(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 701 787**

(51) Int. CI.:

***A61K 9/08*** (2006.01)
***A61K 31/355*** (2006.01)
***A61K 31/375*** (2006.01)
***A61K 31/59*** (2006.01)
***A61K 31/728*** (2006.01)
***A61K 47/02*** (2006.01)
***A61P 19/02*** (2006.01)
***A61P 29/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2012 E 12150251 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2570118**

(54) Título: **Combinaciones de ácido hialurónico y una vitamina para inhibir inflamación**

(30) Prioridad:

**16.09.2011 TW 100133355**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**25.02.2019**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**LIN, FENG-HUEI;**
**HUANG, TENG-LE;**
**HSU, HORNG-CHAUNG;**
**YAO, CHUN-HSU;**
**CHEN, YUEH-SHENG y**
**SU, WEN-YU**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

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

Combinaciones de ácido hialurónico y una vitamina para inhibir inflamación

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de inflamación, en especial, a una composición farmacéutica útil para la artritis.

**Descripciones de la técnica relacionada**

La artritis es una enfermedad crónica común que conduce al dolor de articulaciones debido a la degeneración de cartílago articular o la inflamación de tejido conectivo, y afecta, de este modo, el movimiento normal de la articulación. De acuerdo con la ubicación y las causas de la ocurrencia, la artritis puede clasificarse en más de cien tipos. Los tipos más comunes comprenden osteoartritis (artritis degenerativa), artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis séptica, espondilitis anquilosante, y lupus eritematoso.

Con respecto a la terapia de artritis, la terapia inicial adopta, de manera general, procedimientos conservadores y no quirúrgicos, tales como tratamientos medicinales y tratamiento inyectable. Cuando la terapia inicial resulta ineficaz, se adoptará entonces un tratamiento de operación quirúrgica. Se ha conocido que los tratamientos medicinales comprenden el uso de medicamentos antiinflamatorios esteroides y medicamentos antiinflamatorios no esteroides. A pesar de que los medicamentos antiinflamatorios esteroides pueden proporcionar un efecto analgésico rápido y efectivo, los medicamentos pueden causar muchos efectos secundarios, tales como osteoporosis, heridas no cicatrizadas, sagrado de la parte superior del intestino, o pueden incluso agravar los síntomas de hipertensión o diabetes. De este modo, estos medicamentos se excluyen gradualmente con respecto al tratamiento medicinal. En cuanto a medicamentos antiinflamatorios no esteroides, a pesar de que estos pueden proporcionar un buen efecto analgésico, si su usan durante un tiempo prolongado, pueden aparecer efectos secundarios, tales como úlcera péptica, hidropesía en miembros inferiores, daño de la función renal, etc. De este modo, los medicamentos no esteroides se restringen en la aplicación práctica.

Se ha conocido que el ácido hialurónico (también conocido como hialuronano o ácido aldurónico) se ha usado ampliamente en formulaciones inyectables para inhibir osteoartritis. En este caso, una solución inyectable que contiene ácido hialurónico se inyecta directamente en la articulación de un paciente para aliviar, de manera moderada, la inflamación y mitigar la sensación de dolor. El mecanismo del ácido hialurónico todavía no resulta claro hasta la fecha, pero se ha conocido que el ácido hialurónico puede actuar, además, como un lubricante para asistir en el movimiento de articulaciones, y mientras tanto, mejora la función articular. Sin embargo, se ha descubierto que, a pesar de que el ácido hialurónico puede mitigar el dolor de manera eficaz, cuando ingresa en el cuerpo humano, es posible que induzca respuestas inflamatorias temporales dentro de varios días, o incluso puede causar inflamación crónica (véase Leopold et al., Increased frequency of acute local reaction to intra-articular hylan GF-20 (Synvisc) in patients receiving more than one course of treatment. J Bone Joint Surg, 2002; 84: 1619-23; Bernardeau et al., Acute arthritis after intra-articular hyaluronate injection: onset of effusions without crystal. Ann Rheum Dis, 2001;60:518-20; y Kroesen et al., Induction of an acute attack of calcium pyrophosphate dehydrate arthritis by intra-articular injection of hylan G-F 20 (Synvisc). Clin Rheumatol, 2000; 19: 147-9). Por lo tanto, si se puede proporcionar un efecto antiinflamatorio conveniente mediante una dosis baja de ácido hialurónico, las respuestas inflamatorias posteriores que son inducidas después de que el ácido hialurónico ingresa en el cuerpo humano pueden aliviarse o incluso, pueden evitarse.

Se ha informado un procedimiento para mejorar una formulación de ácido hialurónico. En este procedimiento, mediante el uso de un procedimiento de síntesis química, el ácido hialurónico se une con metotrexato (MTX) con actividad antiinflamatoria mediante un polipéptido para formar un conjugado, y el producto resultante ha mejorado los efectos antiinflamatorios (véase Homma et al., Novel hyaluronic acid-methotrexate conjugates for osteoarthritis treatment, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17 (2009), 4647-4656).

Sin embargo, de acuerdo con la enseñanza de este documento, una mezcla que se obtiene al mezclar simplemente ácido hialurónico y metotrexato no puede lograr el efecto de mejora; en otras palabras, la síntesis del conjugado resulta necesaria. Sin embargo, para preparar el conjugado se necesita un material de polipéptido y se incluyen etapas de síntesis complicadas, que deben aumentar el coste de producción de una formulación de ácido hialurónico. De este modo, este procedimiento no solo presenta dificultad en un procedimiento de preparación para fabricación a escala, sino que también aumenta la carga económica de usuarios, y, de acuerdo con esto, presenta muchas limitaciones en aplicación clínica.

El documento US 2002/0068718 A1 se refiere, además, a este campo del estado de la técnica.

Los inventores de la presente invención demostraron que una combinación de vitamina y ácido hialurónico puede proporcionar un efecto antiinflamatorio mejorado, y, de este modo, un efecto antiinflamatorio conveniente puede proporcionarse mediante una dosis baja de ácido hialurónico, aliviando o evitando así las respuestas inflamatorias temporales que son inducidas después de que el ácido hialurónico ingresa en el cuerpo humano.

**Sumario de la invención**

El objetivo principal de esta invención consiste en proporcionar una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de inflamación, que comprende: (a) ácido hialurónico; (b) una vitamina; y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro objetivo consiste en divulgar un procedimiento para inhibir la inflamación en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad efectiva de una composición que comprende ácido hialurónico y una vitamina.

Incluso otro objetivo de esta invención consiste en proporcionar un kit para su uso en la inhibición de inflamación, que comprende una primera parte que contiene una cantidad efectiva de ácido hialurónico, y una segunda parte que contiene una cantidad efectiva de una vitamina.

La tecnología detallada y las realizaciones preferidas que se implementan para la invención objeto se describen en los siguientes párrafos que acompañan los dibujos adjuntos para personas capacitadas en este campo para que aprecien bien las características de la invención que se reivindica.

**Breve descripción de los dibujos**

La **Fig. 1** es un diagrama de columnas estadístico que muestra el nivel de expresión del mediador de inflamación, factor de necrosis tumoral-a (TNF-α) en los sinoviocitos similares a fibroblastos que se tratan con vitamina C;

La **Fig. 2** es un diagrama de columnas estadístico que muestra el nivel de expresión del mediador de inflamación, interleucina 1-β (IL-1-β), en los sinoviocitos similares a fibroblastos que se tratan con vitamina C;

La **Fig. 3** es un diagrama de columnas estadístico que muestra el nivel de expresión de TNF-α en los sinoviocitos similares a fibroblastos que se tratan con vitamina D;

La **Fig. 4** es un diagrama de columnas estadístico que muestra el nivel de expresión de IL-1-β en los sinoviocitos similares a fibroblastos que se tratan con vitamina D;

La **Fig. 5** es un diagrama de columnas estadístico que muestra el nivel de expresión de TNF-α en los sinoviocitos similares a fibroblastos que se tratan con vitamina E; y

La **Fig. 6** es un diagrama de columnas estadístico que muestra el nivel de expresión de IL-1-β en los sinoviocitos similares a fibroblastos que se tratan con vitamina E.

**Descripción detallada de la invención**

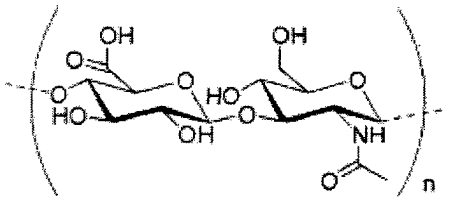
A menos que se indique lo contrario en la presente, los términos “un (una)”, “el” o similares se usan en esta especificación (en especial en las Reivindicaciones que siguen a continuación) se deberán comprenderse que abarcan tanto la forma singular como plural.

Según se indica anteriormente, después de que el ácido hialurónico ingresa en el cuerpo humano, este puede inducir algunas veces respuestas inflamatorias temporales dentro de unos pocos días, o puede incluso causar inflamación crónica, influyendo así de manera negativa en el efecto antiinflamatorio de este. En otro aspecto, el procedimiento mejorado que se propone en el documento para preparar un conjugado de ácido hialurónico y metotrexato presenta muchas limitaciones. A través de la combinación de ácido hialurónico y vitamina, la presente invención mejora las desventajas de formulaciones convencionales de ácido hialurónico usando un enfoque simple.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de inflamación, que comprende (a) ácido hialurónico; (b) una vitamina; y (c) un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el componente (b) es (i) vitamina D, o, al menos, una de vitamina C y vitamina E, en la que cuando el componente (b) es vitamina D, el componente (a) y el componente (b) están presentes en una relación en peso de componente (a)/componente (b) = aproximadamente de 1.000/1 a aproximadamente de 100.000/1, y cuando el componente (b) es, al menos, una de vitamina C y vitamina E, el componente (a) y componente (b) están presentes en una relación en peso de componente(a)/componente (b) = aproximadamente de 1/1 a aproximadamente de 10/1.

El ácido hialurónico es uno de los componentes principales en la matriz extracelular, y se distribuye ampliamente en el tejido endotelial, tejido conectivo, tejido epidérmico, y tejido nervioso. El ácido hialurónico resulta además crítico para la actividad fisiológica de células, como proliferación, migración, etc. De manera adicional, debido a que el ácido hialurónico constituye un ingrediente de humectación importante en la dermis de la piel y tiene una viscosidad y elasticidad excelentes, resulta ser un relleno ideal y se usa comúnmente en productos cosméticos y cirugías plásticas.

El ácido hialurónico es un glicosoaminglicano sin sulfuro. La estructura básica de ácido hialurónico es un polisacárido largo que se compone de dos unidades de disacáridos, ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina y tiene una estructura química de la fórmula siguiente (I):



(I).

El ácido hialurónico puede prepararse a partir de materiales naturales. Por ejemplo, puede extraerse a partir de cresta de gallo, cordón umbilical, cartílago, piel, etc. Puede producirse, además, mediante síntesis química o mediante cultivo o ingeniería genética usando microorganismos como levadura y así sucesivamente. Las formulaciones de ácido hialurónico comerciales pueden usarse, además, como la fuente de ácido hialurónico en la composición farmacéutica de la presente invención, por ejemplo, una formulación que comprende una solución acuosa de ácido hialurónico sódico, tal como ARTZ Dispo®, SYNVISC®, HYALGAN®, ORTHOVISC®, etc.; o una formulación que comprende una solución acuosa de derivados de ácido hialurónico entrecruzados, tal como SYNVISC® y DUROLANE®.

No existe un límite en particular para el ácido hialurónico (componente (a)) en la composición farmacéutica de la presente invención, pero el peso molecular promedio de ácido hialurónico es preferiblemente de aproximadamente de 30 KDa a aproximadamente de 10.000 KDa, y más preferiblemente, de aproximadamente de 500 KDa a aproximadamente de 6.000 KDa. De manera adicional, el ácido hialurónico puede encontrarse en una forma iónica (a saber, sin formar una sal) o en una forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables de ácido hialurónico comprenden sales que se forman mediante una combinación de ácido hialurónico con una base inorgánica (por ejemplo, sales de iones metálicos alcalinos tal como, sales de sodio o sales de potasio; sales de iones metálicos alcalinotérreos, tales como sales de magnesio o sales de calcio; sal amónica, etc.); o sales que se forman mediante la combinación de ácido hialurónico con una base orgánica (por ejemplo, dietanolamina, ciclohexilamina, aminoácidos, etc.).

Las vitaminas constituyen micronutrientes esenciales para los organismos vivos. Las vitaminas no pueden producirse por acción propia de los organismos vivos y deben obtenerse a partir de fuentes externas, tal como la dieta. A pesar de que las vitaminas no pueden producir energía en el organismo vivo como carbohidratos, proteína y grasa, estas tienen una importante función reguladora en el metabolismo del organismo. Según se muestra en los siguientes ejemplos, los inventores de la presente invención demostraron que, en comparación con la administración de vitamina o ácido hialurónico por separado, la combinación de ácido hialurónico y vitamina puede proporcionar, de manera sorprendente, un efecto antiinflamatorio mejorado. Por lo tanto, la combinación de ácido hialurónico y vitamina puede proporcionar un efecto antiinflamatorio conveniente mediante una dosis baja de ácido hialurónico, aliviando así o incluso evitando las respuestas inflamatorias posteriores que se inducen después de que el ácido hialurónico ingresa en el cuerpo humano.

El componente (b) en la composición farmacéutica que se divulga consiste preferiblemente en una vitamina que se selecciona a partir de un grupo que consiste de vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E, y combinaciones de estas. El componente (b) en la composición farmacéutica de la presente invención consiste en una vitamina que se selecciona a partir de un grupo que consiste de vitamina C, vitamina D, vitamina E, y combinaciones de estas.

En la composición farmacéutica que se divulga, no existe un límite en particular en cuanto a la relación de contenido del componente (a) con respecto al componente (b). Cuando el componente (b) en la composición farmacéutica de la presente invención es, al menos, una de vitamina C o vitamina E, el componente (a) y el componente (b) están presentes en una relación en peso de componente (a)/componente (b) = aproximadamente de 1/1 a aproximadamente de 10/1. Cuando el componente (b) en la composición farmacéutica de la presente invención es vitamina D, el componente (a) y el componente (b) están presentes en una relación en peso de componente (a)/componente (b) = aproximadamente de 1.000/1 a aproximadamente de 100.000/1, y preferiblemente están presentes en una relación en peso de componente (a)/componente (b) = aproximadamente de 8.000/1 a aproximadamente de 15.000/1.

La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse tanto para medicina veterinaria como humana, y puede encontrarse en cualquier forma adecuada y puede aplicarse mediante cualquier manera adecuada sin límites en particular. Por ejemplo, pero sin así limitarse a ello, la composición farmacéutica puede administrarse mediante administración oral, inyección subcutánea, inyección intravenosa, o inyección intraarticular, etc. Dependiendo de la forma y propósito de la composición farmacéutica que se divulga, la composición farmacéutica puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable como componente (c).

En cuanto a la fabricación de un medicamento adecuado para administración oral, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable que no ejerce influencia adversa en la actividad del ácido hialurónico y vitamina, tales como solventes, solventes aceitosos, disolventes, estabilizadores,

agentes retardadores de absorción, desintegradores, emulsionantes, antioxidantes, aglutinantes, lubricantes, absorbentes de humedad, etc. La composición farmacéutica puede prepararse en una forma adecuada para administración oral mediante cualquier enfoque adecuado, tal como una tableta, una cápsula, un gránulo, polvo, un extracto de fluido, una solución, un jarabe, una suspensión, una emulsión, una tintura, etc.

En cuanto a un medicamente adecuado para inyección subcutánea, intravenosa, o intraarticular, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender uno o más aditivos, tal como un agente ajustador de pH, un reactivo isotónico, un estabilizador (tal como bisulfato de sodio, sulfato de dihidrógeno de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de sodio, o cloruro de sodio, etc.), una solución isotónica, un agua para inyección, una solución de regulador salino, o un regulador salino (tal como una solución de regulador de fosfato o una solución de regulador de citrato), etc., para producir una inyección intravenosa, una inyección intravenosa de emulsión, una inyección en polvo, una inyección de suspensión, una inyección de suspensión en polvo, etc.

De manera opcional, otros aditivos, tal como un agente saborizante, un tóner, un agente colorante, etc., se pueden agregar a la composición farmacéutica de la presente invención para mejorar el sabor y la atracción visual de la composición. Una cantidad adecuada de un conservante, un conservador, un antiséptico, un reactivo antifúngico, y así sucesivamente, puede agregarse también para mejorar el almacenamiento del medicamente resultante.

La composición farmacéutica puede comprender, de manera adicional, uno o más de otros componentes activos para mejorar el efecto del medicamente o aumentar la flexibilidad para la formulación. Por ejemplo, uno o más componentes activos, tales como medicamentos antiinflamatorios esteroides, medicamentos antiinflamatorios no esteroides, glucosamina, y otros componentes activos, etc., pueden incorporarse a la composición farmacéutica de la presente invención, siempre que los otros componentes activos no tengan un efecto negativo en el ácido hialurónico y vitamina.

Debido a que la composición farmacéutica de la presente invención puede proporcionar un efecto antiinflamatorio mejorado, esta puede usarse para inhibir la inflamación, en especial, para inhibir artritis, tal como osteoartritis (artritis degenerativa), artritis reumatoide, artritis gotosa, artritis séptica, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso, etc., y puede usarse, preferiblemente para inhibir osteoartritis y artritis reumatoide. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención se prepara en una formulación inyectable para un procedimiento de tratamiento usando inyección intraarticular.

En comparación con las formulaciones de ácido hialurónico convencionales que no pueden proporcionar un efecto curativo significativo en artritis reumatoide, una de las ventajas de la composición farmacéutica de la presente invención consiste en que esta puede proporcionar un efecto inhibidor excelente en la artritis reumatoide mediante la inhibición de la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF, que constituye un importante factor patogénico de la artritis reumatoide) a partir del sinoviocito de la articulación de rodilla, y, de este modo, puede usarse para curar la artritis reumatoide. De manera adicional, la composición farmacéutica de la presente invención puede proporcionar, además, un afecto antiinflamatorio mediante la inhibición de Interleucina-1 (IL-1). En los últimos años, la artritis degenerativa ha sido reconocida como una enfermedad inflamatoria no clásica, y el progreso de la artritis degenerativa puede impedirse, además, mediante la inhibición de Interleucina-1, logrando así, el propósito de cambiar la historia natural de la enfermedad de artritis degenerativa.

De manera adicional, la composición farmacéutica de la presente invención no solo puede aliviar de manera eficaz el dolor articular y mejorar el movimiento articular del paciente, sino que también impide el progreso de la artritis. Además, a diferencia de la combinación convencional de ácido hialurónico y metotrexato, que forma un conjugado a través de un enfoque complicado usando un polipéptido para proporcionar un efecto antiinflamatorio conveniente, la composición farmacéutica de la presente invención se produce mediante la mezcla simple de ácido hialurónico y vitaminas. De este modo, la presente invención tiene las ventajas de un procedimiento de preparación simple y la adecuación para fabricación en gran escala.

Debido a que la composición farmacéutica que se divulga puede mejorar los defectos de las formulaciones convencionales de ácido hialurónico, esta puede aplicarse en cualquiera de las aplicaciones conocidas de ácido hialurónico, sin limitarse a la antiartritis. Por ejemplo, la composición farmacéutica que se divulga puede aplicarse en productos cosméticos y cirugías plásticas. Por ejemplo, puede agregarse a un producto para el cuidado de la piel o una formulación de ácido hialurónico para inyección facial.

La presente divulgación proporciona, además, un procedimiento para inhibir la inflamación, que comprende la administración a un paciente de una cantidad efectiva de (a) ácido hialurónico y (b) una vitamina. El procedimiento de la presente divulgación puede usarse, en especial, para inhibir osteoartritis, artritis reumatoide, o artritis gotosa. Los tipos, propiedades, fuentes, relación, forma de dosificación, y procedimiento de administración de ácido hialurónico y de la vitamina se describen anteriormente. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención se inyecta en una forma de formulación inyectable a una articulación del paciente para lograr el efecto de curar la artritis.

La presente invención proporciona, además, un kit para su uso en la inhibición de inflamación, que comprende una primera parte que contiene una cantidad efectiva de ácido hialurónico, y una segunda parte que contiene una cantidad efectiva de una vitamina según se define en las reivindicaciones adjuntas. Los tipos, propiedades, y relación de ácido hialurónico y la vitamina se describen anteriormente.

En el kit de la presente invención, no existe un límite en particular con respecto a la forma de la primera parte y de la segunda parte. Por ejemplo, en el kit para inyección intraarticular, las partes primera y segunda pueden encontrarse en la forma de solución y se colocan por separado en paquetes antisépticos independientes (tal como botellas de plástico o botellas de vidrio como ampollas). Cada paquete puede comprender múltiples dosis, pero preferiblemente, una dosis única, de las partes primera y segunda. En la presente, las partes primera y segunda se encuentran preferiblemente en forma de solución adecuada para inyección, y el kit de la presente invención puede comprender, además, una jeringa de inyección (tal como una jeringa de inyección desechable), o puede comprender además, de manera opcional, una instrucción. Cuando se realiza una inyección intraarticular, las dos partes pueden colocarse dentro de la jeringa de inyección de acuerdo con la información en la instrucción (que comprende la información tal como el procedimiento de operación del kit, la relación de mezclas de las soluciones, etc.) para aplicar la formulación.

En otro aspecto, en el kit para administración oral, las partes primera y segunda pueden encontrarse de manera independiente en la forma de una tableta o una cápsula, y las dos partes pueden colocarse por separado en diferentes paquetes con una dosis única o múltiple. En la presente, el kit de la presente invención puede comprender, de manera opcional, una instrucción. Cuando se lleva a cabo una administración oral, las dos partes pueden combinarse y administrarse de acuerdo con la información de la instrucción (que comprende información tal como el régimen de administración, la dosis recomendada, etc.).

La tecnología detallada y realizaciones preferidas que se implementan para la presente invención se describen en los párrafos siguientes; sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a ello.

**[Ejemplo de preparación] Preparación de inyección intraarticular de ácido hialurónico**

En una jeringa de inyección previamente cargada con ácido hialurónico, se agregaron 1 ml de solución isotónica de ácido hialurónico (con una concentración de 0,5 a 2 mg/ml, y un peso molecular promedio de 600 a 800 KDa) y 0,01 mg a 1 mg de vitamina C o vitamina E, o $10^{-4}$ a $10^{-5}$ mg de vitamina D. Una cantidad total de 5 mg a 20 mg de cloruro de sodio, sulfato de hidrógeno de sodio, y dihidrosulfato de sodio se agregaron a la jeringa. Finalmente, 2 ml de agua para inyección se agregó como un excipiente para obtener una solución para inyección intraarticular de ácido hialurónico. La solución se almacenó en la oscuridad a 4 ºC.

**[Ejemplo 1] Análisis celular de la solución para inyección intraarticular de ácido hialurónico**

**Experimento A. Cultivo celular**

Los sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS) de cinco pacientes con artritis degenerativa se recolectaron y cultivaron. En primer lugar, la articulación sinovial de los pacientes se cortó en pequeñas piezas, que se suspendieron en un medio de cultivo DMEM (medio de cultivo eagle modificado de Dulbecco), y se incubaron en un medio ambiente de 37 ºC y 5 % de $CO_2$ durante 3 días. El medio de cultivo contiene 1,5 g/l de bicarbonato de sodio (S6297, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1 % de penicilina-estreptomicina-neomicina (P408, Sigma-Aldrich), y 10 % de suero fetal bovino (04-001-1A, Biological Industries, Grand Island, NY, USA).

Las células no adheridas se retiraron mediante una solución salina regulada por fosfato (PBS), el medio de cultivo se refrescó, y las células adheridas se cultivaron durante 2 semanas. Después de que las etapas anteriores se repitieron de 3 a 6 veces, las células remanentes fueron sinoviocitos similares a fibroblastos. Las células que se obtuvieron se usaron luego para la prueba siguiente.

**Experimento B. Tratamiento celular**

Los sinoviocitos similares a fibroblastos que se obtuvieron a partir del Experimento A se cultivaron en un medio de cultivo libre de suero durante 24 horas. Luego, los sinoviocitos similares a fibroblastos se cultivaron por separado en los siguientes cuatro medios de cultivo durante 24 horas: (1) un medio de cultivo DMEM que comprende solo el 10 % de suero fetal bovino (como un grupo de control); (2) un medio de cultivo DMEM que comprende 10 % de suero fetal bovino y ácido hialurónico (que tiene un peso molecular promedio de 600 KDa a 800 KDa); (3) un medio de cultivo DMEM que comprende 10 % de suero fetal bovino y vitamina C, vitamina D, o vitamina E; y (4) un medio de cultivo DMEM que comprende 10 % de suero fetal bovino, ácido hialurónico (que tiene un peso molecular promedio de 600 KDa a 800 KDa), y vitamina C, vitamina D o vitamina E. Las concentraciones de ácido hialurónico y vitamina en los cuatro medios de cultivo anteriores fueron las mismas que las del Ejemplo de Preparación anterior.

A continuación, las células de los cuatro grupos que se mencionan anteriormente se recolectaron y centrifugaron, y los sobrenadantes se recolectaron para el siguiente análisis.

**Experimento C. Cuantificación de proteínas relacionadas con la artritis**

La reacción de inflamación es un procedimiento complicado, que comprende la producción de moléculas de radicales libres (tales como óxido de nitrógeno y peróxido de hidrógeno, etc.), y citosinas (tales como prostaglandina E2 (PGE2), factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), Interferón-γ (TNF-γ), Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-1β (IL-1β), etc.). Por lo tanto, a través de la cuantificación de moléculas de radicales libres o citosinas relacionadas con inflamación, se puede determinar el nivel de inflamación.

En este experimento, las concentraciones de dos citosinas que se relacionan con artritis degenerativa en los sobrenadantes que se recolectan a partir del Experimento B se determinaron mediante el uso de un kit de ensayo de unión de proteína tipo sándwich (o kits ELISA tipo sándwich, que se adquieren de la compañía eBioscience) que se basa en las curvas estándares de acuerdo con el manual del fabricante para analizar el nivel de expresión de estas citosinas y determinar el nivel de inflamación de las células. Las dos citosinas fueron factor de necrosis tumoral-α (un estándar, 88-7340, se adquiere de la compañía eBioscience) e Interleucina-1β (un estándar, 88-7010, se adquiere de la compañía eBioscience). Cada muestra se analizó dos veces, y un lector (Sunrise Remote, TECAN) de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se usó para llevar a cabo la medición. Los resultados se muestran en las Tablas 1 a 3 y las Figuras 1 a 6.

Tabla 1

| grupo / concentración promedio (pg/ml) | control | ácido hialurónico | vitamina C | ácido hialurónico + vitamina C |
|---|---|---|---|---|
| TNF-α | 95,57 | 75,64 | 75,56 | 56,02 |
| IL-1β | 91,98 | 78,79 | 77,00 | 54,38 |

Tabla 2

| grupo / concentración promedio (pg/ml) | control | ácido hialurónico | vitamina D | ácido hialurónico + vitamina D |
|---|---|---|---|---|
| TNF-α | 106,78 | 82,52 | 79,52 | 48,28 |
| IL-1β | 97,47 | 76,03 | 74,78 | 48,05 |

Tabla 3

| grupo / concentración promedio (pg/ml) | control | ácido hialurónico | vitamina E | ácido hialurónico + vitamina E |
|---|---|---|---|---|
| TNF-α | 98,09 | 79,28 | 77,03 | 48,28 |
| IL-1β | 97,37 | 78,33 | 75,57 | 48,31 |

**[Resultados del análisis]**

Los resultados en las Tablas 1 a 3 y Figuras 1 a 6 muestran que las células de articulaciones de pacientes con artritis degenerativa secretaron una gran cantidad de los mediadores de inflamación, TNF-α e IL-1β, indicando que

había ocurrido inflamación severa. Sin embargo, una combinación de ácido hialurónico y vitamina puede inhibir de manera eficaz la expresión de los mediadores de inflamación. Según se muestra en las Figuras 1, 3 y 5, la combinación de ácido hialurónico y vitaminas en la composición farmacéutica para su uso en la inhibición de inflamación de la presente invención puede inhibir de manera eficaz la expresión de TNF-α (un importante factor patogénico de artritis reumatoide), y puede proporcionar, de este modo, un excelente efecto inhibidor de la artritis, en especial, la artritis reumatoide. De manera adicional, según se muestra en las Figuras 2, 4, y 6, al inhibir la expresión de IL-1β, la combinación de ácido hialurónico y vitamina en la composición farmacéutica para su uso en la inhibición de inflamación de la presente invención puede proporcionar, además, un efecto de inhibición en la inflamación, en especial en la artritis degenerativa. Los datos de análisis anteriores indican además que la composición farmacéutica para su uso en la inhibición de inflamación de la presente invención puede proporcionar un efecto mejorado con respecto a la antiinflamación.

La divulgación anterior se refiere a los contenidos técnicos detallados y las características inventivas de estos. Las personas capacitadas en este campo pueden proceder con una variedad de modificaciones y reemplazos en base a las divulgaciones y sugerencias de la invención según se describe sin abandonar las características de esta. Sin embargo, a pesar de que tales modificaciones y reemplazos no se divulgan por completo en las descripciones anteriores, estos se han cubierto sustancialmente en las siguientes reivindicaciones según se adjuntan.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de inflamación que comprende:

(a) ácido hialurónico;

(b) una vitamina; y

(c) un vehículo farmacéuticamente aceptable;

en la que el componente (b) es

(i) vitamina D, o

(ii) al menos, una de vitamina C y vitamina E,

en la que cuando el componente (b) es vitamina D, el componente (a) y el componente (b) están presentes en una relación en peso de componente (a)/componente (b) = aproximadamente de 1.000/1 a aproximadamente de 100.000/1, y cuando el componente (b) es, al menos, una de vitamina C y vitamina E, el componente (a) y el componente (b) están presentes en una relación en peso de componente (a)/componente (b) = aproximadamente de 1/1 a aproximadamente de 10/1.

2. La composición farmacéutica para su uso según la Reivindicación 1, en la que el componente (a) tiene un peso molecular promedio que varía de entre aproximadamente de 30.000 Daltons a aproximadamente de 10.000.000 Daltons.

3. La composición farmacéutica para su uso según la Reivindicaciones 1 o 2, en la que el componente (a) tiene un peso molecular promedio que varía de aproximadamente de 500.000 Daltons a aproximadamente de 6.000.000 Daltons.

4. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, que se administra mediante administración oral, inyección subcutánea, inyección intravenosa, o inyección intraarticular.

5. La composición farmacéutica según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición inhibe la artritis.

6. La composición farmacéutica según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición inhibe la osteoartritis, artritis reumatoide, o artritis gotosa.

7. La composición farmacéutica según una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6 en la que la composición inhibe la artritis reumatoide.

8. Un kit para su uso en la inhibición de inflamación que comprende:

una primera parte que contiene una cantidad efectiva de un componente (a); y

una segunda parte que contiene una cantidad efectiva de un componente (b);

en el que el componente (a) y el componente (b) son como se definen en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.

9. El kit según la Reivindicación 8 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la primera parte y la segunda parte se encuentran en una forma de solución adecuada para inyección, y el kit comprende, además, una jeringa de inyección.

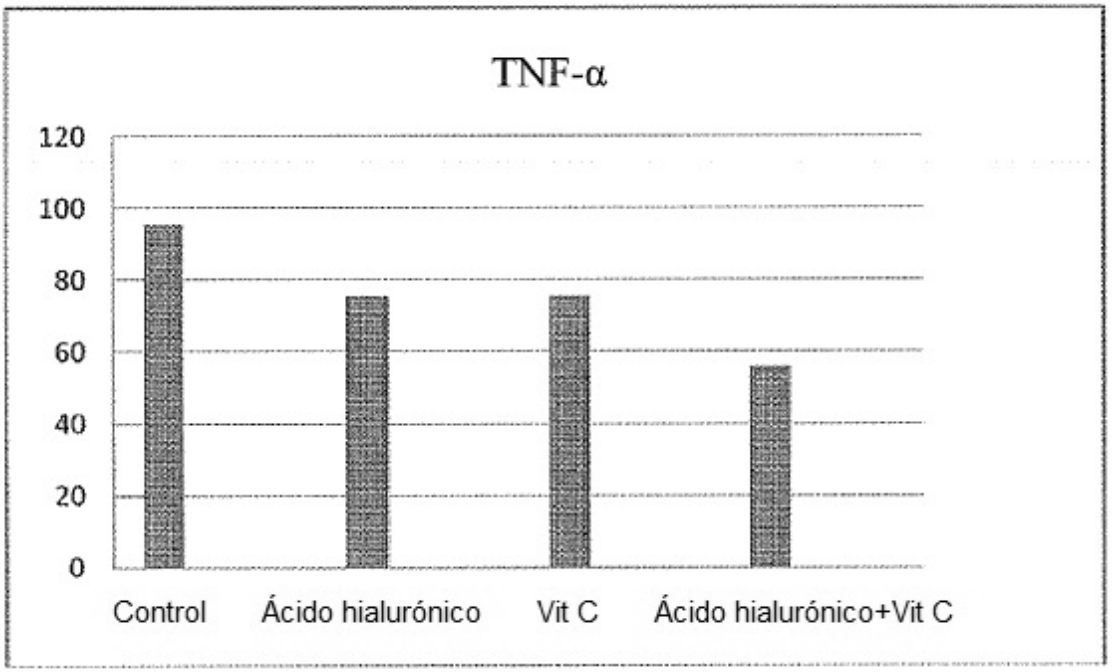

TNF-α
120
100
80
60
40
20
0
Control
Ácido hialurónico
Vit C
Ácido hialurónico+Vit C

FIG. 1

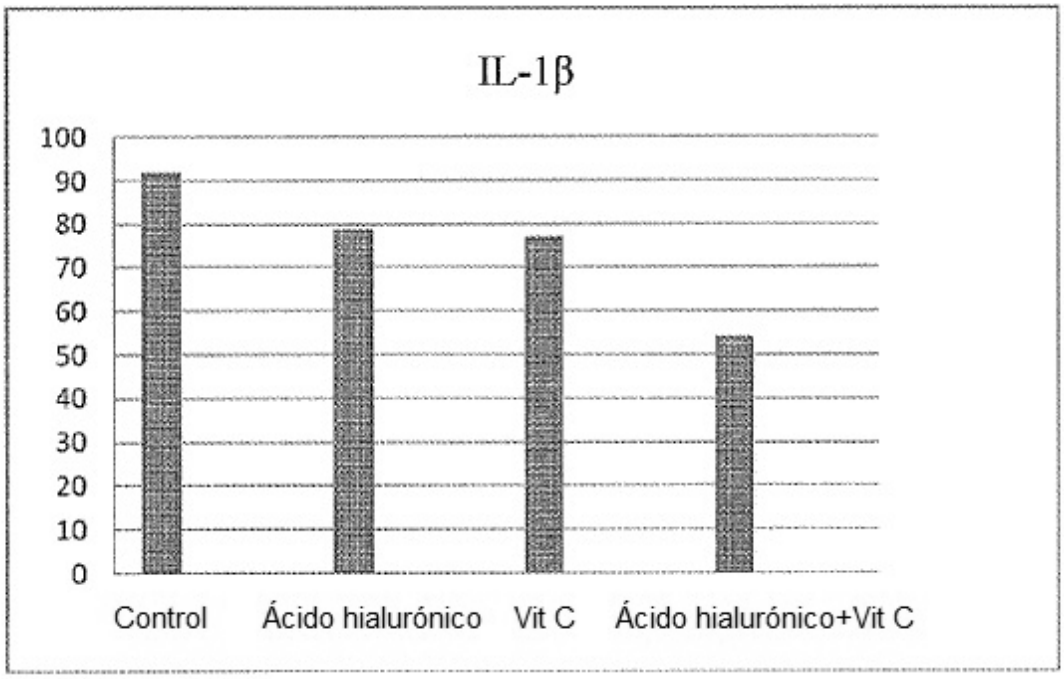

IL-1β
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
Ácido hialurónico
Vit C
Ácido hialurónico+Vit C

FIG. 2

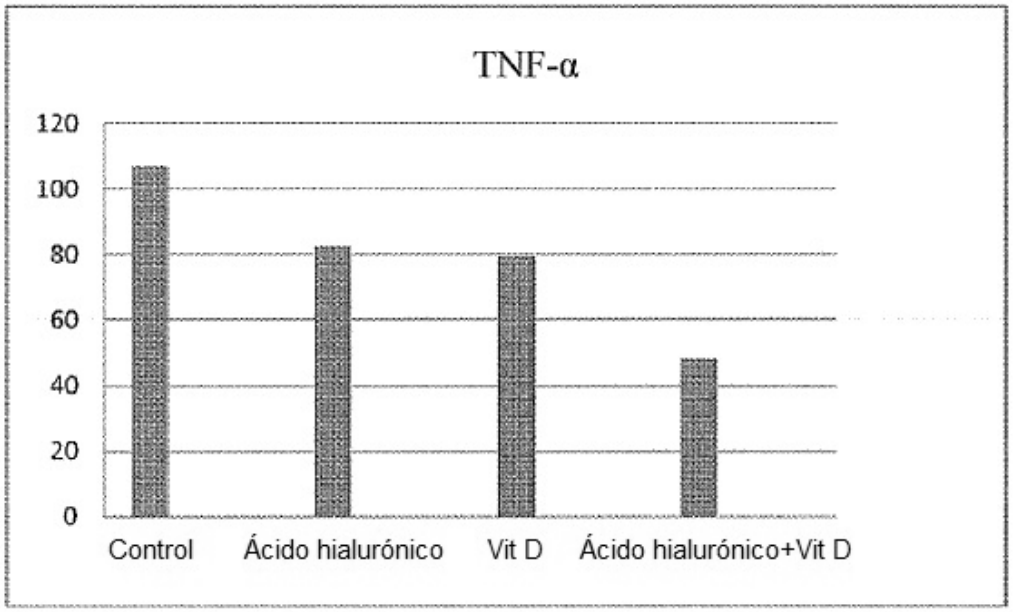

TNF-α
120
100
80
60
40
20
0
Control
Ácido hialurónico
Vit D
Ácido hialurónico+Vit D

FIG. 3

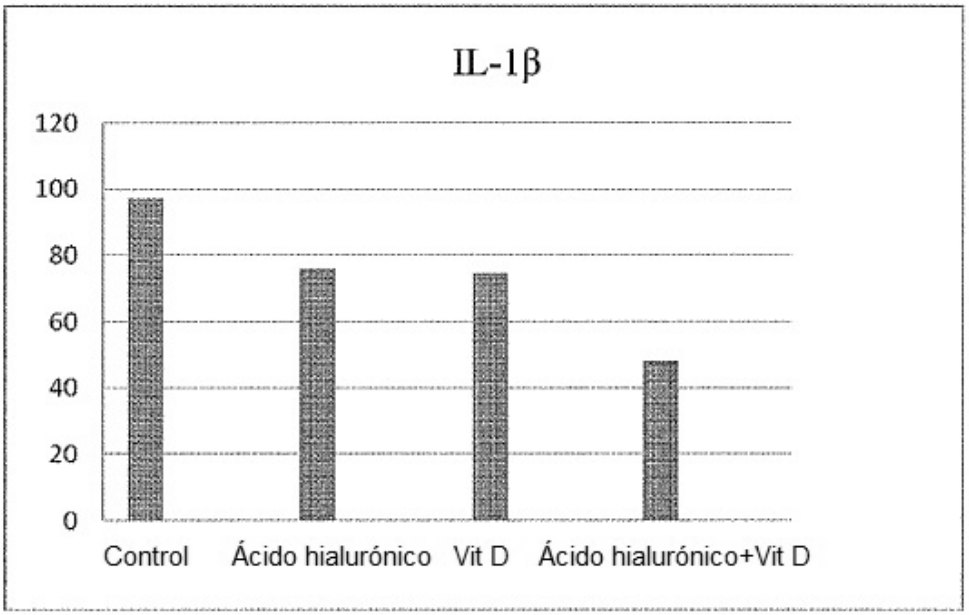

IL-1β
120
100
80
60
40
20
0
Control
Ácido hialurónico
Vit D
Ácido hialurónico+Vit D

FIG. 4

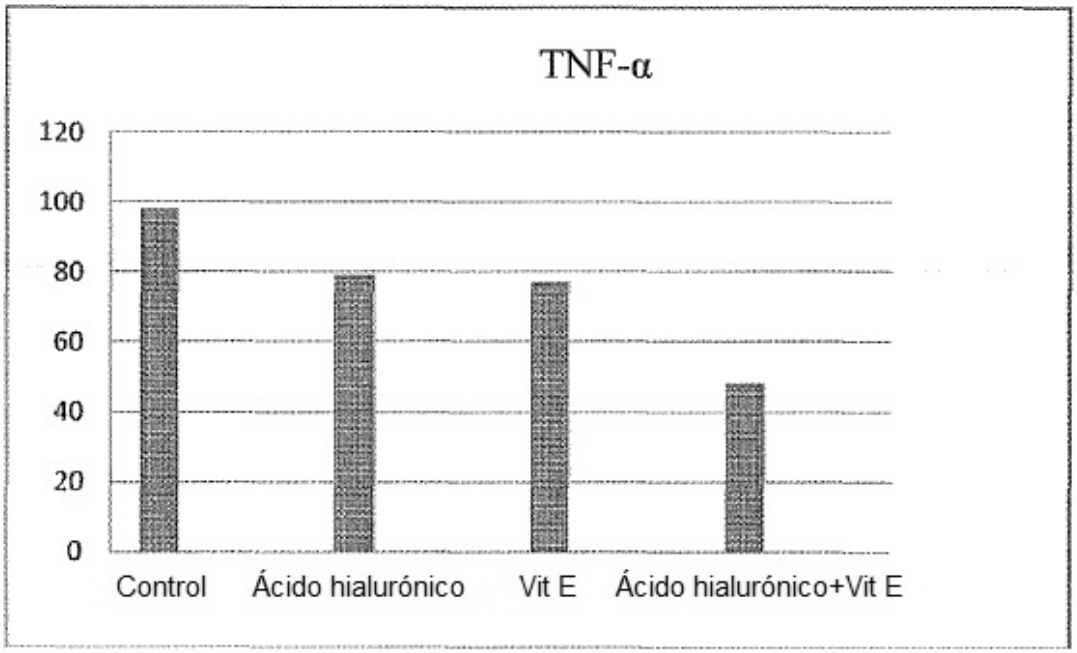

TNF-α
120
100
80
60
40
20
0
Control
Ácido hialurónico
Vit E
Ácido hialurónico+Vit E

FIG. 5

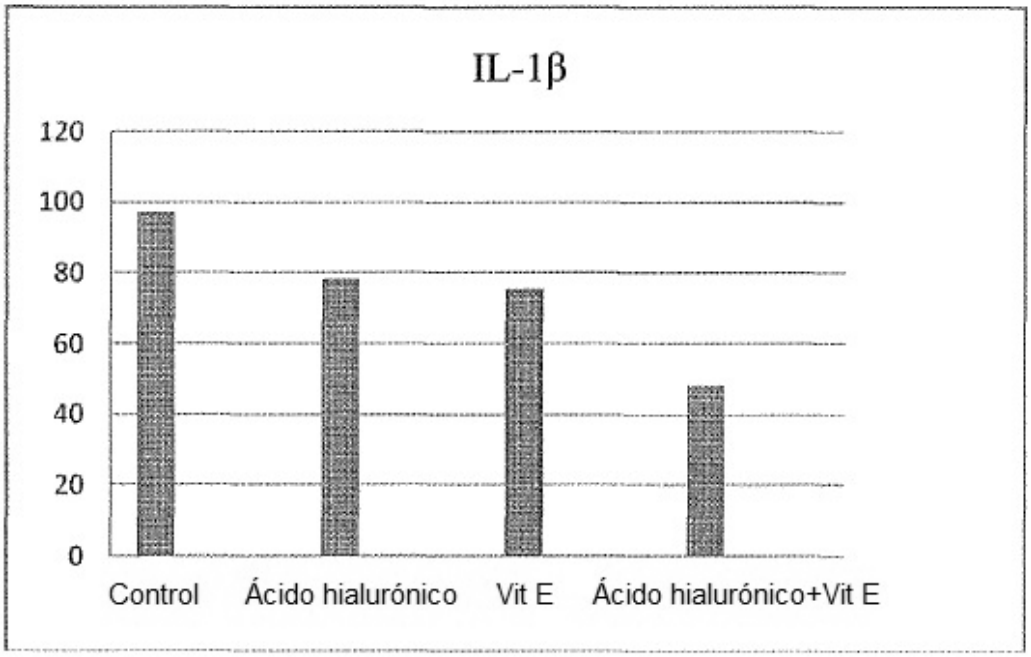

IL-1β
120
100
80
60
40
20
0
Control
Ácido hialurónico
Vit E
Ácido hialurónico+Vit E

FIG. 6