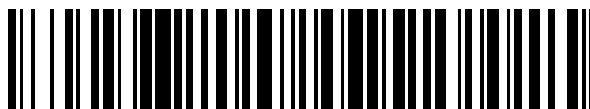


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 190**

51 Int. Cl.:

A61K 31/728 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 27/04 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2008** **PCT/FR2008/000959**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2009** **WO09024677**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2008** **E 08827623 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 2167102**

54 Título: **Utilización de ácido hialurónico para la preparación de composiciones destinadas a la mejora de la función de protección de la piel, del ojo y de las mucosas**

30 Prioridad:

23.07.2007 FR 0705349

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2016

73 Titular/es:

**AGRO INDUSTRIE RECHERCHES ET
DEVELOPPEMENTS (A.R.D.) (50.0%)
ROUTE DE BAZANCOURT
51110 POMACLE, FR y
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BRESIN, ANTHONY;
PUCELLE, EDITH;
ZAHM, JEAN-MARIE y
MILLIOT, MAGALI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

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

ES 2 588 190 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

Utilización de ácido hialurónico para la preparación de composiciones destinadas a la mejora de la función de protección de la piel, del ojo y de las mucosas.

La presente invención se refiere a la utilización de ácido hialurónico para la preparación de composiciones destinadas a la mejora de la función de protección del ojo y de las mucosas, en particular de las vías aéreas superiores e inferiores y de la mucosa intestinal.

La mucosa de las vías aéreas y la mucosa intestinal, la piel y el ojo están recubiertas de un epitelio de superficie que forma un revestimiento continuo y que constituye una barrera física de protección cuya eficacia depende de un equilibrio entre los factores de agresión y los numerosos mecanismos de defensa de los cuales dispone este epitelio.

Entre estos mecanismos, el epitelio de superficie desempeña una función clave en unos mecanismos de defensa tales como la reacción inflamatoria, la respuesta inmunitaria, el transporte transepitelial de electrolitos y la secreción de moléculas con actividad anti-infecciosa. La mayoría de estas funciones exigen el mantenimiento de una interacción y de una polaridad celular. Cualquier alteración del epitelio puede conllevar unas disfunciones de estos mecanismos de defensa.

Así, durante los fenómenos inflamatorios bronquiales, agudos o crónicos, una alteración de la eficacia del transporte mucociliar, en relación con la inhalación de numerosos agentes infecciosos (bacterias, virus, etc.) o no infecciosos (partículas, contaminación atmosférica o profesional), puede inducir una alteración de la integridad de la barrera epitelial y provocar unas lesiones más o menos importantes del epitelio respiratorio. Estas lesiones pueden variar desde la pérdida de la capacidad de unión de la barrera epitelial hasta una descamación epitelial completa.

La reepitelización de la superficie del epitelio respiratorio después de una lesión es, en primer lugar, dependiente de la superficie y de la migración de las células alrededor de la zona lesionada (Zahm *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol 1991, 5: 242-248; Hérard *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol 1996, 15: 624-632). Esta reepitelización debe acompañarse de una restauración de la función de defensa de la barrera epitelial.

Los complejos de unión de las células epiteliales desempeñan también una función preponderante en el mantenimiento de la integridad epitelial.

La función de barrera epitelial está asegurada por tres tipos principales de complejos de unión:

- 1) las uniones estrechas y las uniones intermedias que forman unos cinturones de anclaje intracelulares,
- 2) los desmosomas que están situados en la interfaz entre las células basales y las células cilíndricas de superficie, y
- 3) las uniones comunicantes que son unas vías de transducción de señales intracelulares.

Las uniones estrechas forman una barrera selectiva que regula el paso de los iones y moléculas a través del espacio paracelular. En microscopía electrónica, se constata que las uniones estrechas forman una serie de puntos de fusión entre las capas externas de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes. Estas zonas de contacto membranario aparecen, por criofractura, en forma de una red continua que rodea el ápice de cada célula. Esta red está constituida por polímeros de proteínas membranarias, las claudinas y la ocludina que están unidas a su vez a unas proteínas citoplásmicas entre las cuales se encuentran en particular las proteínas de la *zonula ocludens* (ZO-1 a 3). La ocludina, las claudinas, así como las ZO-1, son frecuentemente el objetivo de las toxinas bacterianas, que llevan a una alteración de la organización y de la función de las uniones estrechas (Coraux *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol 2004, 5: 605-612).

Entre los complejos de unión, las uniones comunicantes están implicadas en la transmisión de moléculas de una célula a otra. Están constituidas por un ensamblaje jerarquizado de conexinas que están agrupadas en una unidad hexamérica, el conexón. Cada conexón está asociado al conexón de una célula próxima para formar un túnel de 2 a 4 nm que permite el paso de moléculas de pequeño tamaño.

Además de estos complejos de unión que aseguran la protección del epitelio, y con el fin de prevenir la colonización y la infección por microorganismos inhalados, el epitelio respiratorio mantiene, gracias a la producción de péptidos y de moléculas con actividad bactericida, un entorno estéril. Entre estos agentes anti-bacterianos segregados por las células epiteliales respiratorias, se ha demostrado que el inhibidor de leucoproteínasa (SLPI) era capaz de inducir la muerte de bacterias gram-negativas y gram-positivas.

A pesar de que la alteración de las funciones de defensa de las uniones estrechas sea inicialmente la consecuencia del proceso infeccioso, se admite también que la inflamación importante que acompaña la infección puede ser el origen de las modificaciones de permeabilidad de la barrera epitelial.

Las citoquinas representan una familia de moléculas polipeptídicas solubles de baja masa molecular liberadas por células muy numerosas activadas a lo largo de los procesos inmunitarios e inflamatorios. Entre estas citoquinas, la interleucina 8 (IL-8) aumenta en las enfermedades inflamatorias e infecciosas. El poder quimio-atrayente de la IL-8 frente a los neutrófilos constituye un mecanismo de defensa adecuado para la mayoría de las situaciones patológicas, pero una respuesta exagerada de los neutrófilos puede exacerbar la alteración de las funciones de defensa del epitelio respiratorio (Tirouvanziam *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 2: 121-127).

La restauración de estas funciones de defensa, después de una agresión del epitelio, es por lo tanto una etapa importante en el mantenimiento de las funciones de barrera del epitelio y la puesta en evidencia de moléculas susceptible de favorecer esta restauración representa por lo tanto una meta importante.

Actualmente, el tratamiento de las agresiones del epitelio consiste, sobre todo, en un tratamiento sintomático: broncodilatadores, antiinflamatorios, antibióticos, mucorreguladores.

La patente francesa FR 2 847 818 describe un ácido hialurónico, su modo de preparación y su aplicación en una composición que presenta una actividad terapéutica en particular frente a las afecciones respiratorias de las vías aéreas superiores.

El ácido hialurónico descrito en esta patente presenta un peso molecular de como máximo 10^5 Da. El ácido hialurónico se utiliza en particular en el marco del tratamiento de las afecciones respiratorias de las vías aéreas superiores (reparación del epitelio respiratorio).

La patente US nº 6.806.259 describe una preparación de ácido hialurónico de peso molecular de 50000 a 200000 Daltons. Esta preparación se administra por vía oral como complemento nutricional para suavizar la piel humana.

La solicitud US 2006/166930 se refiere a una composición farmacéutica que contiene ácido hialurónico acetilado para el tratamiento de la sequedad del ojo. El peso molecular del ácido hialurónico acetilado es preferentemente de 10000 a 1000000 Daltons.

La patente US nº 5.166.331 describe dos fracciones de ácido hialurónico, una de peso molecular de 50000 a 100000 (hialastina) utilizada para la cicatrización, y la otra de peso molecular de 500000 a 730000 (hialectina) utilizada para inyecciones intraoculares e intra-articulares.

Las solicitudes DE 10 360 425, WO 03/053452 y WO 03/049747 se refieren a la utilización de ácido hialurónico de peso molecular de 50000 a 10000000 Daltons, sal de ácido hialurónico y/o sus derivados para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de las complicaciones oftálmicas y/o rítmicas.

Ninguno de estos documentos, que utilizan el ácido hialurónico, describe la restauración de las funciones de defensa de los complejos de unión después de una agresión del epitelio y, hasta ahora, sólo unas citoquinas como, por ejemplo, el TGF-beta o los glucocorticoides, han sido descritas como capaces de aumentar la expresión de las moléculas de adherencia intracelulares.

Uno de los objetos de la invención es la utilización de ácido hialurónico de bajo peso molecular, de 30000 a 45000 Daltons para estimular los mecanismos implicados en la restauración de las funciones de defensa y que presentan una actividad de protección y/o de mejora de las funciones de protección de la mucosa respiratoria, de la mucosa intestinal, o del ojo, en el caso de agresiones que proceden de agentes físicos, químicos o microbiológicos.

Otro objetivo de la invención es proporcionar unas composiciones farmacéuticas que contienen ácido hialurónico para la preparación de un medicamento destinado a la prevención de patologías seleccionadas de entre el asma, las alergias respiratorias, el síndrome de dificultad respiratoria.

Otro objetivo de la invención es proporcionar unas composiciones que contienen ácido hialurónico destinadas a la mejora de la función de protección del ojo en el marco de trastornos oculares.

Otro objetivo de la invención es proporcionar unas composiciones alimenticias que contienen ácido hialurónico destinado a la mejora de la función de protección de la mucosa intestinal en el marco de los trastornos digestivos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos un ácido hialurónico de 30000 a 45000 Daltons de peso molecular de preferentemente 40000 Daltons, o de sus sales correspondientes, para la preparación de composiciones destinadas a la protección y/o a la restauración de la integridad de la mucosa de las vías aéreas superiores e inferiores, de la mucosa intestinal, o del ojo, en el caso de agresiones que proceden de agentes físicos, químicos o microbiológicos, y en los que las células epiteliales están implicadas, en particular los complejos de unión de éstas.

Por debajo de 30000 Daltons, el ácido hialurónico se vuelve inflamatorio (US nº 5.166.331) y por encima de 45000,

el ácido hialurónico pierde su actividad.

La expresión "sales correspondientes" designa las sales de sodio, potasio, litio, calcio, bario, estroncio, magnesio, aluminio, amonio o amonio sustituido.

La expresión "mucosa respiratoria" designa el epitelio de las vías aéreas superiores e inferiores, que es pseudoestratificado, y está constituido por las células ciliadas, por células calciformes, por células basales, por células en cepillo y por células neuro-endocrinas, así como el corión, que está muy vascularizado y comprende numerosas fibras elásticas.

La expresión "vías aéreas superiores" comprende las fosas nasales, la faringe y la laringe y la expresión "vías aéreas inferiores" comprende la tráquea, los bronquios y los bronquiolos.

La expresión "mucosa intestinal" designa la parte interior del tubo digestivo y comprende:

- el epitelio que está formado, a partir del estómago, por una sola capa de células unidas las unas a las otras por unas uniones oclusivas a nivel del borde de su superficie apical; unas células exocrinas que segregan unas mucosas en la luz así como unas células endocrinas que liberan unas hormonas en la sangre, están incluidas en la capa epitelial,
- la lámina propia, capa de tejido conjuntivo suelto, muy rico en capilares sanguíneos y linfáticos, en leucocitos, y otras células del sistema de defensa contra los microorganismos, que son susceptibles de atravesar el epitelio,
- la *muscularis mucosae* de capa delgada de células musculares lisas que, al contraerse, pueden modificar los pliegues del epitelio.

La expresión "agentes físicos" designa, de manera general, unas fuentes de energía capaces de causar lesiones o enfermedades. Son en particular el ruido, las vibraciones, las radiaciones (ionizantes, tales como los rayos X y gamma, u ópticos tales como radiaciones ultravioletas, radiaciones láser y luces infrarrojas), las ondas (por ejemplo, microondas o radiofrecuencia) y las temperaturas y presiones extremas.

La expresión "agentes químicos" designa los productos químicos (no peligrosos, peligrosos, peligrosos no CMR (cancerígeno mutagénico y reprotóxico), peligroso CMR) así como los compuestos contenidos en la contaminación atmosférica (los polvos, el SO₂, los NO_x, el CO, los metales pesados, los compuestos orgánicos volátiles, el flúor, el ácido clorhídrico, etc., los gases de efecto invernadero tales como el CO₂, el CH₄, el N₂O, los CFC, HFC, PFC y SF₆ y otras sustancias tales como el ozono, los organoclorados (dioxinas y furanos), los HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos), etc.

La expresión "agentes microbiológicos" designa unos agentes presentes en el aire, la comida y el agua potable, en particular las bacterias, los protozoos, los virus y los hongos, y pueden ser el origen de diversas enfermedades.

Según un modo de realización preferido, la concentración del ácido hialurónico utilizado anteriormente, es de 0,1 g/l a 4 g/l, y preferentemente de 0,2 a 1 g/l.

Por debajo y por encima de esta concentración, el ácido hialurónico se vuelve inactivo. Según otro modo de realización preferido, la presente invención se refiere a la utilización de por lo menos un ácido hialurónico definido anteriormente para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de patologías provocadas por las agresiones que proceden de agentes físicos, químicos o microbiológicos.

Según un modo de realización particularmente preferido, la presente invención se refiere a la utilización de un ácido hialurónico definido anteriormente, para la preparación de composiciones cosméticas y alimenticias.

Según otro modo de realización, el ácido hialurónico definido anteriormente se utiliza para la preparación de un medicamento destinado a la prevención de patologías tales como el asma, las alergias respiratorias, el síndrome de dificultad respiratoria, en las que las células epiteliales implicadas son unas células de la mucosa de las vías aéreas superiores e inferiores.

El asma es una enfermedad de los bronquios que, en crisis, conlleva dificultades para inspirar y, sobre todo, para expirar el aire de los pulmones. Las crisis pueden ser iniciadas por diferentes factores como el esfuerzo, la humedad o el polvo u otros alérgenos tales como los contaminantes atmosféricos.

Las alergias respiratorias son unas enfermedades iniciadas por unos alérgenos tales como los ácaros que son responsables del 70 al 80% de las asma alérgicas del niño.

Entre los otros neumoaérgenos (alérgenos que penetran en el organismo por vía respiratoria) el entorno interior, los

animales domésticos (gato, perro, roedores), las cucarachas, los mohos, son una fuente frecuente de alergia respiratoria.

En el entorno exterior, los contaminantes atmosféricos, los mohos atmosféricos también pueden estar involucrados.

5 Unos alérgenos profesionales pueden también ser responsables de sensibilizaciones y alergias respiratorias (fuentes más frecuentes: harina, animales de laboratorio, látex, etc.).

10 El síndrome de dificultad respiratoria es una dificultad respiratoria que pone en juego el pronóstico vital, debido a una agresión pulmonar aguda. Está provocado por diferentes factores tales como la aspiración de hidrocarburos, la inhalación de compuestos irritantes (cloro, NO₂, humos, ozono, oxígeno de alta concentración, humos metálicos, gas mostaza), unos herbicidas tales como el paraquat u opiáceos (tales como la heroína, la morfina, el dextropropoxifeno, o la metadona).

15 El ejemplo 1 siguiente muestra que el ácido hialurónico de la invención provoca un aumento de la funcionalidad de las uniones comunicantes y permite por lo tanto prevenir así las enfermedades, provocadas en particular por los contaminantes atmosféricos.

20 Según otro modo de realización, el ácido hialurónico definido anteriormente se utiliza para la preparación de una composición destinada a la mejora de la función de protección de la mucosa intestinal en el marco de trastornos digestivos, en particular las gastroenteritis, las necrosis isquémicas y las ulceraciones de la mucosa intestinal, en las que las células epiteliales implicadas son unas células de la mucosa intestinal.

25 Los trastornos digestivos agrupan múltiples síntomas que pueden alcanzar todos los órganos del tubo digestivo. Los trastornos digestivos observados tienen por origen una disfunción de estos órganos.

Las gastroenteritis son unas infecciones inflamatorias caracterizadas por la emisión brutal y frecuente de heces líquidas y abundantes.

30 La necrosis isquémica es una necrosis de coagulación por falta de vascularización que conlleva la momificación de los elementos celulares presentes.

Las ulceraciones de la mucosa intestinal conllevan la destrucción de la mucosa intestinal por invasión del epitelio intestinal.

35 Según otro modo de realización, el ácido hialurónico definido anteriormente se utiliza para la preparación de una composición destinada a la mejora de la función de protección del ojo en el marco de trastornos oculares, en particular el estrés hídrico, la sequedad del ojo, las lesiones de la córnea y las queratopatías, en las que las células epiteliales implicadas son unas células del ojo, y en particular de la córnea.

40 La expresión "estrés hídrico" designa un déficit del agua del globo ocular.

45 Si las lágrimas son deficientes en algunos de los componentes importantes tales como el sebo, o si su producción es insuficiente, la película lagrimal puede degradarse. Se forman entonces unos puntos secos en la córnea que causan los síntomas de la sequedad ocular: picores, sensaciones de ardor, de cuerpo extraño y molestia general.

La expresión "lesiones de la córnea" designa un defecto superficial del epitelio de la córnea provocado por abrasión o fricción, habitualmente debido a un traumatismo o cuerpo extraño en el ojo.

50 El término "queratopatías" designa cualquier enfermedad que se refiere a la córnea, de origen traumático, químico, infeccioso o genético. Las enfermedades de la córnea son muy numerosas y se traducen por una pérdida de transparencia que pueden conllevar una pérdida más o menos completa y duradera de la visión, según la causa y el sitio de las lesiones.

55 En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un ácido hialurónico de 30000 a 45000 de peso molecular, preferentemente de 40000 Daltons, o sus sales correspondientes a una concentración de 0,1 g/l a 1 g/l en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 En un modo de realización preferido, la composición farmacéutica definida anteriormente está formulada para ser administrada por vía tópica a una dosis comprendida de 50 mg/d a 300 mg/d, preferentemente de 100 mg/d a 200 mg/d o a una dosis por vía oral comprendida de 0,66 mg/kg/d a 4 mg/kg/d, preferentemente de 1,33 mg/kg/d a 2,66 mg/kg/d.

65 Según otro modo de realización, la composición farmacéutica definida anteriormente se presenta en forma gastrorresistente.

La expresión "forma gastrorresistente" se refiere a una composición que está en forma de vehículo gastrorresistente, es decir que el ácido hialurónico es protegido de la acidez del estómago.

El vehículo gastrorresistente fisiológicamente estable se selecciona de entre: los microgránulos gastrorresistentes, los microgránulos recubiertos de una película gastrorresistente, las nanopartículas, o nanoesferas gastrorresistentes, las microesferas gastrorresistentes, las microcápsulas gastrorresistentes, los granulados gastrorresistentes, los granulados recubiertos de una película gastrorresistente, los liposomas gastrorresistentes, los liposomas recubiertos de una película gastrorresistente, los liofilizados gastrorresistentes, los liofilizados recubiertos de una película gastrorresistente, las bombas osmóticas en un revestimiento gastrorresistente, las gomas, los esferoides gastrorresistentes, las esférulas gastrorresistentes, los esferoides recubiertos de una película gastrorresistente, las esférulas recubiertas con una película gastrorresistente, los comprimidos gastrorresistentes, las cápsulas duras recubiertas con una película gastrorresistente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición alimenticia que comprende un ácido hialurónico de 30000 a 45000 de peso molecular, preferentemente 40000 Daltons, o sus sales correspondientes a una concentración de 0,1 g/l a 1 g/l.

En un modo de realización preferido, la composición alimenticia definida anteriormente, está formulada para ser administrable por vía oral a una dosis comprendida de 50 mg/d a 300 mg/d, preferentemente de 100 mg/d a 200 mg/d.

Un ejemplo de composición alimenticia se presenta en el ejemplo 4.

En un modo de realización preferido, la composición alimenticia definida anteriormente se presenta en forma gastrorresistente.

Una composición alimenticia gastrorresistente puede presentarse en forma de comprimidos, de cápsulas duras, de bolsitas, o de granulados gastrorresistentes.

Descripción de las figuras

La figura 1 representa la inmunolocalización de la proteína de unión ZO-1. En las zonas de células confluentes, la localización de ZO-1 no es diferente en función de si las células han sido incubadas o no con ácido hialurónico, pero la red formada por ZO-1 es más densa cuando las células han sido incubadas con el ácido hialurónico (A, B). Por el contrario, a nivel de las células situadas en periferia de cultivo y que son desdiferenciadas, se observa que la expresión de ZO-1 es más importante y más continua cuando las células son incubadas con el ácido hialurónico (D), en comparación con las células no incubadas con el ácido hialurónico (C). El mismo perfil de expresión se observa para la proteína de unión ocludina.

La figura 2 representa el efecto de la concentración de ácido hialurónico (eje de las abscisas) en la expresión membranaria de las proteínas ZO-1 y de ocludina (eje de las ordenadas). Las columnas en blanco corresponden a la ocludina y las columnas en gris a ZO-1. Las estrellas indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control sin ácido hialurónico.

La figura 3 representa el efecto del ácido hialurónico (eje de las abscisas) sobre la funcionalidad de las uniones comunicantes (eje de las ordenadas), la columna en blanco corresponde al control sin ácido hialurónico y la columna en gris corresponde al ácido hialurónico a 5 mg/ml. La estrella indica un resultado estadísticamente significativo ($p < 0,05$) con respecto al control.

La figura 4 representa el efecto de la concentración de ácido hialurónico y del tiempo de cultivo de las células epiteliales respiratorias (eje de las abscisas) en la resistencia transepitelial (eje de las ordenadas). Un aumento significativo ($p < 0,02$) de la resistencia transepitelial se observa en función del tiempo y de la concentración de ácido hialurónico.

La figura 5 representa el efecto de la concentración de ácido hialurónico (eje de las abscisas) sobre la expresión de las proteínas ocludinas de células de piel (eje de las ordenadas). Los diagramas corresponden a las mediciones de intensidad de la expresión de la actividad de la peroxidasa. Los valores son las medias de tres puntos.

La figura 6 representa el efecto de la concentración de ácido hialurónico (eje de las abscisas) sobre la expresión de las proteínas ZO-1 de células de piel (eje de las ordenadas). Los diagramas corresponden a las mediciones de intensidad de la expresión de la actividad de la peroxidasa. Los valores son las medias de tres puntos.

La figura 7 representa el efecto de la concentración de ácido hialurónico (eje de las abscisas) sobre la expresión de las proteínas ocludinas de células intestinales (eje de las ordenadas). Los diagramas siguientes corresponden a las mediciones de intensidad de la expresión de la actividad de la peroxidasa. Los valores son las medias de

tres puntos.

La figura 8 representa el efecto de la concentración de ácido hialurónico (eje de las abscisas) en la expresión de las proteínas ZO-1 de células intestinales. Los diagramas siguientes corresponden a las mediciones de intensidad de la expresión de la actividad de la peroxidasa. Los valores son las medias de tres puntos.

Parte experimental

Ejemplo 1: Ejemplo de aumento sobre unas células epiteliales respiratorias de la expresión de las proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad epitelial por la utilización del ácido hialurónico descrito en la presente invención.

Unas células epiteliales respiratorias son cultivadas en anillos de restricción que contienen un medio DMEM/F12 suplementado con unos antibióticos, unos factores de crecimiento y con diferentes concentraciones de ácido hialurónico (0,1, 1, 5 o 10 mg/ml) o en ausencia de ácido hialurónico. En la confluencia, los anillos de restricción son retirados para permitir la migración de las células en la periferia de la zona de cultivo. Las células se fijan después y se incuban sucesivamente con los anticuerpos anti-ZO-1 o anti-occludina, después con un anticuerpo biotinilado y finalmente con estreptavidina acoplada con Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Las preparaciones se montan en una lámina de vidrio en una solución que permite prevenir el foto-blanqueamiento y se observan con la ayuda de un microscopio de fluorescencia con un aumento de x40 con el fin de visualizar la localización celular de las proteínas ZO-1 y occludina.

En otra serie de experimentos, se han realizado dos extracciones diferentes sobre unos cultivos de células: una extracción de proteínas totales y una extracción de proteínas membranas con el fin de evaluar la expresión de ZO-1 y de occludina mediante la técnica de transferencia Western.

La funcionalidad de las uniones estrechas se evaluó por la medición de la resistencia transepitelial: las células epiteliales respiratorias se cultivan en una caja de cultivo de doble compartimento, que permite la medición de la resistencia epitelial. Esta medición se realiza cada 24h con la ayuda de un doble electrodo que permite establecer una tensión constante entre el medio apical y el medio basal de la cámara de cultivo. La medición de la corriente inducida permite calcular la resistencia de la capa de células. El aumento de la resistencia trans-epitelial traduce la presencia de uniones estrechas funcionales.

La funcionalidad de las uniones comunicantes se evaluó utilizando unas técnicas de video-microscopía y una técnica de FRAP (fluorescent recovery after photobleaching): medición de la difusión de una sonda fluorescente por medio de las uniones comunicantes. (Abaci M *et al.*, Biotechnol J, 2007, 2: 50-61; Tedelind S, Eur J Endocrinol 2003, 149: 215-221).

Resultados:

Efecto del ácido hialurónico sobre la expresión de las proteínas de defensa

Expresión de ZO-1 y occludina evaluada por inmunocitoquímica

En las zonas de células confluentes, la localización de ZO-1 no es diferente en función de si las células han sido incubadas o no con el ácido hialurónico. Por el contrario, a nivel de las células situadas en la periferia de cultivo y si son desdiferenciadas, se observa que la expresión de ZO-1 es más importante y más continua cuando las células son incubadas con el ácido hialurónico, en comparación con las células no incubadas con el ácido hialurónico (figura 1).

El mismo perfil de expresión se observa para la proteína de unión occludina.

Expresión de ZO-1 y occludina evaluada mediante transferencia Western

Los porcentajes de expresión a nivel membranario de las proteínas de unión ZO1 y occludina en presencia de concentraciones crecientes de ácido hialurónico están representados en la figura 2. La cantidad de proteína medida en presencia de ácido hialurónico se expresa en función de la cantidad de proteína medida en ausencia de ácido hialurónico. Los valores representados corresponden a la media $\pm$ error estándar de 4 experimentos.

Se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión de la proteína ZO1 cuando las células son incubadas en presencia de ácido hialurónico a la concentración de 1 y 5 mg/ml. Se observa también un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión de occludina cuando las células se incuban en presencia de ácido hialurónico a la concentración de 1 mg/ml.

Análisis de la funcionalidad de las uniones comunicantes

La funcionalidad de las uniones comunicantes se ha evaluado gracias a la medición de la difusión intercelular de una molécula fluorescente. La figura 3 muestra que la incubación de las células epiteliales respiratorias en presencia de ácido hialurónico (5 mg/ml) induce un aumento significativo ($p < 0,05$) del índice de difusión, lo que se traduce por un aumento de la funcionalidad de las uniones comunicantes.

Ejemplo 2 (ejemplo de referencia): Ejemplo de aumento sobre unas células de piel de la expresión de las proteínas implicadas en el mantenimiento de la contigüidad celular por la utilización del ácido hialurónico descrito en la presente invención.

Unos queratinocitos normales humanos procedentes de explantes de cirugía plástica (Normal Human Epidermal Keratinocytes; NHEK) son incubados en un medio SFM (Invitrogen 17005075) complementado con los factores de crecimiento tales como EGF (Epidermal Growth Factor) 0,25 ng/ml, extraído de hipófisis 25 µg/ml (Invitrogen 37000015), gentamicina 25 µg/ml (Sigma G1397), 24 horas a 37°C y bajo un 5% de CO₂, después se elimina el medio y las células son puestas en presencia o no (control) de la molécula de ácido hialurónico de la invención. Las concentraciones de ácido hialurónico ensayadas son 0,1 mg/ml, 1 mg/ml y 5 mg/ml.

Después de 72 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se elimina el medio de cultivo, y después se aclaran las células con un tampón fosfato y después se congelan inmediatamente a -80°C.

Las proteínas totales expresadas por las células son extraídas y después puestas en contacto con un anticuerpo anti-ZO1 (Cliniscience 33-9100) y anti-occludina (Cliniscience 33-1500) acoplado con un sistema de detección que hace intervenir un segundo anticuerpo conjugado con una peroxidasa. La expresión de la coloración en presencia del sustrato de la peroxidasa da información sobre la expresión de los marcadores ZO1 y de occludina en función de la cantidad de HA presente en el medio.

En las figuras 4 y 5, se observa un aumento de la expresión de las proteínas de unión occludina y ZO-1 cuando las células son incubadas con el ácido hialurónico de la invención.

Cabe señalar que el máximo de expresión se obtiene a una concentración de 0,1 mg/ml para la occludina y 1 mg/ml para la proteína ZO-1.

La piel, que es uno de los órganos más expuestos a las agresiones múltiples del entorno, puede ser capaz de resistir mejor las agresiones diversas, tales como la contaminación atmosférica, cuando esta última está en contacto con HA de bajo peso molecular que permite aumentar la cohesión entre las células.

Ejemplo 3: Ejemplo de aumento sobre unas células intestinales de la expresión de las proteínas implicadas en el mantenimiento de la contigüidad celular mediante la utilización del ácido hialurónico descrito en la presente invención.

Unas células de colon humano (Epithelial Human Caucasian Colon adenocarcinoma R51, Caco-2) son incubadas en un medio MEM (Invitrogen 21090-022) complementado con aminoácidos no esenciales (Invitrogen 11140-035), Glutamina 2mM (Invitrogen 25030024), penicilina 50UI/ml, estreptomycin 50 µg/ml (Invitrogen 15070063) suero fetal de ternera al 10% (FCS, invitrogen 10270098), 24 horas a 37°C y con un 5% de CO₂, después el medio se elimina y las células son puestas en presencia o no (control) de la molécula de ácido hialurónico de la invención. Las concentraciones de ácido hialurónico ensayadas son 0,1 mg/ml, 1mg/ml y 5 mg/ml.

Después de 72 horas de incubación a 37°C y con el 5 % de CO₂, se elimina el medio de cultivo y después las células son aclaradas con un tampón fosfato y después son congeladas inmediatamente a -80°C.

Las proteínas totales expresadas por las células son extraídas y después puestas en contacto con un anticuerpo anti ZO1 (Cliniscience 33-9100) y anti-occludina (Cliniscience 33-1500) acoplado a un sistema de detección que hace intervenir un segundo anticuerpo conjugado con una peroxidasa. La expresión de la coloración en presencia del sustrato de la peroxidasa da información sobre la expresión de los marcadores ZO1 y occludina en función de la cantidad de HA presente en el medio.

En las figuras 6 y 7 se observa que la expresión de las proteínas de unión occludina y ZO1 está modulada por la presencia del ácido hialurónico de la invención.

La occludina se expresa en mayor cantidad a alta concentración de ácido hialurónico, mientras que en la proteína ZO1, la expresión máxima se observa a una concentración de 0,1 mg/ml.

El contacto entre las células del tracto digestivo por ingestión de ácido hialurónico de bajo peso molecular, por ejemplo, permite el aumento de la expresión de las proteínas de unión, lo cual traduce un refuerzo de las funciones de las defensas desempeñadas por la barrera epitelial.

Ejemplo 4: Se representa una composición alimenticia destinada a la mucosa intestinal que contiene la molécula de la invención mediante la fórmula siguiente:

Polímero de la invención	0,01% a 0,1%
Estearato de magnesio	0,1%
Excipiente: almidón de arroz	QSP1 gramo
Cápsula dura	Gelatina

REIVINDICACIONES

1. Utilización de por lo menos un ácido hialurónico de 30000 a 45000 Daltons de peso molecular, preferentemente 40000 Daltons, o de sus sales correspondientes, para la preparación de composiciones destinadas a la mejora de la función de protección de la mucosa intestinal en el marco de patologías de la mucosa intestinal seleccionadas de entre las gastroenteritis, las necrosis isquémicas y las ulceraciones de la mucosa intestinal, la mejora de la función de protección del ojo en el marco de trastornos oculares seleccionados de entre el estrés hídrico, la sequedad del ojo, las lesiones de la córnea y las queratopatías y en las que están implicadas las células epiteliales.
2. Utilización de por lo menos un ácido hialurónico de 30000 a 45000 Daltons de peso molecular, preferentemente 40000 Daltons, o de sus sales correspondientes, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención de las patologías de las vías aéreas superiores e inferiores seleccionadas de entre el asma, las alergias respiratorias y el síndrome de dificultad respiratoria.
3. Utilización de un ácido hialurónico según la reivindicación 1, a una concentración de 0,1 g/l a 4 g/l, preferentemente de 0,2 a 1 g/l.
4. Utilización de un ácido hialurónico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la composición es una composición alimenticia.
5. Composición farmacéutica, que comprende por lo menos un ácido hialurónico de 30000 a 45000 de peso molecular, preferentemente 40000 Daltons, o sus sales correspondientes, formulada para ser administrada por vía tópica a una dosis comprendida entre 50 mg/d y 300 mg/d, preferentemente entre 100 mg/d y 200 mg/d o a una dosis por vía oral comprendida entre 0,66 mg/kg/d y 4 mg/kg/d, preferentemente entre 1,33 mg/kg/d y 2,66 mg/kg/d para su utilización en la mejora de la función de protección de la mucosa intestinal en el marco de patologías de la mucosa intestinal seleccionadas de entre las gastroenteritis, las necrosis isquémicas y las ulceraciones de la mucosa intestinal, la mejora de la función de protección del ojo en el marco de los trastornos oculares seleccionados de entre el estrés hídrico, la sequedad del ojo, las lesiones de la córnea y las queratopatías y en las que están implicadas las células epiteliales.
6. Composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 5, en forma gastrorresistente.
7. Composición alimenticia que comprende por lo menos un ácido hialurónico de 30000 a 45000 de peso molecular, preferentemente 40000 Daltons, o sus sales correspondientes, formulada para ser administrable por vía oral a una dosis comprendida entre 50 mg/d y 300 mg/d, preferentemente entre 100 mg/d y 200 mg/d, para su utilización en la mejora de la función de protección de la mucosa intestinal en el marco de patologías de la mucosa intestinal seleccionadas de entre las gastroenteritis, las necrosis isquémicas y las ulceraciones de la mucosa intestinal, la mejora de la función de protección del ojo en el marco de los trastornos oculares seleccionados de entre el estrés hídrico, la sequedad del ojo, las lesiones de la córnea y las queratopatías y en las que están implicadas las células epiteliales.
8. Composición alimenticia para su utilización según la reivindicación 7, en forma gastrorresistente.

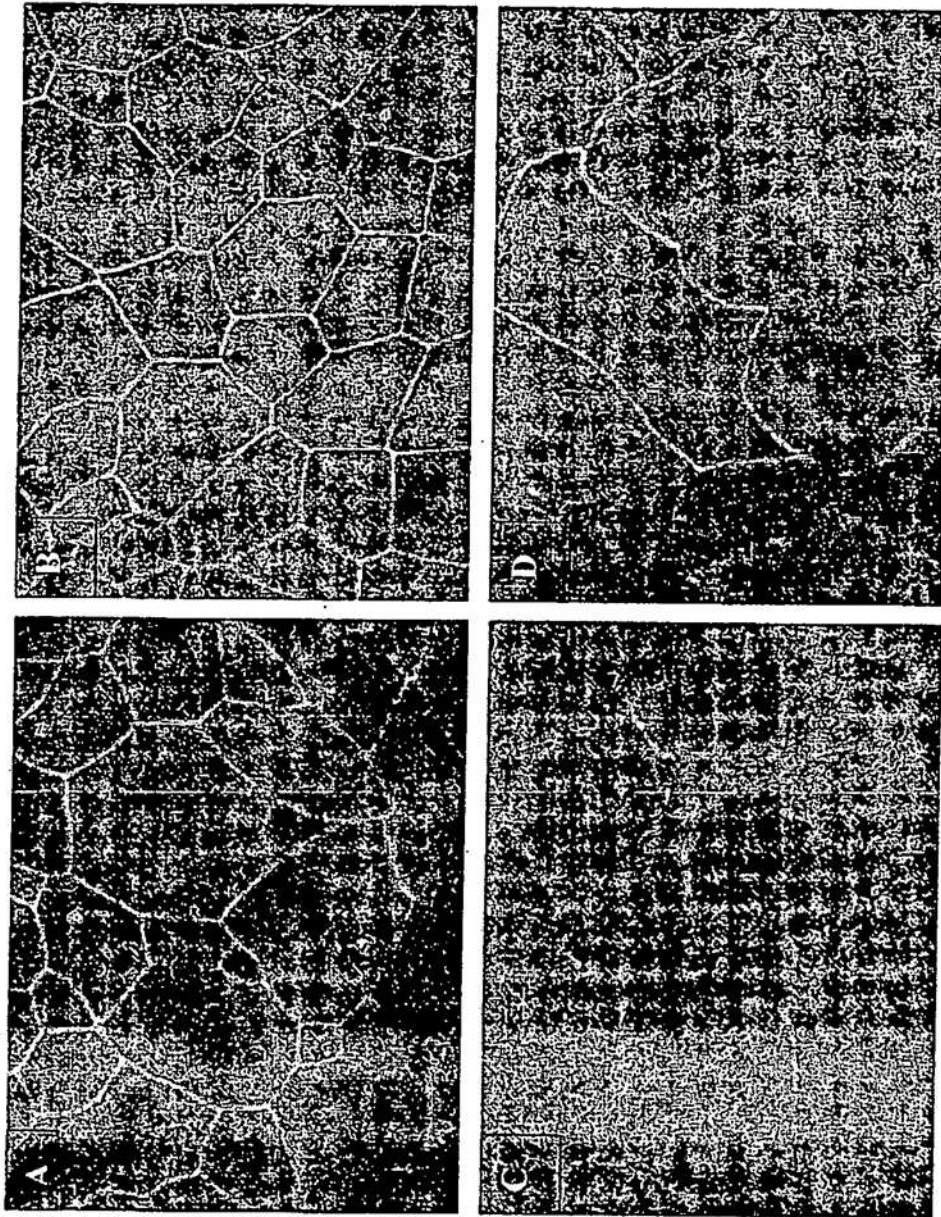


Figura 1

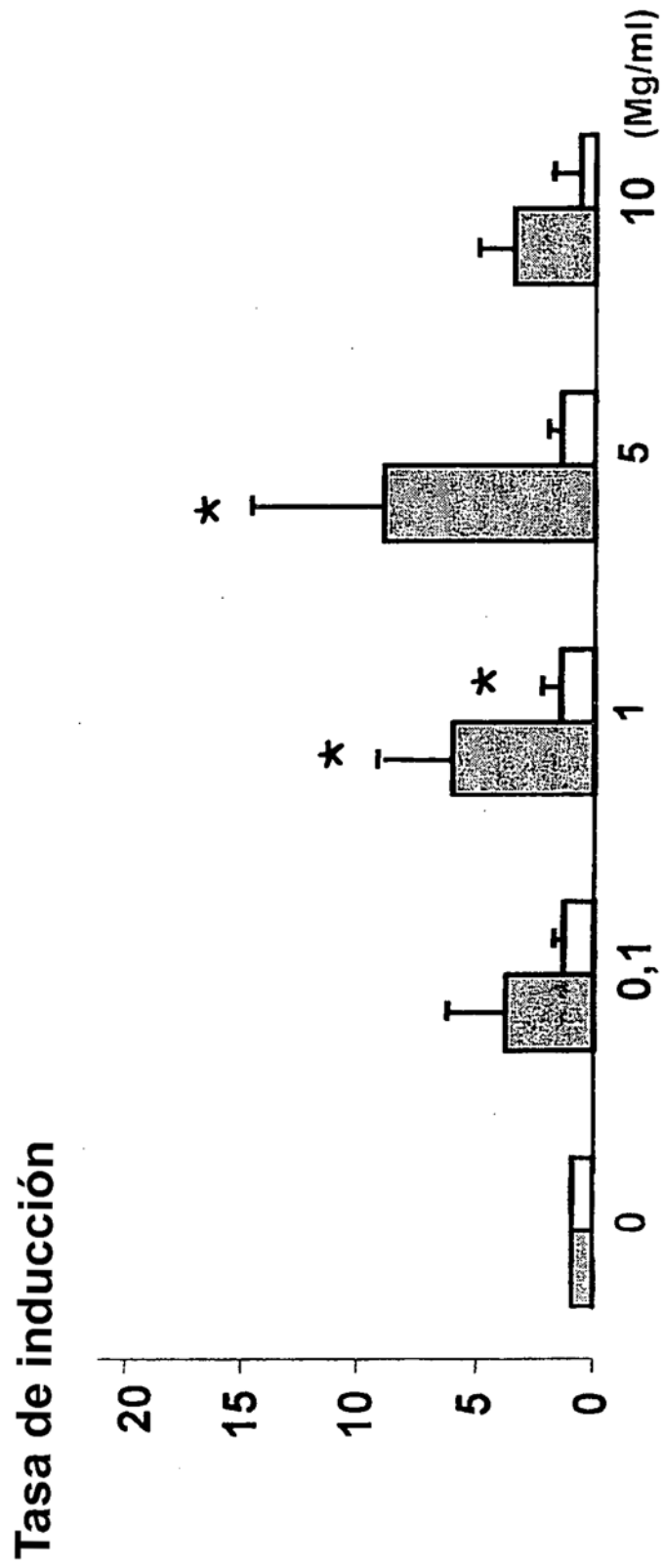


Figura 2

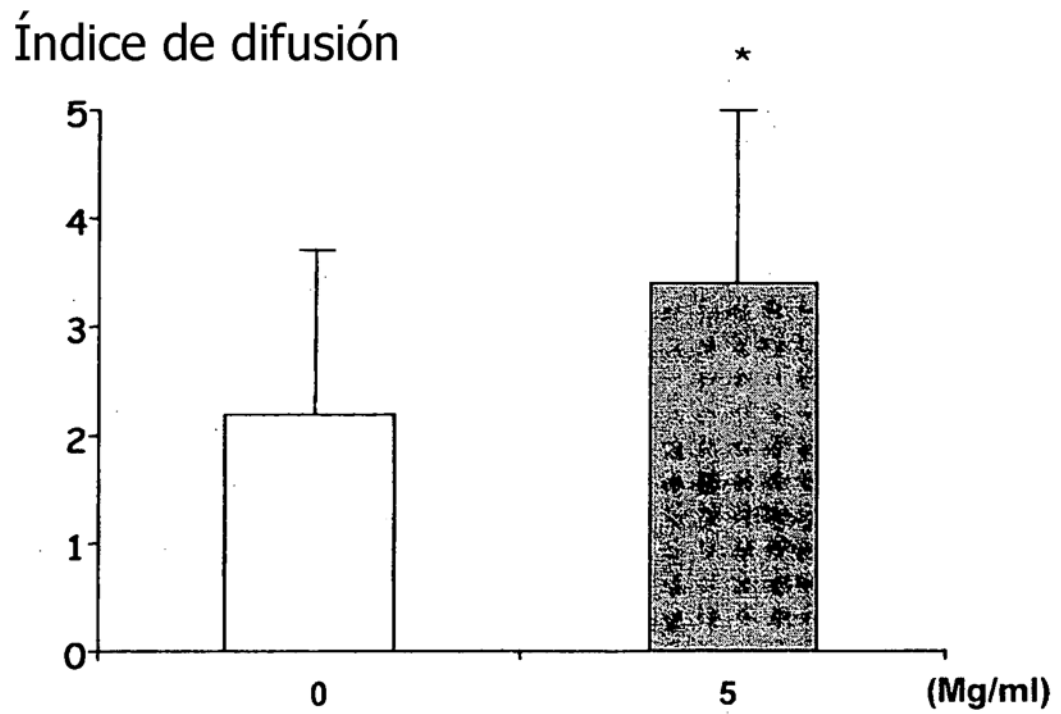


Figura 3

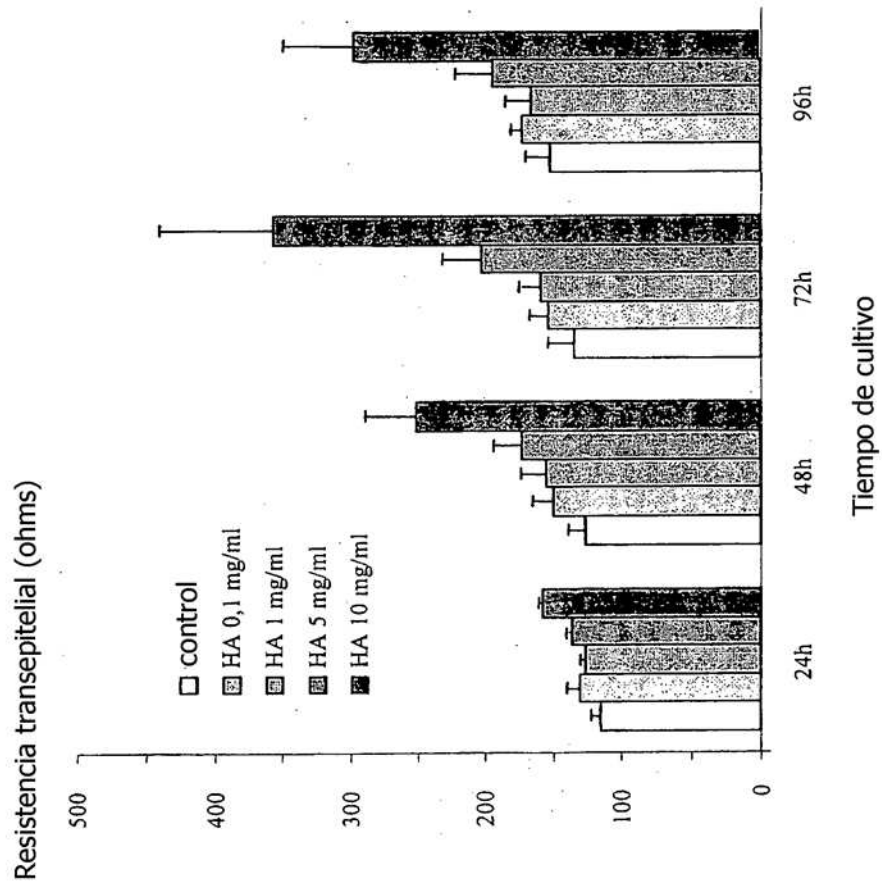


Figura 4

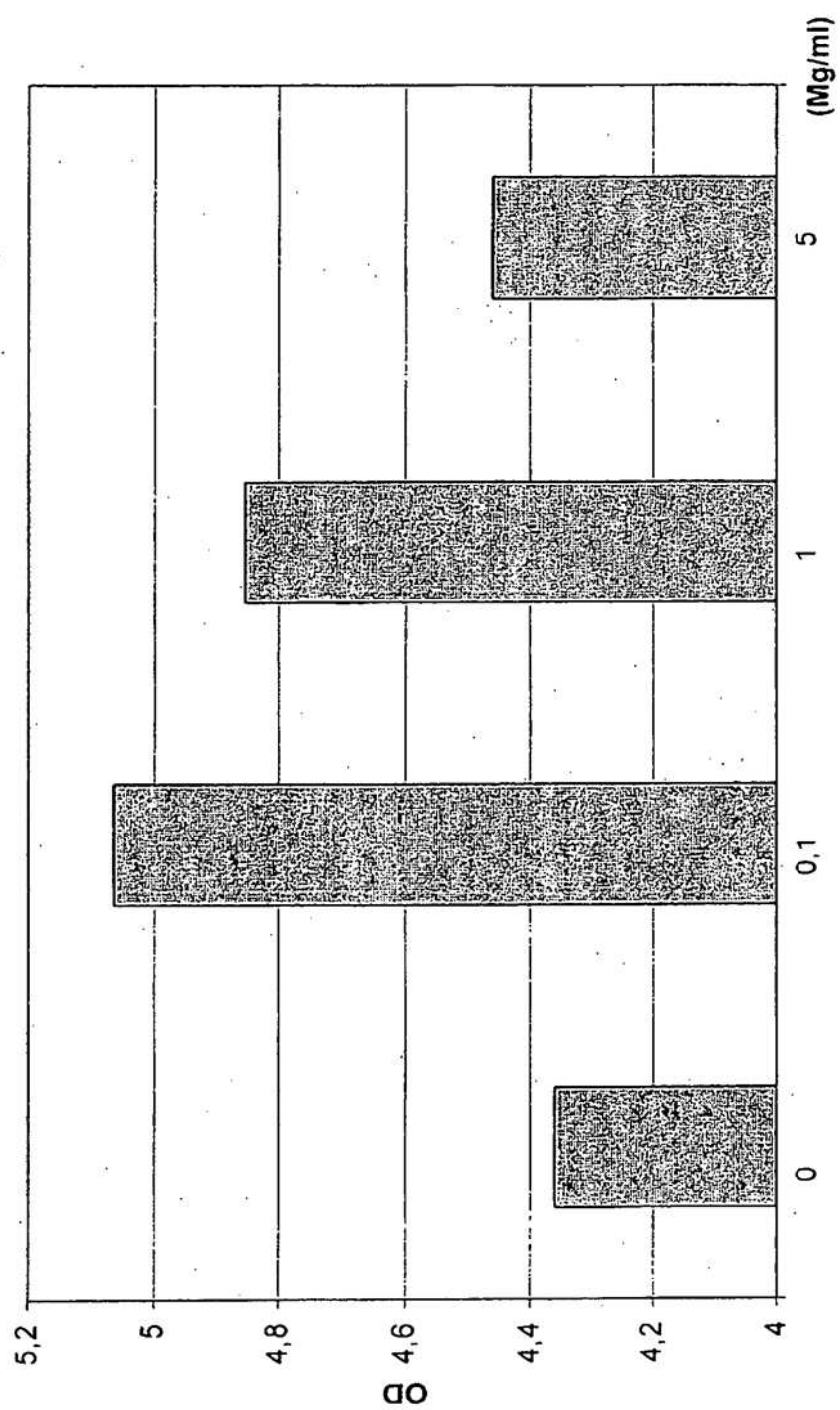


Figura 5

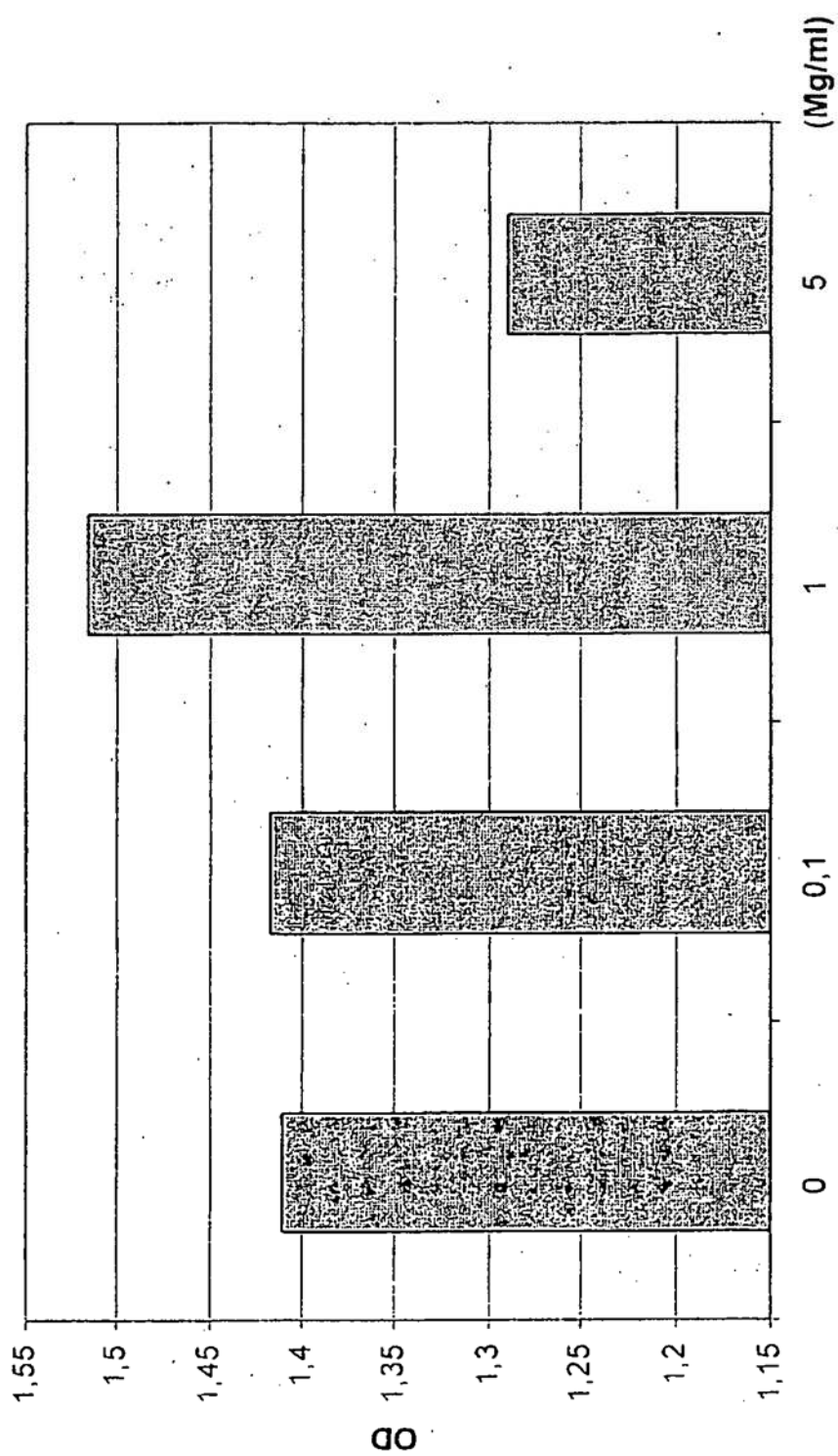


Figura 6

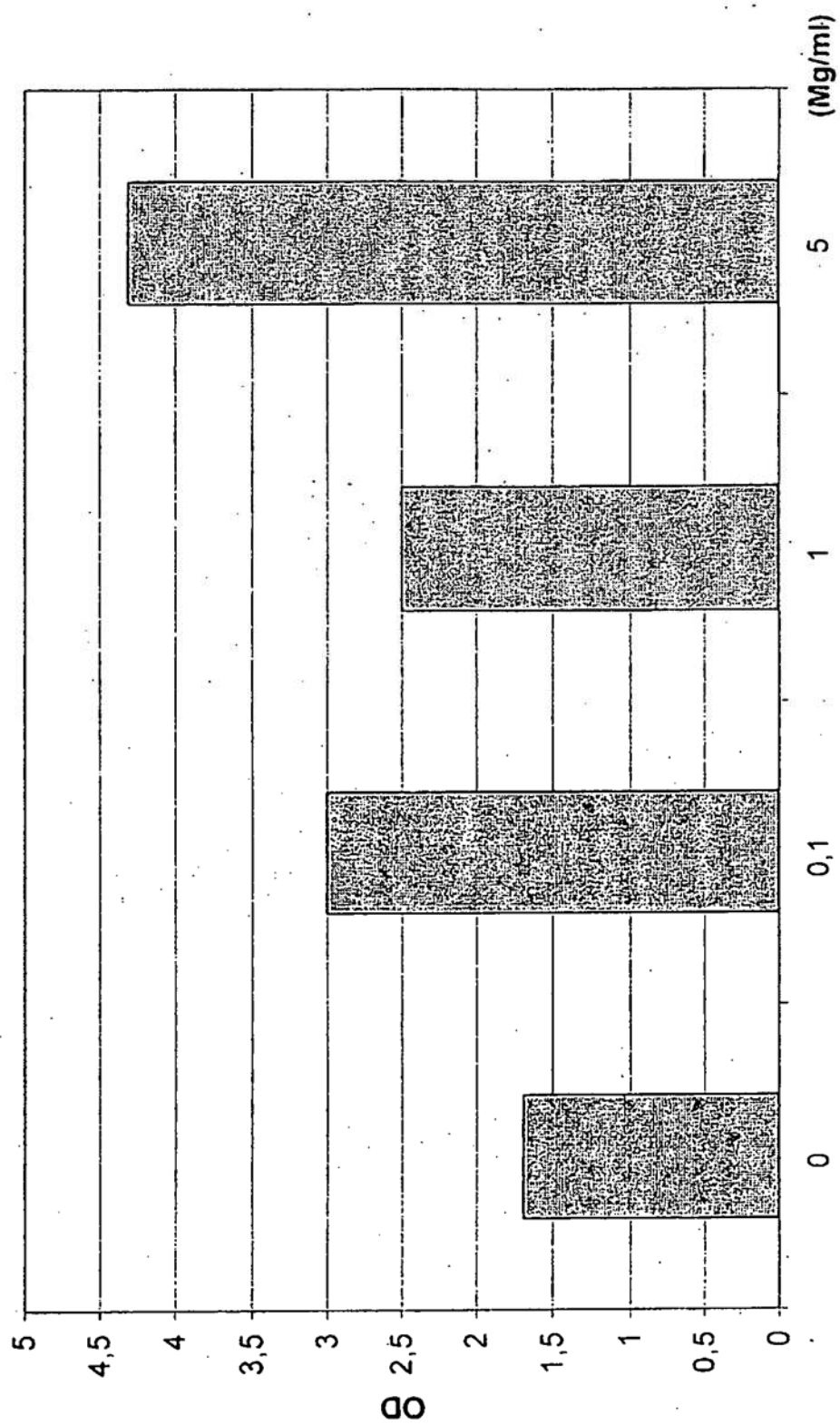


Figura 7

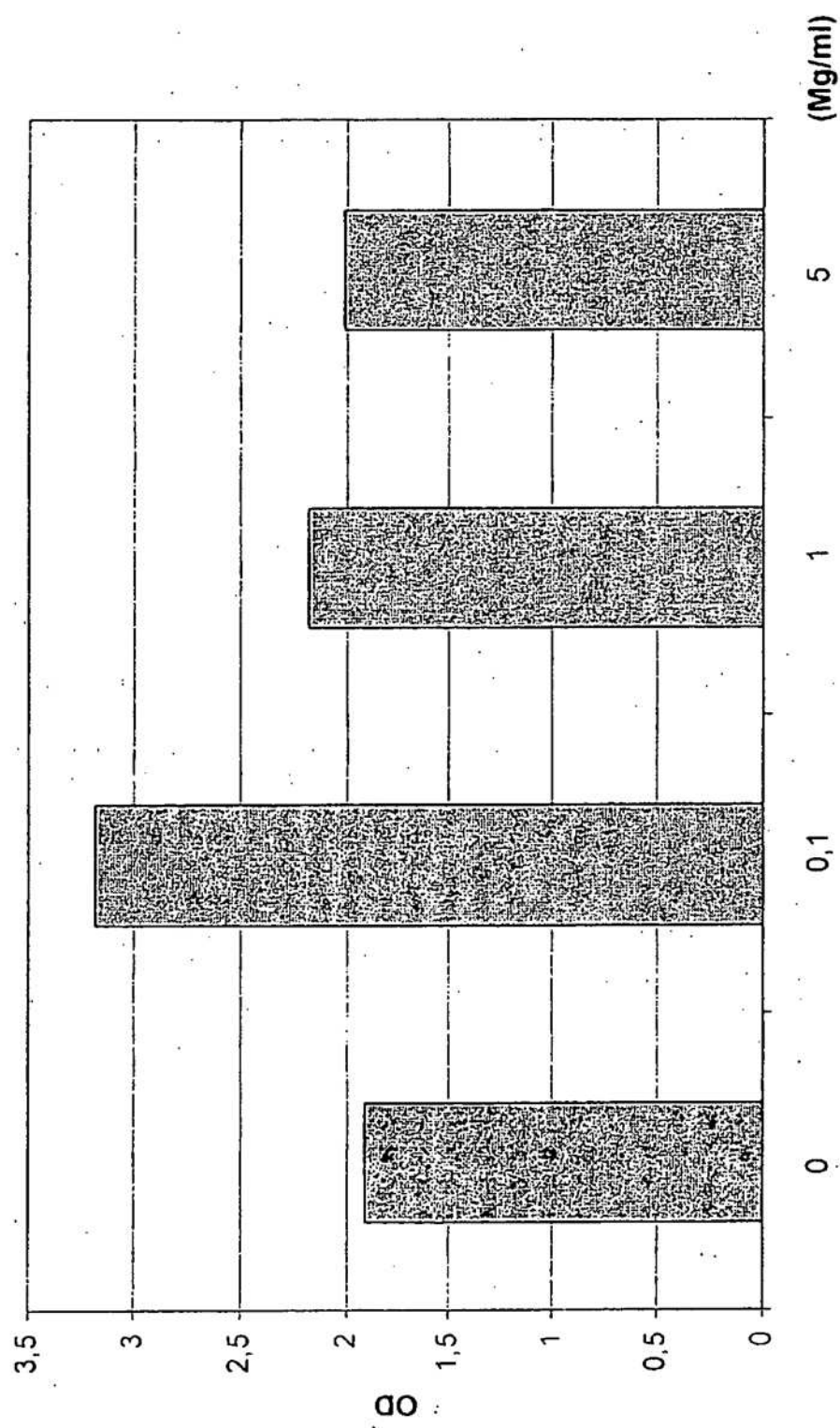


Figura 8