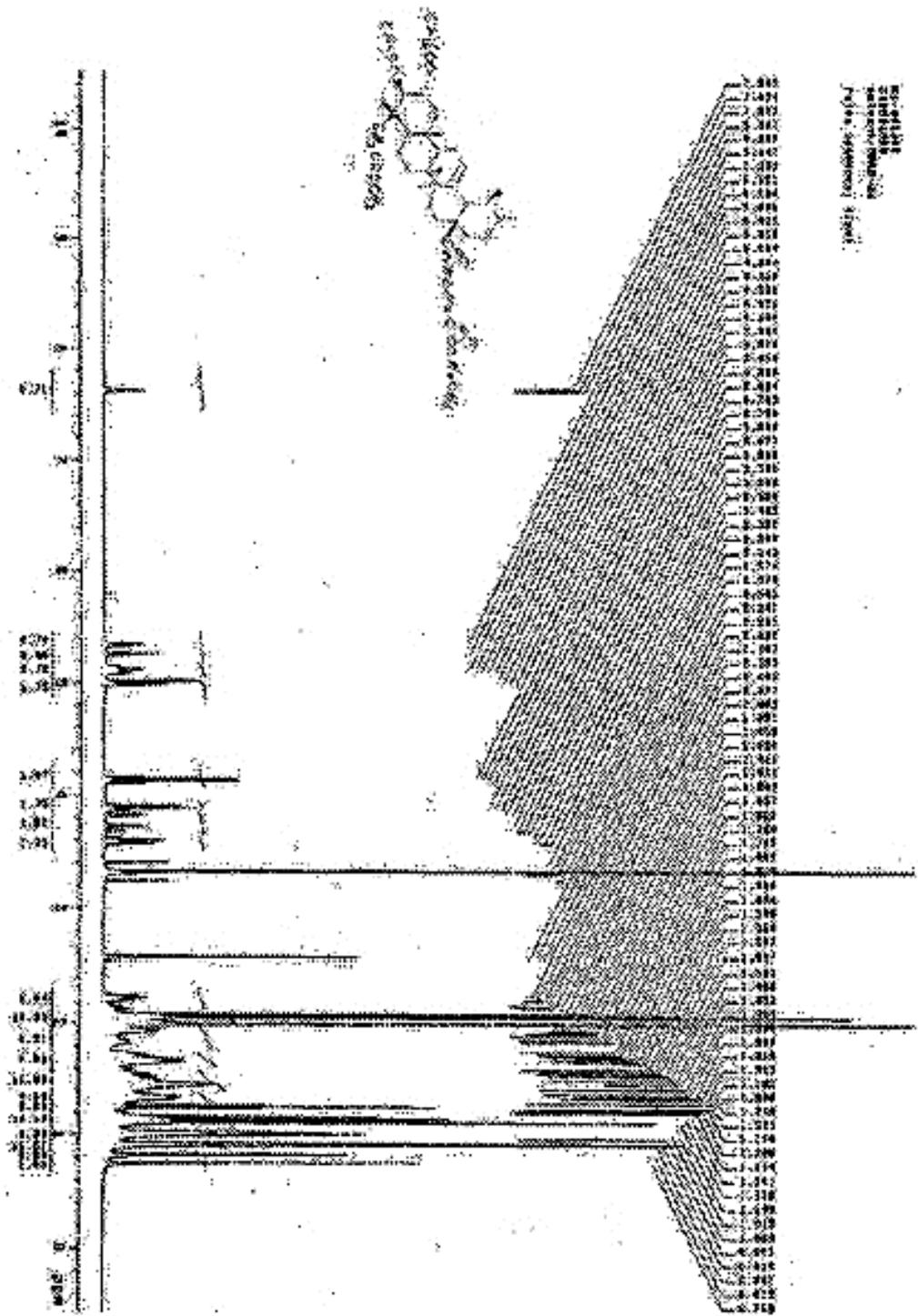


FIG 16d

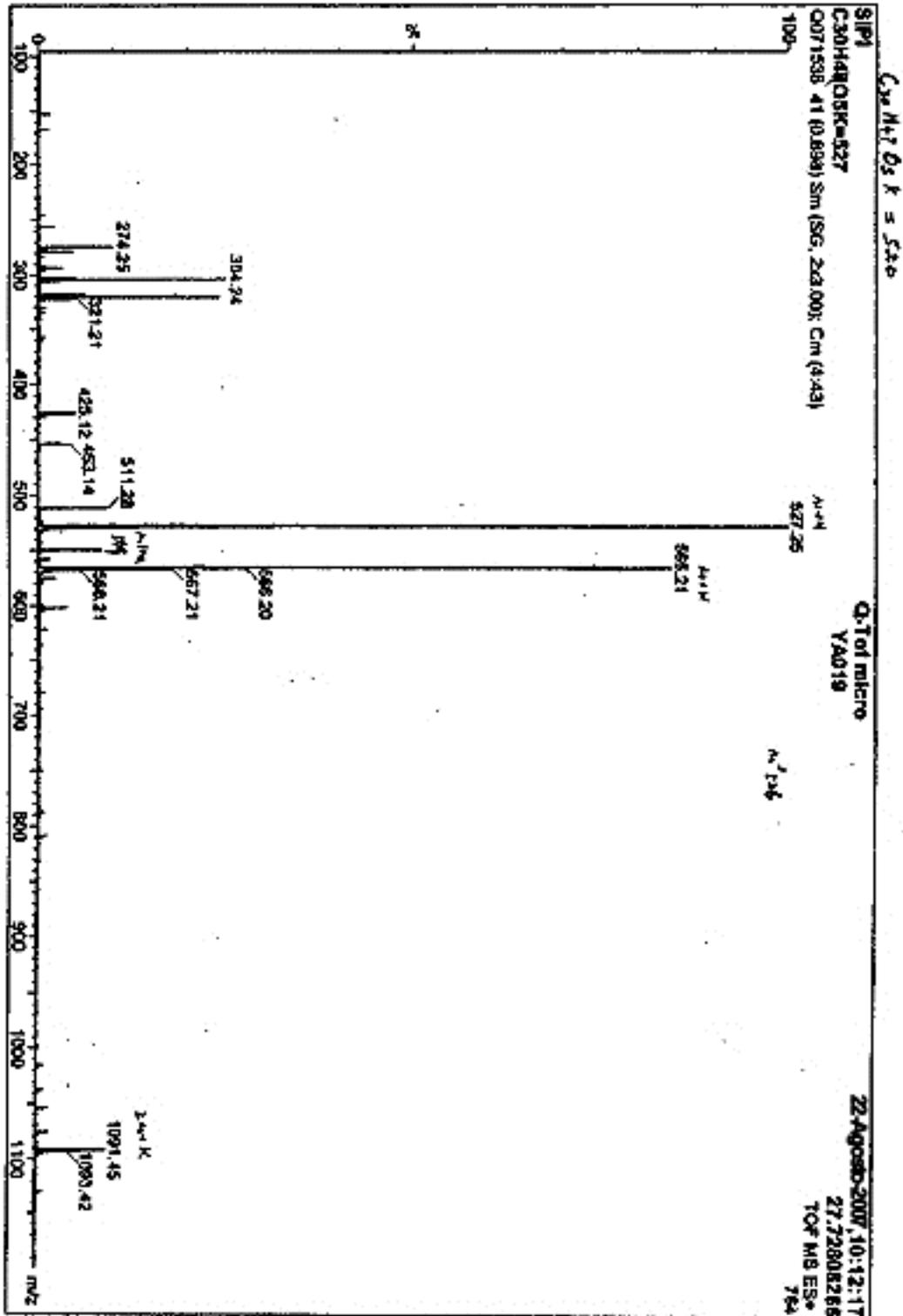


FIG. 17a

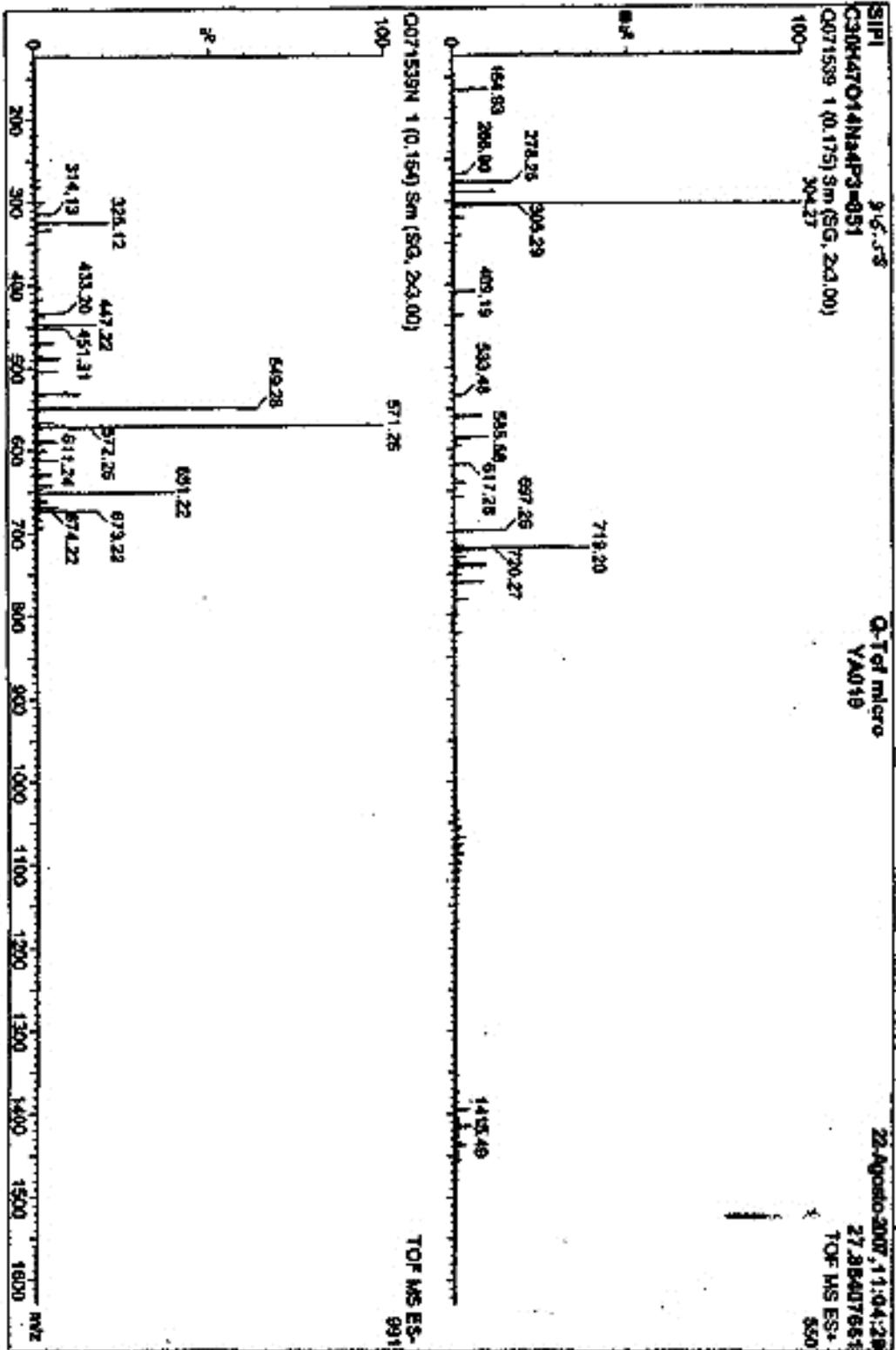


FIG. 17c

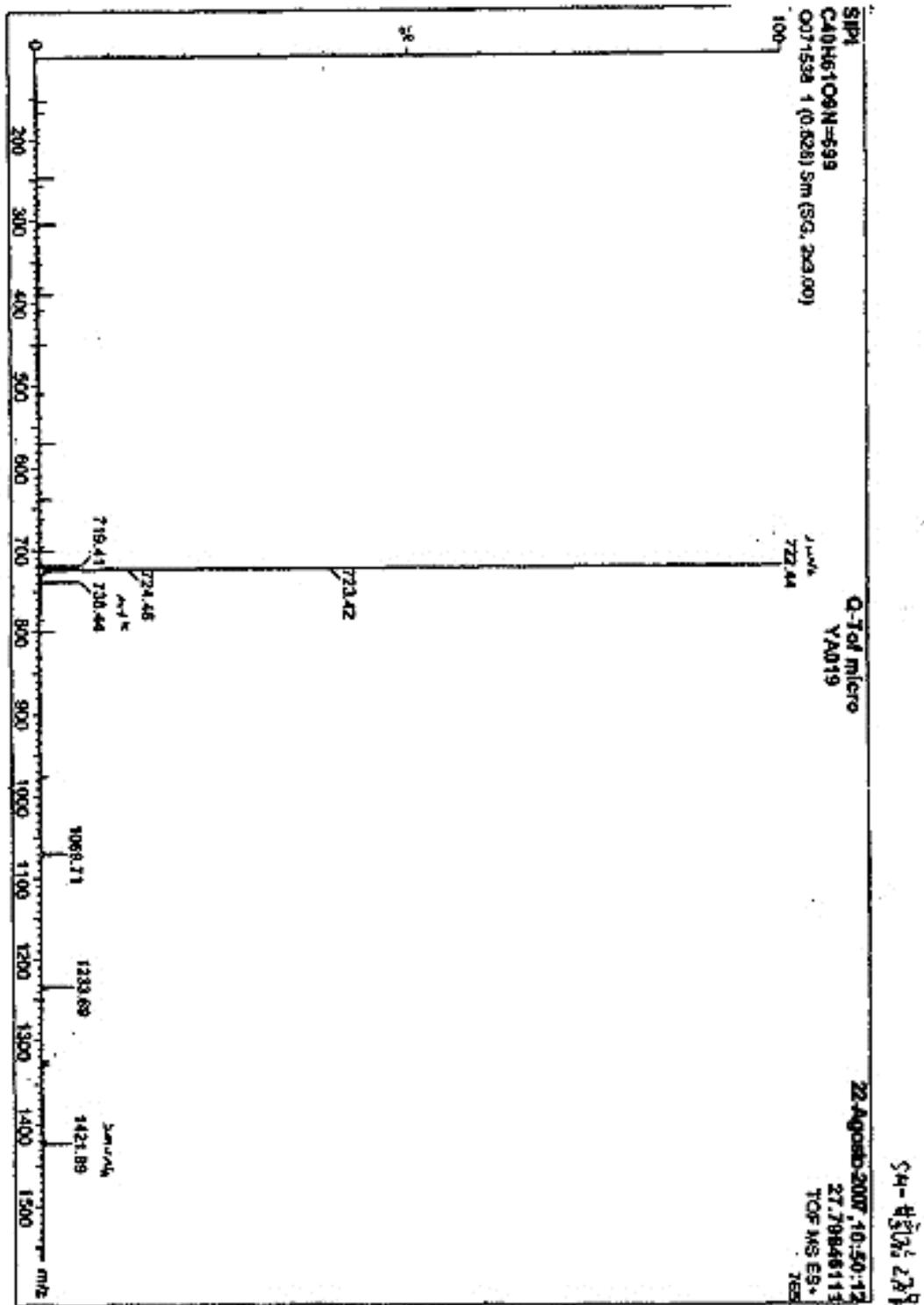


FIG. 17d