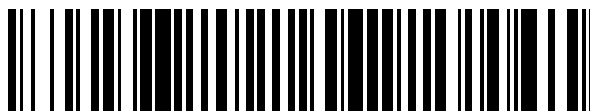


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 498**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2010** **PCT/EP2010/003044**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010** **WO10130466**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010** **E 10721125 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016** **EP 2429533**

54 Título: **Ácidos hialurónicos sulfatados como agentes reguladores de la actividad de citoquinas**

30 Prioridad:

14.05.2009 IT PD20090135

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3A
35031 Abano Terme, IT

72 Inventor/es:

GALESSO, DEVIS y
ZANELATO, ANNA MARIA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 602 498 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

Ácidos hialurónicos sulfatados como agentes reguladores de la actividad de citoquinas

Campo de la invención

- Desde hace muchos años, la literatura/patente científica ha estado estudiando y describiendo el ácido hialurónico sulfatado que se obtiene a partir de ácido hialurónico (HA) convenientemente sulfatado de acuerdo con lo que se describe en el estado de la técnica (EP0940410B1 y EP0702699B1), a los cuales se atribuyen efectos anticoagulantes. HAS también se puede obtener mediante la desacetilación y la posterior sulfatación de la glucosamina de HA (definido como HA-NS) (EP0971961B1), para la producción de artículos quirúrgicos y composiciones farmacéuticas. Las patentes EP0754460B1 y EP1385492B1 son también conocidos, en los que el uso de HAS se describe en patologías tales como, por ejemplo, ARDS, reumatismo articular, artritis reumatoide y dermatitis. Además, EP0889055 revela oligosacáridos sulfatados para usos cosméticos y dermatológicos, dichos oligosacáridos de HA sulfatados que tienen un MW que oscila entre 2000 y 7000 D, mientras que US 2003/162732 se refiere a la combinación de cisteína y un aminopolisacárido en forma de un complejo químico o de una composición farmacéutica en la supresión de la reacción de hipersensibilidad y reacciones inflamatorias como trastornos reumáticas o dermatológicas.
- La presente invención se refiere a HAS para su uso como agente regulador de la actividad de las citoquinas, como el solicitante ha descubierto la capacidad exclusiva de HAS de modular la actividad de determinadas citoquinas (tanto pro- y anti-inflamatorias), se ha estudiado su mecanismo de acción y revelado la diferencia sustancial entre los dos tipos de producto sulfatado (HAS y HA-NS).
- Desde 1970, los científicos han entendido que las poblaciones seleccionadas de células linfoides pueden producir y liberar en el lecho circulatorio, las moléculas de una naturaleza proteica no asimilables a los anticuerpos, definida con el término "citoquinas". Estas representan un nuevo tipo de "hormona", capaz de actuar sobre diferentes dianas celulares en numerosas regiones del cuerpo.
- La progresión de los conocimientos científicos relacionados con la síntesis y funciones biológicas/bioquímicas de estas proteínas, ha alterado la visión "vieja" del sistema inmunológico (I.S.) del mismo mundo científico y ha abierto nuevos horizontes en la comprensión de sus numerosas funciones, creando así nuevas perspectivas para el tratamiento de diferentes patologías, tópicos y/o sistémicas, que comprenden también nuevas posibilidades terapéuticas relacionadas con la inmunoterapia del cáncer.
- La célula del IS central es el linfocito, representa aproximadamente 20% de todas las células blancas de la sangre y, basándose en sus diversas funciones, forma 3 grupos: linfocitos B, linfocitos T y linfocitos asesinos. Muchas citoquinas son proteínas solubles producidas por los linfocitos y/o monocitos, capaces de actuar contra otras células/tejidos situadas también muy lejos de su lugar de producción. Tienen funciones inmunológicas, de hecho, así como las funciones de regulación de la síntesis de otras citoquinas por células diferentes del I.S. o células diana implicadas en la cascada de reacciones iniciadas por el I.S.
- Hasta ahora, se han estudiado numerosas citoquinas diferentes, que también tienen numerosos acrónimos diferentes, pero las estudiadas, en particular por el solicitante son: Interleucina 1 y 2, interleucina 6, 7 y 12, en lo sucesivo, se definen como IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e IL-12 que, con TNF, se definen como citoquinas de carácter proinflamatorio, mientras que la interleucina 10 (IL-10) por el contrario, es una citoquina con fuertes propiedades antiinflamatorias.
- La primera citoquina que se estudió fue sin duda IL-1 presente en dos formas α y β , un potente inductor de procesos inflamatorios, tanto locales como sistémicas. Se produce principalmente por los linfocitos B, T y macrófagos después de estímulo bacteriano o estimulación por parte de otros agentes que incluyen otras citoquinas; también se secreta de macrófagos peritoneales, alveolares, células de Kupffer, neutrófilos periféricos, endoteliales, células de músculo liso y epiteliales, fibroblastos, células de Langerhans de la piel, osteoclastos, sinoviocitos y muchos otros tipos de células. También está presente en el líquido cefalorraquídeo donde tanto se producen como se transportan. Ambas formas se unen al mismo receptor y tienen actividades biológicas, muy similares, si no idénticas. Muchas de sus funciones proinflamatorias están vinculadas a la estimulación de otras citoquinas, tales como IL-6 e IL-8, y su propia síntesis se puede inducir por citoquinas tales como TNF, interferón, endotoxinas bacterianas, virus y diferentes tipos de otro antígenos. Está implicada en el choque séptico, pero también se debe señalar que estudios recientes han demostrado que IL-1 es capaz de activar la expresión de algunos oncogenes y por consiguiente de participar en la patogénesis de neoplasias. Además, se ha sugerido para esta citoquina un sistema de control autocrino del crecimiento de las células blásticas de la serie blanca que están presentes en el lecho circulatorio de los pacientes con la patología de la leucemia: estas células blásticas, de hecho, producen sin control IL-1 que a su vez estimula la síntesis de los factores de crecimiento que aumentan la proliferación de las mismas células blásticas. En combinación con otras citoquinas, IL-1, por tanto, representa uno de los principales mediadores de los procesos inflamatorios: estimula las células T, de hecho, para producir IL-2 y las células B para producir inmunoglobulinas. En consecuencia, está implicada en numerosas patologías tales como, por ejemplo, astrogliosis y la desmielinización de las fibras neuronales, es citotóxica para las células pancreáticas de Langerhans que producen insulina, y también está implicada en procesos líticos de los huesos, ambos activación osteoclastos y supresión de la formación de nuevo hueso, estando ambos procesos implicados en la

5 patología de la osteoporosis. Es capaz de funcionar como un pirógeno endógeno como, mediante el aumento de la liberación de prostaglandinas en el centro hipotalámico, causa un aumento en la temperatura del cuerpo. También está implicada en la patogénesis de la artritis reumatoide y la artrosis: altas cantidades de IL-1 se han encontrado de hecho en el líquido sinovial de pacientes afectados por artritis reumatoide y/u osteoartritis. Finalmente, participa en el establecimiento de daño vascular tales como trombosis venosa y está presente en todos los vasos con patologías del tipo arterio/arterioesclerótico. Actualmente se están experimentando los antagonistas de los receptores para esta citoquina, como el bloqueo del receptor está demostrando que es una manera eficaz de tratar estas patologías en las que IL-1 es una de los protagonistas.

10 TNF: El factor de necrosis es parte del grupo de citoquinas que promueve la reacción de la fase de la inflamación sistémica aguda. Por lo tanto, TNF está implicado en un número muy amplio de procesos tales como la proliferación celular, diferenciación y apoptosis, carcinogénesis y replicación viral.

Se produce principalmente por los macrófagos y por una serie de otros tipos de células, incluyendo mastocitos, células linfoides, células musculares y endoteliales, fibroblastos y células nerviosas. Su síntesis puede ser estimulada por endotoxinas bacterianas, otras citoquinas tales como IL-2, Interferón e IL-1, y puede ser inhibida por esteroides.

15 Al actuar sobre numerosos órganos y sistemas, por lo general junto con otras citoquinas, participa en el establecimiento y regulación de muchos procesos patogénicos:

- modula la expresión de muchas proteínas y citoquinas importantes, tales como IL-1 e IL-6 resultante así implicados en muchas patologías cutáneas tales como, dermatitis, vitíligo y eczema;

- estimula el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal que aumenta la liberación de algunos tipos de hormonas;

20 - suprime el apetito;

- induce fiebre (actúa como pirógenos endógenos que inducen el hipotálamo para producir prostaglandinas);

- estimula la síntesis de colagenesis en los sinoviocitos y por esta razón, grandes cantidades de TNF se han encontrado en los fluidos sinoviales de pacientes que sufren de artrosis y artritis reumatoide;

25 - activa los osteoclastos y por lo tanto induce la reabsorción del hueso, proceso de caracterización de la patología osteoporosis;

- también está implicada en patologías del sistema nervioso, tal como astrocitosis y desmielinización;

- atrae fuertemente los neutrófilos y les ayuda a unirse a las células endoteliales para la extravasación;

- estimula la producción macrofágica de moléculas con una acción oxidante;

30 - se implica en particular, las patologías del sistema cardiocirculatorio que participan en la formación de trombosis venosa, en la patogénesis de la arteriosclerosis y vasculitis;

- aumenta la resistencia a la insulina, aumenta el catabolismo de las proteínas en los músculos, mientras que suprime el metabolismo lipogénico en el tejido adiposo.

35 Las altas concentraciones de TNF pueden inducir síntomas similares a choque, mientras que la exposición prolongada a bajas concentraciones puede conducir a la caquexia, un síndrome que causa el agotamiento del patrimonio de proteínas y lípidos de los tejidos (en particular, muscular y adiposo). El TNF es capaz de unirse por sí mismo a dos receptores, TNF-R1 (receptor de TNF tipo 1) y TNF-R2 (receptor de TNF tipo 2), que se expresa en todas las células somáticas con exclusión de los eritrocitos. En resumen, el TNF promueve la respuesta inflamatoria que a su vez desencadena numerosas patologías también de naturaleza autoinmune, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis y asma. La investigación científica ha intentado hasta ahora para perfeccionar los fármacos "biológicos" (tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que inhiben la síntesis de TNF y/o bloquean su receptor.

45 IL-2: se trata de una citoquina aterogénica, altamente pro-inflamatoria, producida principalmente por los linfocitos T, cuya síntesis está inhibida por esteroides y ciclosporinas. Las células leucémicas sintetizan la citoquina anterior y contemporáneamente expresan su receptor, creando así un sistema de autocrino en la estimulación de su crecimiento que provoca un deterioro en la patología de la leucemia. IL-2 tiene un papel central en la regulación de la respuesta inmunológica: estimula, de hecho, la síntesis de IFN en los leucocitos periféricos e induce la producción de IL-1 y TNF. IL-2 también puede dañar la barrera hematoencefálica y la integridad del endotelio de los vasos cerebrales, causando trastornos neuropsiquiátricos tales como la desorientación y la depresión.

Por consiguiente, existen numerosas patologías que se han asociado con una producción aberrante de IL-2, tales como linfoma de Hodgkin, el rechazo de trasplantes de órganos, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso,

diabetes y SIDA. IL-6: producida por muchos tipos de células, sobre todo de I.S., con TNF es uno de los miembros más importantes del grupo de mediadores químicos de la fase aguda del proceso inflamatorio, y por lo tanto está implicada en patologías con un componente inflamatorio fuerte, tal como asma (donde participa en la aparición y mantenimiento del proceso inflamatorio), inflamación intestinal crónica (enfermedad de Crohn), artritis reumatoide y artrosis. Como se afirma anteriormente, de hecho, citoquinas tales como TNF, IL-1 e IL-6 han demostrado estar implicadas en gran medida en el proceso de la artrosis articular degenerativa, ya que tienen un papel principal en la regulación de la expresión de metaloproteasas (responsables de la degradación del cartilago), en la producción de prostaglandinas y en la activación osteoclástica y, por esta razón, niveles altos de citoquinas han sido registrados en los fluidos sinoviales de pacientes que sufren de la artrosis y la artritis reumatoide (R.A.). Estos descubrimientos han estimulado el uso de inhibidores en las interleucinas anteriores y/o antagonistas del receptor como una nueva estrategia de tratamiento de la patología de la artrosis.

Las altas concentraciones de IL-6 también se han encontrado en la orina de pacientes sometidos a trasplantes y su presencia representa uno de los primeros signos de la reacción de rechazo del órgano. El nivel sérico de esta citoquina también se incrementa drásticamente en muchos pacientes que sufren de tumores (tales como, por ejemplo, mieloma, leucemia, mixomas cardíacos, o en patologías tales como linfadenopatías y cirrosis hepática) y también se puede utilizar como indicador en el control del tamaño de la masa tumoral. Por último, estudios recientes han conectado el cáncer con la longevidad, y reveló que algunos tumores son influenciados por la situación cual/cuantitativa de las proteínas citoquinas del paciente: en resumen, la evidencia reciente ha unido un perfil de baja producción de IL-10 y alta secreción de IL -6 con un deterioro de la supervivencia clínica de los pacientes afectados por patologías tumorales, mientras que un genotipo capaz de producir y mantener altos niveles de IL-10 puede facilitar la supervivencia. En consecuencia, las personas con niveles altos de citoquinas antiinflamatorias y una baja concentración de citoquinas proinflamatorias son genéticamente susceptibles a tener una longevidad mayor (Caruso C. et al., Ann N.Y. Acad. SCI., 2004, 1028:1-13).

IL-7: citoquina producida principalmente por las células del estroma de la médula ósea, también es secretada por el timo y los queratinocitos. IL-7 induce la síntesis de citoquinas inflamatorias tales como IL-1, IL-6 y TNF, participando así en la patogénesis de algunas enfermedades de la piel (tales como psoriasis y linfoma cutáneo) y el sistema osteoarticular. De hecho, se han encontrado altos niveles de IL-7, en pacientes que sufren de R.A. como IL-1 y TNF (citoquinas fuertemente implicadas en la patología anterior) puede aumentar la producción del estroma de IL-7 que a su vez estimula la síntesis macrofágica de TNF. Finalmente, IL-7 puede inducir la maduración de los osteoclastos y, en consecuencia, aumentar la resorción ósea contribuyendo así a la degeneración de las articulaciones.

IL-12: esta proteína también juega un papel central en la regulación de las funciones del I.S. actúa de hecho en la diferenciación de los linfocitos, induce la síntesis de interferón y TNF, y su producción puede inhibirse por la IL-10. La sobreproducción de esta proteína entra en la patogénesis de enfermedades de (una) naturaleza autoinmune tal como colitis, artritis, diabetes dependiente de insulina, encefalomiелitis, psoriasis y esclerosis múltiple (Brahmachari S. et al., Minerva Med., 2008, 99(2):105-118).

IL-10: producido principalmente por los linfocitos, es una citoquina de una naturaleza anti-inflamatoria, capaz de inhibir la síntesis de IL-2 e interferón producido por los linfocitos T. La acción anti-inflamatoria de IL-10 también se revela en la capacidad de inhibir la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF en los macrófagos estimulados con endotoxinas bacterianas. Las deficiencias de IL-10 se asocian con patologías tales como diabetes mellitus e inflamaciones intestinales crónicas, tales como enfermedad de Crohn. La evidencia reciente ha llevado a que IL-10 también se experimentara como un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento del lupus eritematoso. Los niveles bajos de IL-10 se han observado en tejidos cutáneos de los pacientes que sufren de patologías como vitiligo, psoriasis, eczema y dermatitis en general. Cabe señalar que ambos corticosteroides y ciclosporina aumentan la producción y/o liberación de esta interleucina a partir de las células competentes relativas durante la terapia de inmunosupresión convencional para el tratamiento de inflamaciones y el rechazo de órganos (Zhou X. Et al., Current Drug Targets Immune, Endocrine & Metabolic Disorders, 2005, 5(465475). Los datos experimentales han demostrado su eficacia en la reducción de la liberación de prostaglandinas y ciclooxigenasa inducida *in vitro* por TNF sobre sinoviocitos humanos, indicando así la capacidad de IL-10 de reducir los procesos inflamatorios que implican articulaciones afectadas por la degeneración osteoartrosis (Alaaeddine N. et al., Arthritis & Rheumatism, 1999, 42:710-718). Estudios recientes han confirmado su eficacia terapéutica hacia la patología del asma en modelos en animales experimentales de la hiperreactividad bronquial, mostrando cómo esta citoquina tiene una alta potencialidad terapéutica en la reducción de la inflamación que caracteriza a las vías respiratorias de los pacientes asmáticos, en los que se han encontrado altas concentraciones de TNF, IL-1, IL-5, IL-6 y IL-8 en el líquido de lavado bronquial y/o en un nivel de suero y/o nivel de los tejidos (Stankiewicz W. et al., Mediators of Inflammation, 2002, 11:307-312). Por esta interleucina, el papel importante de citoquinas reguladoras del mantenimiento del homeostasis inmunológico, por lo tanto, ha sido asumido.

El asma puede ser una enfermedad muy invalidante de los cuales aproximadamente 200 millones de personas en el mundo sufren, con más de 5,000 muertes al año. Es una patología que se basa en una respuesta distorsionada del I.S. a factores ambientales, en consecuencia, unida a una producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias para el crecimiento y diferenciación de mastocitos y eosinófilos con otros tipos de células del I.S. Las causas de esta actividad fuera de equilibrio del sistema inmune no son todavía completamente conocidas, hay sin embargo factores genéticos, ambientales, virales

y también nutricionales, que contribuyen de diversas maneras al desarrollo de esta patología. En consecuencia, la búsqueda de una terapia eficaz para su prevención y/o tratamiento que permite la suspensión o la reducción del uso de esteroides (terapia de tratamiento convencional), podría representar una solución válida tanto para las formas más graves (ya que permitiría en cualquier caso una reducción en el uso de esteroides) y para los casos menos graves, como la suspensión de la terapia con esteroides podría ser total.

Descripción detallada de la invención

Un objeto de la invención es ácido hialurónico sulfatado para su uso en la prevención y/o tratamiento del asma asociada a la activación de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, y TNF, dicho ácido hialurónico sulfatado (HA), que tiene un peso molecular que varía de 10,000 a 50,000 Da, 150,000 a 250,000 Da y 500,000 a 750,000 Da y un grado de sulfatación igual a 1 o a 3.

Un objetivo adicional de la presente invención es ácido hialurónico sulfatado para uso en la prevención y/o tratamiento de eczema de inmunodeficiencia y dermatitis asociada con déficit de IL-10, dicho ácido hialurónico sulfatado (HA), que tiene un peso molecular que varía de 10,000 a 50,000 Da, 150,000 a 250,000 Da y 500,000 a 750,000 Da y un grado de sulfatación igual a 1 o 3.

El ácido hialurónico sulfatado apropiado para los fines de la presente invención se prepara de acuerdo con el proceso descrito en EP 702699 B1: la sulfatación se efectúa por medio del complejo SO_3 -piridina e implica los hidroxilos alcohólicos presentes en la cadena de polisacáridos a partir de un HA que deriva de cualquier fuente, por ejemplo, por extracción a partir de crestas de gallo, ya sea por fermentación o tecnológicamente, y que tiene un peso molecular que varía de 400 a 3×10^6 Da, en particular de 1×10^4 Da a 1×10^6 Da, aún más en particular de 10,000 a 50,000 Da, 150,000 a 250,000 Da y 500,000 a 750,000 Da.

El derivado obtenido mantiene todas las características físicas del polímero de partida inalterado, en particular el peso molecular del HA de partida no se ve alterado por el proceso de sulfatación permitiendo así que todas las características fisicoquímicas del polisacárido de partida se mantengan. La sulfatación implica los diversos grupos hidroxilo de la unidad de disacárido y es por lo tanto posible obtener diferentes grados de sulfatación, 0.5 a 3.5 (entendido como el número de grupos sulfato por unidad de disacárido), variando la cantidad de SO_3 -piridina introducida como se conoce en el estado de la técnica.

El derivado utilizado en todas las experimentaciones realizadas generalmente tiene grado de sulfatación 1 o grado 3 y se define en lo sucesivo como HAS1 y HAS3. Todos los grupos carboxilo libres de la HA pueden ser salificados con cationes de un origen orgánico y/o inorgánico.

Ambos grados de HAS son solubles en agua y también se pueden esterilizar con las técnicas normales conocidas por los expertos en el campo, incluso si se prefiere la esterilización utilizando una autoclave.

En los experimentos que se describen a continuación, el solicitante demostró que:

- HAS es capaz tanto de estimular la producción de ARNm nuevo y la síntesis de proteínas de citoquinas anti-inflamatorias (tales como, por ejemplo, IL-10), aumentando así la capacidad de la defensa inmune de las células y por lo tanto de todo el organismo. La acción antiinflamatoria de las citoquinas anteriores se revela en la capacidad de inhibir la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF, todas las proteínas de carácter proinflamatorio.

- HAS es eficaz tanto en la disminución de la síntesis de nuevo ARNm como para reducir significativamente la síntesis de proteínas de IL-2, IL-7 e IL-12 por parte de los sinoviocitos (para IL-12) y componentes celulares del I.S., tanto en situaciones en las que una respuesta inmune no se exige, y también, en particular, situaciones de tensión inflamatoria en la que la célula inmune responde produciendo una cascada de citoquinas y, sobre todo, en este caso, los datos presentados revelan el mayor efecto inhibidor de HAS.

- HAS es eficaz en la inhibición de la unión de TNF, IL-1 e IL-6 a su receptor. Estos resultados son de importancia fundamental, ya que demuestran que el comportamiento del sulfato es completamente similar al de los anticuerpos monoclonales específicos para los receptores de las proteínas proinflamatorias anteriores, en consecuencia, capaces de bloquear su función incluso si no tienen esta especificidad. Este bloqueo del receptor representa la forma más eficaz de antagonizar los efectos pro-inflamatorios y tumorales del TNF, IL-1 y factor de IL-6, lo que abre nuevos horizontes en la experimentación clínica, permitiendo el perfeccionamiento de nuevos enfoques terapéuticos en el tratamiento y/o la prevención de un número extremadamente alto de patologías, teniendo en cuenta el papel que TNF, IL-1 e IL-6 tienen en el inicio y la progresión de numerosas enfermedades.

Por lo tanto, el solicitante describe y reivindica HAS para su uso en

- la prevención y/o tratamiento de eczema de inmunodeficiencia y dermatitis asociada con la deficiencia de IL-10;

- la prevención y/o tratamiento de asma asociada con el aumento/activación de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 y TNF.

También se revela HAS para su uso en

- la prevención y/o tratamiento del asma, artritis reumatoide, y artrosis asociada con la activación de IL-1, IL-6 y TNF;
- la prevención y/o tratamiento de patologías asociadas con el daño endotelial en los vasos sanguíneos;
- la prevención y/o tratamiento de enfermedades de la piel tales como, por ejemplo, dermatitis y linfoma cutáneo;
- 5 - la prevención y/o tratamiento de enfermedades de una naturaleza autoinmune tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn (y todas las inflamaciones intestinales crónicas), psoriasis y asma, diabetes mellitus, encefalomiелitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso y para el tratamiento del rechazo en los trasplantes de órganos;
- la prevención y/o tratamiento de neoplasias tales como, por ejemplo, leucemia y linfoma de Hodgkin;
- la prevención y/o tratamiento de la astrogliosis, astrocitosis y desmielinización de las fibras neuronales;
- 10 - la prevención y/o tratamiento de patologías asociadas con la activación de osteoclastos, tales como la osteoporosis;
- la prevención y/o tratamiento de patologías vasculares del tipo arterio/ateroesclerótico, trombosis venosa y vasculitis, asociado con la activación de TNF, IL-1 e IL-6;
- la prevención y/o tratamiento de patologías febriles.

15 Por último, el solicitante describe la preparación de diversas formulaciones/composiciones farmacéuticas que contienen HAS como único principio activo, o en asociación con otros agentes farmacológicamente y/o biológicamente activos tales como, por ejemplo, esteroides, hormonas, proteínas, factores tróficos, vitaminas, fármacos anti-inflamatorios no esteroides (FANS), fármacos quimioterapéuticos, antagonistas del calcio, antibióticos, agentes antivirales, agentes anticoagulantes y/o fibrinolíticos, anestésicos locales, enzimas tales como, por ejemplo, colagenasa y/o hialuronidasa y/u otras proteasas; se pueden formular con polímeros tales como ácido hialurónico y sus derivados, carboximetilcelulosa y/u otros polímeros de una naturaleza natural (tal como colágeno) o de síntesis.

20 La composición farmacéutica en cuestión se puede administrar por vía sistémica (por vía endovenosa o arterial, por vía intramuscular, intraperitoneal, por vía subcutánea u oral), puede ser utilizado para una aplicación tópica por absorción dérmica y/o transdérmica, se puede administrar por inhalación/aerosol (especialmente para el tratamiento de patologías asmáticas), intraarticular o se puede administrar directamente en el sitio que se va a tratar por inyección directa.

25 La composición farmacéutica en cuestión se puede formular como un ungüento, lipogel, hidrogel, lápiz de labios, crema, óvulos vaginales y sondas, espuma, gel de mucosa, preparaciones oftálmicas, duchas, enjuague bucal, parches para absorción dérmica y/o transdérmica, especialmente de FANS y hormonas, solución para el uso de inhalantes.

30 Algunos ejemplos de la preparación de HAS grado 1 y 3, las formulaciones farmacéuticas que lo contienen, se proporcionan para fines meramente descriptivos y no limitativos, junto con los resultados obtenidos por la experimentación *in vitro*.

Ejemplo 1

Preparación de la sal de tetrabutilamonio del ácido hialurónico (HA) que tiene un peso molecular medio igual a 200 kD (que oscilan desde 150,000 a 250,000 Da)

35 5.00 g de ácido hialurónico de un origen sal de sodio de fermentación (200 KD) se disolvieron en 250 mL de agua y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio pre-llenada con 100 cm³ de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio (TBA). La solución eluida de sal HA-TBA se recogió y se liofilizó. Se obtienen 7.50 g de producto.

Ejemplo 2

Síntesis de HA sulfatado a partir de HA que tiene un peso molecular medio de 200 kD y un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva

40 Método A

45 10.0 g de la sal TBA de ácido hialurónico que tiene un peso molecular medio de 200 KD preparado de acuerdo con el ejemplo 1, se disuelven en 300 mL de dimetilsulfóxido (DMSO); 26.0 g del complejo SO₃-piridina (tríoхido de azufre y piridina, en lo sucesivo abreviado como PySO₃) se dispersan en 150 mL de DMSO, y a continuación, se adiciona a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21°C, la reacción se interrumpió adicionando 0.1 volúmenes de agua; el producto de reacción en bruto se aísla mediante precipitación después de la adición de 2 volúmenes de etanol. El sólido obtenido se dispersa en 150 mL de agua y el pH se lleva hasta neutralidad

con NaOH 1 M. La mezcla se dializó exhaustivamente frente a agua a través de una membrana con un corte de 12-14,000 Da. El producto dializado se somete a liofilización. Se obtienen 9.7 g de producto con un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 88%).

Método B

- 5 32.0 g de la sal TBA del ácido hialurónico que tiene un peso molecular medio de 200 KD preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, se disuelven en 900 mL de N-metilpirrolidona (NMP); 100 g de PySO_3 se dispersan en 600 mL de NMP, y a continuación, se adicionan a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, la reacción se interrumpe adicionando 0.5 volúmenes de agua; El pH inicialmente menor que 2.5, se lleva a neutralidad con NaOH (en solución). El producto en bruto de la reacción se aísla por precipitación mediante la adición de 2.5 volúmenes de metanol y se lavó con 2 volúmenes de una mezcla de metanol/agua 8/2. El sólido se volvió a disolver y exhaustivamente dializa contra agua a través de una membrana con un corte de 12-14,000 Da. Se obtienen 30.4 g de producto con un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 86%).

Ejemplo 3

- 15 Síntesis de HA sulfatado a partir de HA que tiene un peso molecular promedio de 200 kD y un grado de sulfatación igual a 1 grupo sulfato por unidad repetitiva

Utilizando el procedimiento ilustrado en el Ejemplo 1, se preparan 10.0 g de la sal TBA de HA, que se disuelven en 350 mL de DMSO. Se dispersan 10.0 g del complejo PySO_3 en 100 mL de DMSO, y a continuación, se adiciona a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21°C , la reacción se interrumpe, adicionando 0.1 volúmenes de agua; el producto de reacción en bruto se aísla mediante precipitación después de la adición de 2.5 volúmenes de etanol. El sólido obtenido se dispersa en 150 mL de agua y el pH se lleva hasta neutralidad con NaOH 1 moles/L. La mezcla se dializó exhaustivamente contra agua a través de una membrana con un corte de 12-14,000 Da. El producto dializado se somete a liofilización. Se obtienen 7.54 g de producto con un grado de sulfatación igual a 1.0 grupo sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 93%).

Ejemplo 4

- 25 Síntesis de HA sulfatado a partir de HA que tiene un peso molecular bajo (MW promedio de 10 KD, que oscila desde 10,000 a 50,000 Da) y un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva

Utilizando el procedimiento ilustrado en el Ejemplo 1, se preparan 12.4 g de la sal TBA de ácido hialurónico de bajo peso molecular, que se disuelven en 300 mL de NMP. Se dispersan 40 g de PySO_3 en 100 mL de NMP, y a continuación, se adiciona a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21°C , la reacción se interrumpe, adicionando 0.5 volúmenes de agua. El pH inicialmente menor que 2.5, se lleva a neutralidad con NaOH 4M. El producto en bruto de la reacción se aísla por precipitación mediante la adición de 2.5 volúmenes de metanol y se lavó con 2 volúmenes de una mezcla de metanol/agua 8/2. El sólido se volvió a disolver y se dializó contra agua exhaustivamente a través de una membrana con un corte de 3,500 Da. Se obtienen 12.0 g de producto con un grado de sulfatación igual a 3.0 grupos sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 85%).

Ejemplo 5

Síntesis de HA sulfatado a partir de HA que tiene un peso molecular promedio bajo y un grado de sulfatación igual a 1 grupo sulfato por unidad repetitiva

Utilizando el procedimiento ilustrado en el Ejemplo 1, 12.4 g de la sal TBA de HA se disuelven en 300 mL de DMSO. Se dispersan 16.0 g de PySO_3 en 100 mL de DMSO y a continuación, se adiciona a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21°C , la reacción se interrumpe, adicionando 0.1 volúmenes de agua; el producto en bruto de la reacción se aísla por precipitación mediante la adición de 2.5 volúmenes de etanol. El sólido obtenido se dispersa en 150 mL de agua y el pH se lleva hasta neutralidad con NaOH 1 moles/L. La mezcla se dializó exhaustivamente contra agua a través de una membrana con un corte de 3.500 Da. El producto dializado se somete a liofilización. Se obtienen 9.04 g de producto con un grado de sulfatación igual a 1.0 grupo sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 90%).

Ejemplo 6

Síntesis de HA sulfatado a partir de HA que tiene un peso molecular dentro del intervalo de 500 a 730 KD Da y un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva

21.0 g de sal de sodio de ácido hialurónico de origen extractivo (500-730 KD) se disuelven en 1.5 L de agua y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio prellenada con 450 cm^3 de resina Dowex en la forma de TBA. La solución eluida de sal HA-TBA se recogió y se liofilizó. Se obtienen 32.0 g de producto, que se disuelven en 1.35 L de NMP; se dispersan 100 g de PySO_3 en 650 mL de NMP, y a continuación, se adiciona a la solución de HA.

Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, la reacción se interrumpe, adicionando 0.5 volúmenes de agua. El pH inicialmente menor que 2.5, se lleva a neutralidad mediante la adición de NaOH (en solución a una concentración de 4 moles/L). El producto en bruto de la reacción se aísla por precipitación mediante la adición de 2.5 volúmenes de metanol y se lavó con 3.5 volúmenes de una mezcla metanol/agua 8/2. El sólido se volvió a disolver y se dializó contra agua exhaustivamente a través de una membrana con un corte de 12-14,000 Da. Se obtienen 30.3 g de producto con un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 83%).

Ejemplo 7

Síntesis de HA sulfatado a partir de HA que tiene un peso molecular dentro del intervalo de 500-730 kD y un grado de sulfatación igual a 1 grupo sulfato por unidad repetitiva

21.0 g de sal de sodio de ácido hialurónico de origen extractivo (500-730 KD) se disuelven en 1.5 L de agua y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio prellenada con 450 cm³ de resina Dowex en forma de TBA. La solución eluida de sal HA-TBA se recogió y se liofilizó. Se obtienen 32.0 g de producto, que se disuelven en 1.65 L de NMP; se dispersan 40 g de PySO₃ en 350 mL de NMP, y a continuación, se adiciona a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, la reacción se interrumpe, adicionando 0.5 volúmenes de agua. El pH inicialmente menor que 2.5, se lleva a neutralidad mediante la adición de NaOH (en solución a una concentración de 4 moles/L). El producto en bruto de la reacción se aísla por precipitación mediante la adición de 3.5 volúmenes de metanol y se lavó con 3.5 volúmenes de una mezcla metanol/agua 8/2. El sólido se volvió a disolver y se dializó contra agua exhaustivamente a través de una membrana con un corte de 12-14,000 Da. Se obtienen 22.5 g de producto con un grado de sulfatación igual a 1.0 grupo sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 87%).

Ejemplo 8

Evaluación del efecto regulador de HAS grado 1 y grado 3 en la expresión génica de IL-10 e IL-12 en sinoviocitos humanos

Los sinoviocitos humanos expandidos previamente *in vitro* y mantenidos en un cultivo a 37°C con un medio de DMEM que contiene 10% de FCS, se sembraron a una concentración de 20,000 células por pozo. HA sulfatado grado 1 (HAS1) y grado 3 (HAS3) preparado como se describe en los Ejemplos 1-3, a continuación, se adicionaron al medio de cultivo a concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/mL (para las dos muestras), mientras que el tratamiento de control se representa por HA no sulfatado que tiene un peso molecular medio (MW) de 200 KD. Después de 3 días de tratamiento, la PCR en tiempo real se llevó a cabo para evaluar la expresión génica de IL-10 e IL-12: el ARN celular se extrajo mediante el método "Trizol", siguiendo las indicaciones del proveedor (reactivo TRIZOL, LIFE Technologies, GIBCO BRL). En resumen, las células se lisaron por la adición de 1.0 mL de Trizol y el ARN total se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm. Se seleccionaron los cebadores apropiados para cada gen que se va a amplificar, utilizando el software Primer3 (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, EE.UU.). La expresión génica se evaluó por medio de PCR en tiempo real efectuado con TM5500 Rotor-gene (Corbett research, Sydney, Australia). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando los cebadores a 300 nm y SYBR Green (Invitroge, Carlsbad, CA, EE.UU.) a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min. a 60°C . El valor de los umbrales de fluorescencia (Ct) se determina automáticamente por el software, evaluando un coeficiente de amplificación de los genes estudiados entre 92 y 110%. Para cada muestra de ADNc, el valor de la expresión génica se expresó en términos de la relación entre el ct del gen constitutivo (esto es, el gen para la proteína beta-actina que representa el gen de control, ya que está presente en todas las células y no está sometido a la influencia de HAS) y el ct del gen de interés (esto es, el gen de IL-10 e IL-12), por consiguiente, el valor de ct constitutivo/ct del gen se indica en el eje de las ordenadas, que, por lo tanto, indica la cantidad de ARNm expresado por el gen que está siendo estudiado. Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 1 y 2:

Figura 1: el tratamiento de sinoviocitos humanos con HAS1 y HAS3 causó un aumento significativo en la expresión del gen de la citoquina IL-10 vs el control tratado con HA no sulfatado.

Figura 2:

También en este experimento, los dos grados de sulfatación (grado 1 y grado 3) de HAS resultó ser capaz de reducir significativamente la expresión del gen de IL-12, reduciendo a la mitad la síntesis de su ARNm vs el control tratado con HA no sulfatado. Por consiguiente, el ácido hialurónico sulfatado resultó ser:

- capaz de estimular la producción de ARNm nuevo para la síntesis de citoquinas antiinflamatorias, aumentando así la capacidad de defensa de la célula y por consiguiente de todo el organismo, vs aquellas patologías descritas previamente en las que IL-10 resultó ser de importancia fundamental para la resolución y/o la mejora de enfermedades tales como asma, artritis reumatoide, artrosis y todas las inflamaciones en las que IL-10 está implicada.

- eficaz en la disminución de la síntesis de ARNm nuevo de la citoquina IL-12 altamente pro-inflamatoria, lo que demuestra que es un agente antiinflamatorio válido capaz de intervenir en la expresión de proteínas implicadas en la patogénesis de enfermedades invalidantes tales como psoriasis, artritis y todos los descritos anteriormente.

Ejemplo 9

Inhibición de la unión de TNF con su receptor expresado en líneas de monocitos: evaluación de la eficacia de HAS grado 1 y grado 3 a diferentes valores de MW

- 5 Estos experimentos se realizaron para evaluar la eficacia de las muestras analizadas (preparadas de acuerdo con los Ejemplos 1-4) sobre la capacidad de inhibir la unión de TNF con su receptor expresado por las células del I.S. utilizado normalmente *in vitro* para este tipo de experimento, realizado con componentes de citoquinas yodados para una evaluación en ensayos de unión de radioligando.

El procedimiento experimental se llevó a cabo como se describe en Baglioni C. et al., J Biol Chem, 1985, 260:13395-13397.

- 10 En resumen, se utilizó la línea de histiocitos humanos del linfoma U937, con las características de los monocitos sensibles a la actividad citotóxica de TNF, que expresan su receptor relativo. Las células se incubaron inicialmente con ¹²⁵I-TNF 0.028 nM (realizada en agua) simultáneamente con las muestras que se van a analizar (a una concentración de 1 mg/mL, que resultó ser la concentración más baja que causa la inhibición máxima), en una solución reguladora de incubación que consiste en Tris-HCL 50 mM pH 7.4, EDTA 0.5 mM, a 4°C, durante 3 horas.

- 15 Al final de la incubación, las células se centrifugaron con ftalato de dibutilo/dinonilftalato 2/1 y el pellet obtenido se contó en un contador γ.

Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 3:

- 20 Los resultados obtenidos muestran la eficacia de HAS en inhibir totalmente (100%) la unión de TNF con su receptor, tanto para el grado 1 como para el grado 3, con un MW medio y bajo. Estos resultados son de importancia fundamental, ya que demuestran que el comportamiento del producto sulfatado es completamente análogo al de un anticuerpo monoclonal específico para el receptor de TNF, por lo tanto, capaz de bloquear su función. Este bloqueo del receptor en consecuencia, representa la forma más eficaz de antagonizar los efectos proinflamatorios y tumorales del factor TNF.

Ejemplo 10

- 25 Inhibición de la unión de la citoquina IL-1 a su receptor expresado en líneas de fibroblastos: evaluación de la eficacia de HAS grado 3 a diferentes valores de MW.

Estos experimentos se realizaron para evaluar la eficacia de las muestras analizadas (preparadas de acuerdo con los Ejemplos 1-3 y 4) de la capacidad de inhibir la unión de IL-1 a su receptor expresado por las células 3T3 de ratones, que normalmente se utiliza *in vitro* para este tipo de experimento, realizado con componentes de citoquinas yodados para una evaluación en ensayos de unión de radioligando.

- 30 El procedimiento experimental se llevó a cabo como se describe en Chin J et al., J Exp Med, 1987, 165:70-86.

- 35 En resumen, se utilizó la línea de fibroblastos murinos 3T3, sensible a la actividad citotóxica de IL-1, que expresa su receptor relativo. Las células se incubaron inicialmente con ¹²⁵I-IL-1 10 pM (realizada en agua) simultáneamente con las muestras que se van a analizar (a una concentración de 1 mg/mL, que resultó ser la concentración más baja que causa la inhibición máxima), en una solución reguladora de incubación que consta de RPMI 1640 que contiene HEPES 20 mM pH 7.2 y 1% de BSA, a 37°C, durante 2 horas. Al final de la incubación, las células se lavaron con solución reguladora de fosfato, después se disolvió en NaOH 2.5 M y se contaron en un contador γ.

Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 4:

- 40 Los resultados obtenidos muestran la eficacia de HAS (tanto con MW medio como bajo) en la inhibición de la unión de IL-1 con su receptor en un 30%. Estos resultados son extremadamente importantes, ya que demuestran que el comportamiento del producto sulfatado es completamente análogo al de un anticuerpo monoclonal específico para el receptor de la citoquina en cuestión, por lo tanto, capaz de bloquear su función. Este bloqueo del receptor representa la manera más efectiva de antagonizar los efectos proinflamatorios y tumorales de IL-1, como se describe anteriormente.

Ejemplo 11

- 45 Inhibición de la unión de la citoquina IL-6 con su receptor expresado en células de mieloma humano: evaluación de la eficacia de HAS grado 3 a valores diferentes de MW

Estos experimentos se realizaron para evaluar la eficacia de las muestras analizadas (preparadas de acuerdo con los Ejemplos 1-3 y 4) de la capacidad de inhibir la unión de IL-6 con su receptor expresado en el mieloma humano U266, que normalmente se utiliza *in vitro* para este tipo de experimento, realizado con componentes de citoquinas yodados para una evaluación en ensayos de unión de radioligando.

El procedimiento experimental se llevó a cabo como se describe en Taga T. et al., J Exp Med, 1987, 166:967-981.

En resumen, se utilizó la línea de mieloma humano U266, sensible a la actividad citotóxica de IL-6, que expresa su receptor relativo. Las células se incubaron inicialmente con ^{125}I -IL-6 0.08 nM (realizada en agua) simultáneamente con las muestras que se van a analizar (a una concentración de 1 mg/mL, que resultó ser la concentración más baja que causa la inhibición máxima), en una solución reguladora de incubación que consta de RPMI 1640 que contiene HEPES 25 mM pH 7,1 y 10% de BSA, a 4°C durante 16 horas. Al final de la incubación, las células se lavaron con solución reguladora fosfato, se centrifugaron a 9,000 rpm y el pellet se contó en un contador γ .

Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 5:

Los resultados obtenidos muestran la eficacia de HAS, tanto con MW medio como bajo, en la inhibición de la unión de IL-6 con su receptor hasta en un 100%. Estos resultados demuestran que en consecuencia el comportamiento del producto sulfatado, también en este caso, es completamente análogo al de un anticuerpo monoclonal específico para el receptor de la citoquina en cuestión, por lo tanto, capaz de bloquear su función. Este bloqueo del receptor representa la manera más efectiva de bloqueo de los efectos proinflamatorios de la IL-6.

Ejemplo 12

Evaluación del efecto inhibitor de HAS grado 1 y grado 3 en la síntesis de proteínas de las citoquinas IL-2, IL-7, IL-10 e IL-12 en PBMC humana

Para estos experimentos, se adoptaron las células mononucleadas de sangre periférica humana (PBMC), que se derivan de muchos donantes diferentes para evaluar el efecto de HAS en la producción de las citoquinas enumeradas anteriormente, utilizando:

- HA no sulfatado (MW medio: 200 KD),
- HAS1 y HAS3 (preparado como se describe en los Ejemplos 1-3 (MW medio: 200 kD).

La separación de la PBMC (Bøyum A., Scand J Clin Lab Invest 21 Suppl, 1968, 97:77-89) se realizó utilizando el producto Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) y siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. En el día cero se sembraron 100,000 células por pozo (utilizando placas de 96 pozos) en 200 μL de medio RPMI 1640, a la que 10% de suero bovino fetal, HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, 1% de penicilina-estreptomycin 100 U/mL, se había adicionado. El efecto de todas las muestras se evaluó en PBMC no tratada con agentes que estimulan la síntesis de citoquinas, o estimulada con lipopolisacárido LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) (altamente pro-inflamatorio) o con fitohemaglutinina PHA (10 $\mu\text{g/mL}$) (una sustancia capaz de estimular los linfocitos a dividirse), ambos agentes capaces de estimular la síntesis de citoquinas. Las células se trataron por separado con los tres compuestos a una concentración de 0.1 mg/mL o 1 mg/mL. Después de 24 horas de incubación a 37°C (5% de CO_2), se tomaron 100 μL de sobrenadante de cada pozo con el fin de analizar la producción de IL-2, IL-7, IL-10 e IL-12.

La cuantificación de los mediadores de la inflamación se realizó por medio de la tecnología SearchLight®, utilizando una placa Custom Human 9-Plex Array siguiendo el protocolo indicado por el proveedor en la tarjeta técnica. Los resultados obtenidos se expresan en las Figuras 6-9: Estos gráficos muestran claramente que HAS grado 1 y grado 3 son capaces de reducir significativamente la síntesis de IL-2, IL-7 e IL-12 por parte de los monocitos, tanto cuando las células no son estimuladas y también cuando, por el contrario, se estimulan por factores inflamatorios específicos y potentes y/o mitógenos. HAS por lo tanto resulta ser una molécula con características farmacológicas precisas, capaz de modular/regular la síntesis de citoquinas con una actividad anti-inflamatoria marcada, tanto en situaciones en las que no se estimula una respuesta inmune y, en particular eventos de estrés inflamatorio en el que la célula inmune responde produciendo una cascada de citoquinas y, sobre todo, en este caso, los datos presentados revelan un mayor efecto modulador de HAS.

La figura 9, por otra parte, confirma el estímulo evidente para la producción de IL-10 también para células tales como monocitos humanos (además de sinoviocitos) pertenecientes al sistema inmunológico. Se confirma una vez más que HAS en consecuencia es capaz de modular la síntesis de citoquinas, estimulando las que son antiinflamatorias y que inhiben la síntesis de citoquinas proinflamatorias.

Ejemplo 13

Preparación de una formulación en forma de una solución para inhalaciones que contienen ácido hialurónico sulfatado grado 1

40 mg (o 20 mg si el HAS tiene un MW de 500-730 KD) de ácido hialurónico sulfatado grado 1, que tiene un MW bajo o medio, se introducen en un matraz de vidrio de 50 mL, después de lo cual se adicionan 15 mL de PBS 0.2 M a pH 7.4 estéril. La mezcla se somete a agitación durante aproximadamente 30 minutos, hasta la disolución completa del polvo.

Cuando se ha obtenido la disolución completa, se adicionan 2 mL de propilenglicol y más PBS 0.2 M a pH 7.4 estéril hasta que se alcanza el volumen total de 20 mL. La solución se mantiene en agitación durante unos pocos minutos.

Ejemplo 14

- 5 Preparación de una formulación en forma de una solución para inhalaciones que contiene ácido hialurónico sulfatado grado 3

10 100 mg de ácido hialurónico sulfatado grado 3 obtenido a partir de HA 200 kD se introducen en un matraz de vidrio de 50 mL, después de lo cual, se adicionan 15 mL de PBS 0.2 M a pH 7.4, estéril. La mezcla se somete a agitación durante aproximadamente 30 minutos, hasta la disolución completa del polvo. Cuando se ha obtenido la disolución completa, se adicionan 2 mL de propilenglicol y más PBS 0.2 M a pH 7.4 estéril hasta que se alcanza el volumen total de 20 mL. La solución se mantiene en agitación durante unos pocos minutos.

Ejemplo 15

Preparación de una formulación en forma de una solución inyectable para uso intraarticular que contiene ácido hialurónico sulfatado grado 1

- 15 Se introducen 500 mg de ácido hialurónico sulfatado grado 1 obtenido a partir de HA con un MW de 500-730 KD en un matraz de vidrio de 50 mL, y a continuación, se adiciona PBS 0.2 M a pH 7.4, estéril, hasta que se alcanza el volumen total de 20 mL. La mezcla se somete a agitación durante aproximadamente 60 minutos, hasta la disolución completa del polvo.

Ejemplo 16

Preparación de una formulación en forma de un gel hidrófilo que contiene HAS, HA y CMC

- 20 Se disuelven metil- y propil-parabeno en agua purificada a 80°C. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, se agregó hialuronato de sodio con agitación hasta disolución seguido de HAS1 (o HAS3), manteniendo la agitación hasta la disolución completa. A continuación, se adicionan glicerol y propilenglicol bajo agitación hasta disolución completa. Finalmente se adiciona carboximetilcelulosa de sodio (CMC) y la mezcla se mezcla hasta que se obtiene una solución gelificada.

- 25 Ejemplo 17

Preparación de una formulación en forma de un gel hidrófilo para el uso de la mucosa (sin conservantes) que contiene HAS y HA

- 30 El hialuronato de sodio se disuelve con agitación, y luego HAS1 (o HAS3) en una cantidad de agua de aproximadamente el 90% de la prevista en la fórmula. Se adicionan propilenglicol, Syndiol 68 seguido por MP Diol de glicol y la mezcla se mezcla hasta la disolución completa de los diversos componentes. Posteriormente se adiciona Carbómero 974P y se mantiene la agitación hasta la dispersión homogénea de este último. Las perlas de hidróxido de sodio se disuelven en el 10% restante de agua y se adiciona esta solución a la que anteriormente se obtiene, para obtener la gelificación de la fase acuosa.

Ejemplo 18

- 35 Preparación de una formulación en forma de una barra de labios que contiene HAS y HA

- 40 La cantidad correcta de parafina líquida indicada en la fórmula de fabricación se carga en un recipiente apropiado. Se calienta a 88-92°C y a continuación, se adicionan parafina blanda blanca, parafina dura, cera de abejas blanca, ceresina, arlacel bajo agitación, la agitación se mantiene hasta la fusión completa de los diversos componentes. A continuación, se incorporan acetato de all-rac-a-tocoferil, alantoína, butilhidroxitolueno, propil p-hidroxibenzoato de metilo y la mezcla se mezcla hasta la disolución completa, manteniendo la masa de 88 a 92°C.

La cantidad de agua purificada prevista en la fórmula se carga por separado en un recipiente apropiado, a continuación, se adicionan hialuronato de sodio, HAS1 (o HAS3), con agitación hasta disolución completa, seguido de edetato disódico manteniendo la agitación hasta la disolución.

- 45 La fase acuosa se transfiere bajo agitación al recipiente que contiene la masa fundida, manteniendo el sistema a 88-92°C y la agitación hasta que se obtiene una solución límpida. A continuación, se adicionan los dos agentes aromatizantes con agitación y la mezcla se mezcla durante 10'. La masa fundida se vierte en moldes y se enfría inmediatamente a $T < 0^{\circ}\text{C}$ hasta que se obtienen barras sólidas.

Ejemplo 19

Preparación de una formulación en forma de óvulos vaginales que contienen HAS y HA

- 5 Se deja que la gelatina se hinche en 70% de agua purificada a 85°C; en la cantidad restante de agua se disuelven hialuronato de sodio y HAS1 (o HAS3) y esta solución se mezcla con la glicerina llevada a la misma temperatura. La solución de glicerina se adiciona a la solución de gelatina hinchada y se mantiene la agitación hasta la disolución completa de la gelatina. La masa se vierte en moldes y se enfría a $T < 0^{\circ}\text{C}$ hasta que se obtienen óvulos sólidos.

Ejemplo 20

Preparación de una formulación en forma de una crema hidrófila que contiene HAS y HA

- 10 La fase oleosa se prepara por fusión de parafina líquida, ácido esteárico y Tefose 1500 bajo agitación a 50°C. La fase acuosa se prepara por separado por la disolución inicial a 80°C de metil-parabeno y posterior enfriamiento a temperatura ambiente y la incorporación de glicerol, hialuronato de sodio y posteriormente HAS1 (o HAS3) con agitación hasta la disolución completa de los diversos componentes.

La fase acuosa se une a la fase oleosa y se efectúa la emulsión, la emulsión O/A obtenida se enfría bajo agitación a temperatura ambiente.

Ejemplo 21

- 15 Preparación de una formulación en forma de un ungüento que contiene HAS

El ungüento base se prepara por fusión de parafina líquida ligera y vaselina blanca bajo agitación a 70°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se incorpora con agitación HAS1 (o HAS3) y la mezcla se mezcla hasta que se obtiene una suspensión homogénea.

Ejemplo 22

- 20 Preparación de una formulación en forma de cápsulas (gelatina dura) que contienen HAS

HAS1 (HAS3) se mezcla con fosfato de calcio, estearato de magnesio y sílica por dilución progresiva. A continuación, se llenan las cápsulas.

Ejemplo 23

Preparación de una formulación en forma de comprimidos que contienen HAS

- 25 HAS1 (o HAS3) se somete a granulación en húmedo en un lecho fluido con una solución de ligando que consiste en agua y aproximadamente 70% de la cantidad total de CMC de sodio. El granulado obtenido se somete a tamizado en una malla de 0.8 mm.

Los ingredientes restantes (fosfato de calcio, celulosa microcristalina, CMC de sodio y sílica) se mezclan y se tamizan en una malla de 0.8 mm.

- 30 El granulado obtenido anteriormente se mezcla con la mezcla que consiste de los ingredientes restantes (extragránulos), y finalmente se mezcla con estearato de magnesio (previamente tamizado en una malla de 0.8 mm), seguido de compresión.

Ejemplo 24

Preparación de una formulación en forma de una solución para inyección que contiene HAS

- 35 Después de la preparación (a temperatura ambiente) de una solución fisiológica regulada a pH 6.4-7.2, la lactosa se disuelve con agitación y finalmente HAS1 o HAS3. La solución así obtenida se filtra sobre 0.22 micras.

Tabla

Gel hidrófilo (Ejemplo 16)	
Componentes	Cantidad (mg/1 g de hidrogel)
HAS1 (HAS3)	40 mg (10 mg)
CMC	20 mg

Glicerol	100 mg
Propilenglicol	66,75 mg
Hialuronato de Sodio	2 mg
Metil p-hidroxibenzoato	2 mg
Propil p-hidroxibenzoato	0,2 mg
Agua purificada	c.s. a 1 g

Gel hidrófilo para uso en mucosa (Ejemplo 17)

Componentes	Cantidad (mg/1 g de hidrogel)
HAS1 (HAS3)	10 mg
Carbómero 974P	15 mg
Propilenglicol	100 mg
Hidróxido de sodio	0,33 mg
Hialuronato de Sodio	2 mg
MP-diol Glicol	37,5 mg
SymDiol 68	90 mg
Agua purificada	c.s. a 1 g

Barra de labios (Ejemplo 18)	
Componentes	Cantidad (mg/1 g de hidrogel)
HAS1 (HAS3)	30 mg (10 mg)
Parafina líquida	253,2 mg
Parafina blanca suave	326,2 mg
Parafina dura	144,3 mg
Cera de abejas blanca	96 mg
Ceresina	28,2 mg
Arlacel 582	95,8 mg
Hialuronato de Sodio	2 mg
Alantoína	1,1 mg
todo-rac-a acetato de tocoferol	1,1 mg
Propil p-hidroxibenzoato	0,4 mg
Butilhidroxitolueno	0,4 mg

Agua purificada	19,2 mg
Edetato disódico	1,1 mg
Sabor de vainilla	0,5 mg
Sabor dulce	0,5 mg
Óvulos vaginales (Ejemplo 19)	
Componentes	Cantidad (mg/1 g de óvulo)
HAS1 (HAS3)	10 mg
Glicerina	580
Gelatina	200
Hialuronato de Sodio	2
Agua purificada	c.s. a 1 g
Crema hidrófila (emulsión O/A) (Ejemplo 20)	
Componentes	Cantidad mg/1 g de crema)
HAS1 (HAS3)	10 mg
Tefose 1500	110 mg
Glicerol	80 mg
Ácido esteárico	33 mg
Hialuronato de Sodio	2 mg
Parafina líquida	40 mg
Metil p-hidroxibenzoato	1 mg
Agua purificada	c.s. a 1 g
Ungüento (Ejemplo 21)	
Componentes	Cantidad (mg/1 g de ungüento)
HAS1 (HAS3)	20 mg
Parafina líquida clara	200 mg
Vaselina blanca	c.s. a 1 g

Cápsulas (gelatina dura) (Ejemplo 22)	
Componentes	Cantidad mg/cápsula)
HAS-1 (HAS3)	80 mg (40 mg)
Fosfato de Calcio	256 mg
Estearato de magnesio	7 mg
Sílica	7 mg
Comprimidos (Ejemplo 23)	
Componentes	Cantidad (mg/comprimido)
HAS-1 (HAS-3)	120 mg
Fosfato de Calcio	200
Celulosa microcristalina	185
Carboximetilcelulosa de sodio	10
Estearato de magnesio	10
Sílica	15
Formulaciones para inyección (Ejemplo 24)	
Componentes	Cantidad (mg/mL de sol)
HAS-3	50 mg
Lactosa	0, 93 mg
Fosfato de potasio dibásico	0, 36
Fosfato de potasio monobásico	0,23
Cloruro de sodio	9

Reivindicaciones

1. Ácido hialurónico sulfatado para su uso en la prevención y/o tratamiento del asma asociada con la activación de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 y TNF, dicho ácido hialurónico (HA) sulfatado, que tiene un peso molecular que varía de 10,000 a 50,000 Da, 150,000 a 250,000 Da y 500,000 a 750,000 Da y un grado de sulfatación igual a 1 o a 3.
- 5 2. Ácido hialurónico sulfatado para su uso en la prevención y/o tratamiento de eczema y dermatitis de inmunodeficiencia asociada con déficit de IL-10, dicho ácido hialurónico sulfatado (HA), que tiene un peso molecular que varía de 10,000 a 50,000 Da, 150,000 a 250,000 Da y 500,000 a 750,000 Da y un grado de sulfatación igual a 1 o a 3.
3. El ácido hialurónico sulfatado para uso de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, para la administración sistémica.
- 10 4. El ácido hialurónico sulfatado de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 para la administración por inhalación o tópica.

Fig. 1

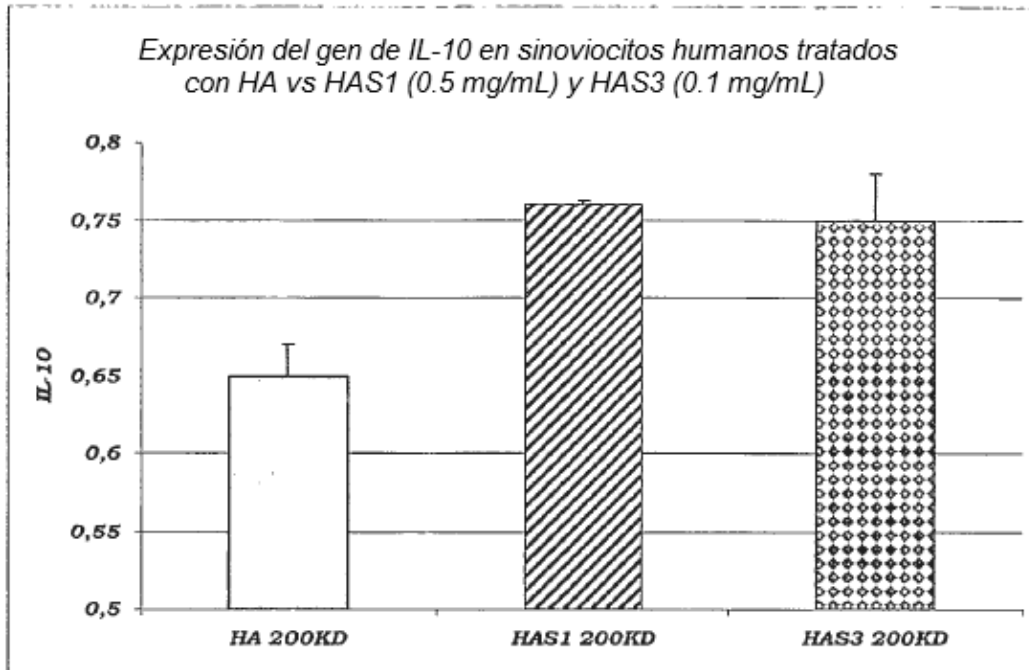


Fig. 2

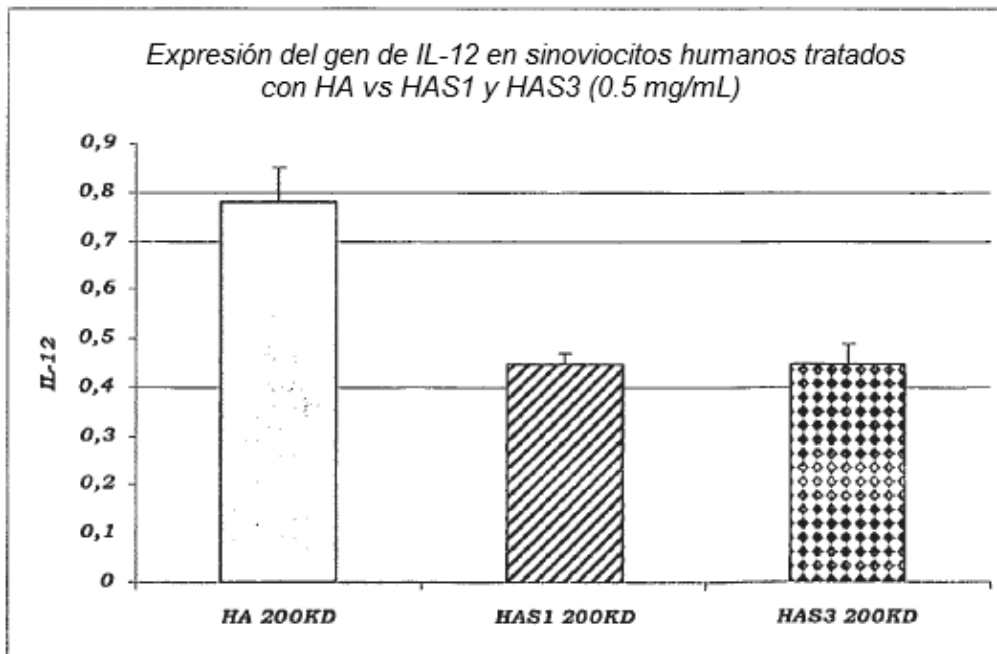


Fig. 3

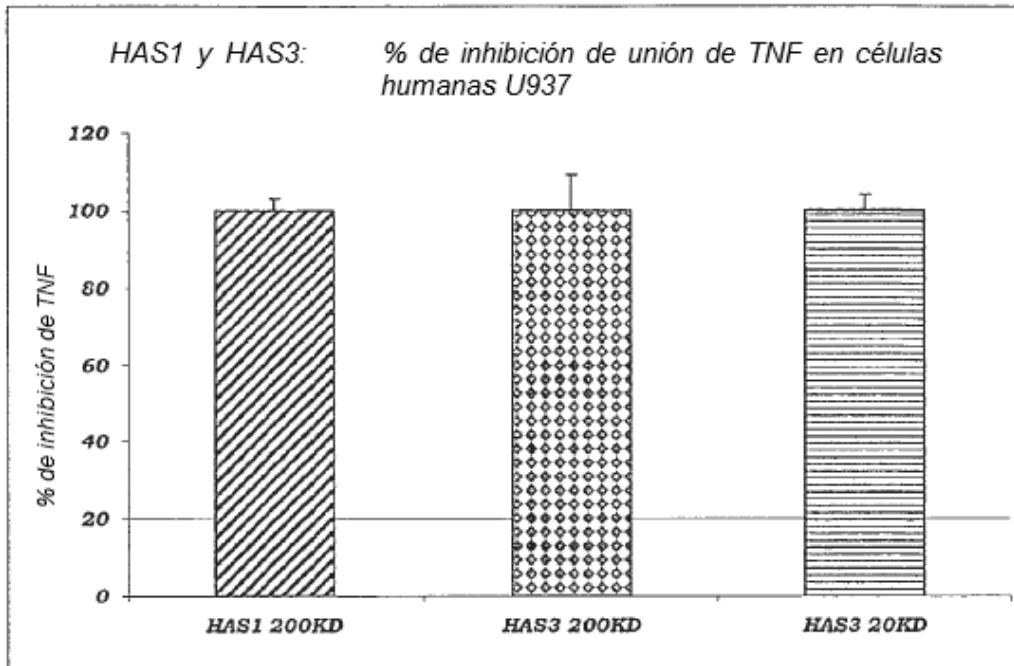


Fig. 4

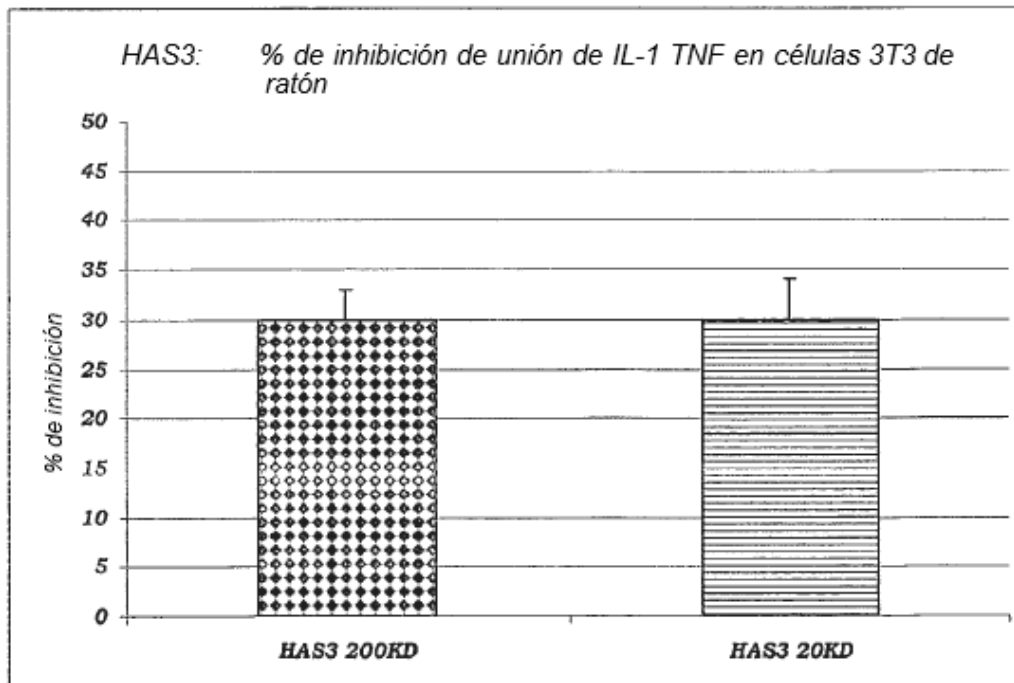


Fig. 5

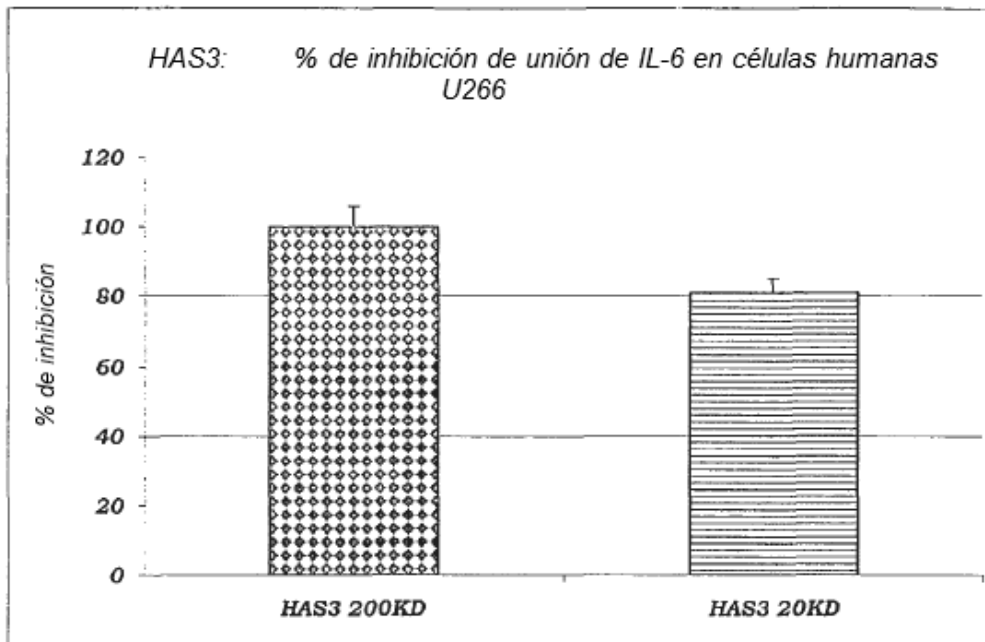


Fig. 6

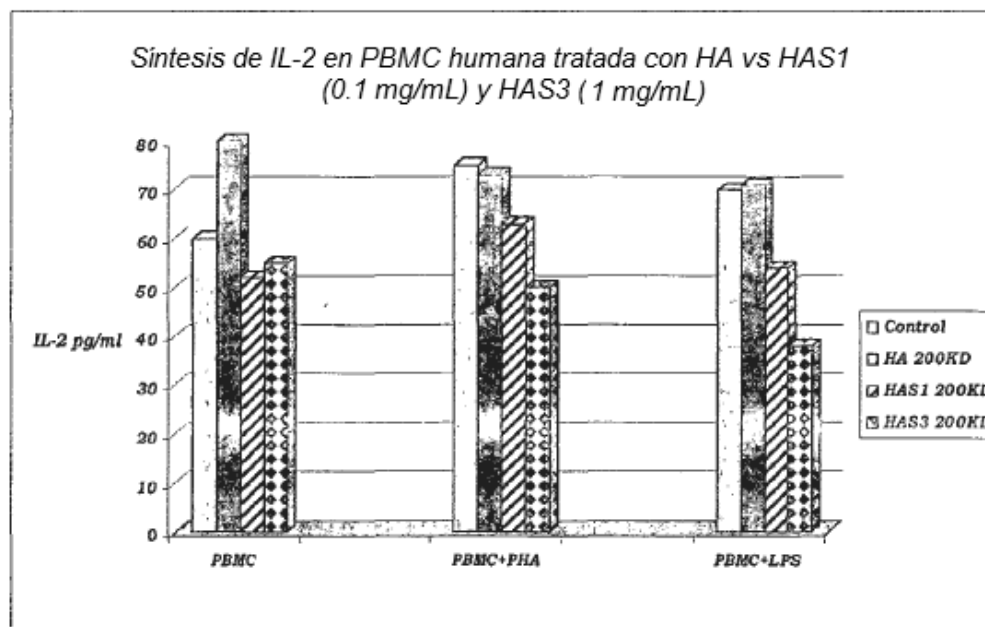


Fig. 7

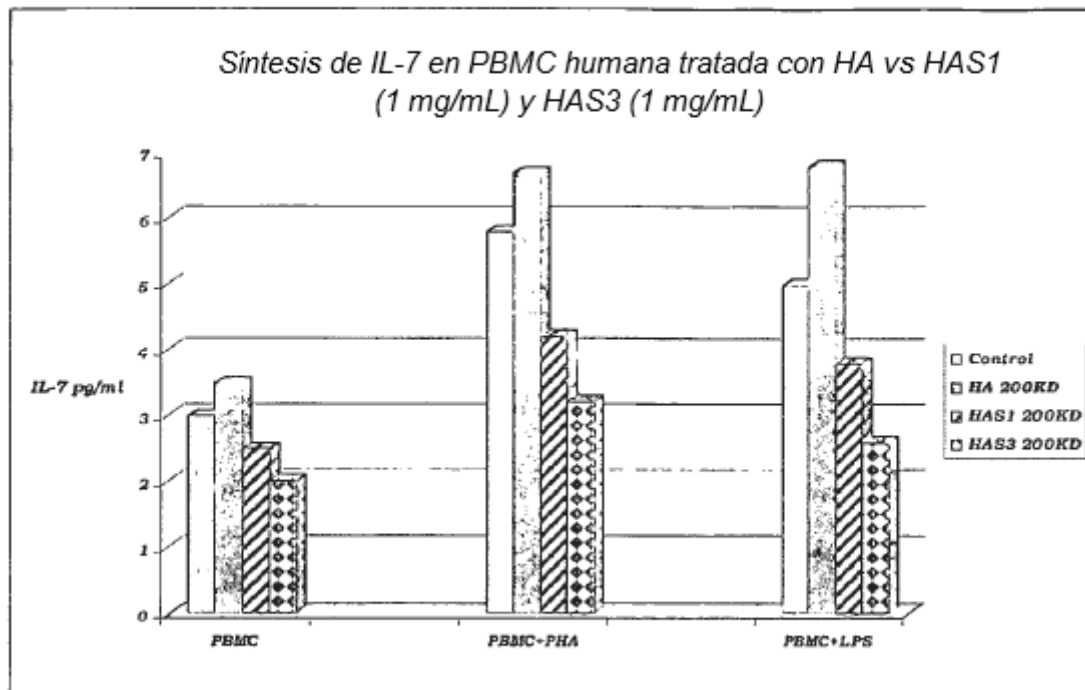


Fig. 8

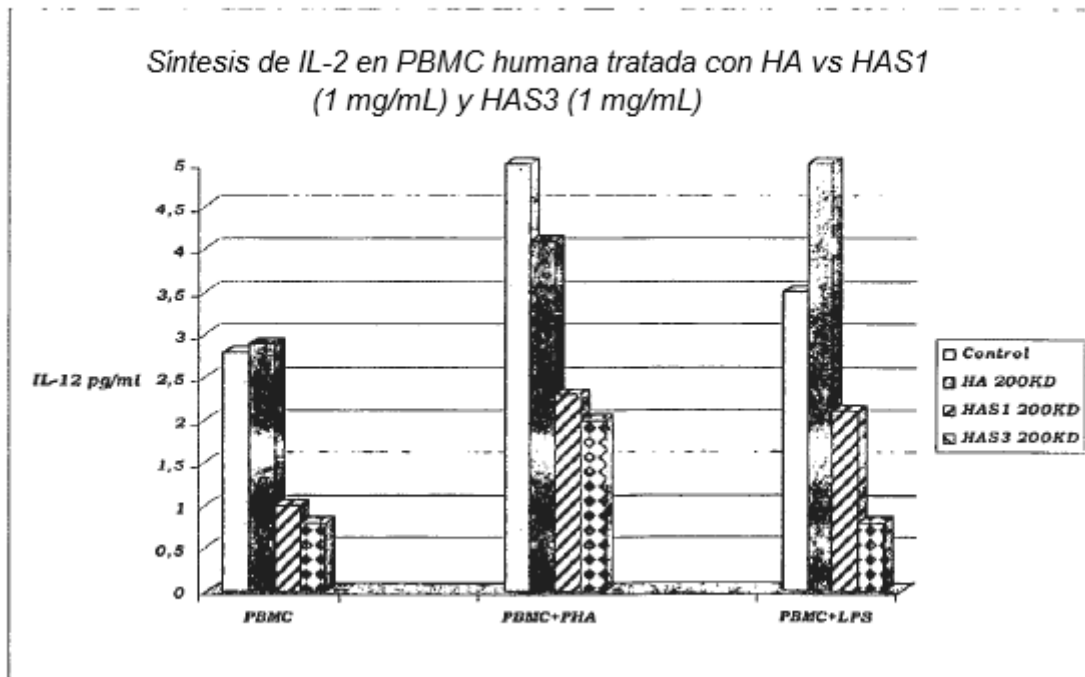


Fig. 9

