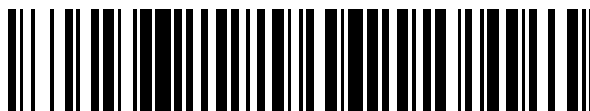


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 436**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010** **E 16178622 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 3103459**

54 Título: **Ácidos hialurónicos sulfatados como agentes antivirales**

30 Prioridad:

14.05.2009 IT PD20090135

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

12.08.2019

73 Titular/es:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)

Via Ponte della Fabbrica 3/A

35031 Abano Terme (PD), IT

72 Inventor/es:

GALESSO, DEVIS y

ZANELATO, ANNA MARIA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 722 436 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 antivirales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a ácido hialurónico sulfatado para uso en la prevención y/o tratamiento de herpes simplex labial HSV-1, herpes simplex genitalis HSV-2, virus VSV de estomatitis vesicular o citomegalovirus CMV, como se define en las reivindicaciones.

10 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.

15 Además, el documento WO95/25751 divulga que el HA sulfatado con un grado de sulfatación entre 0.5 y 3 tiene actividad antitrombótica y aumenta el crecimiento de las células de la vena umbilical (HUVEC). El documento WO98/45335 enseña a un HA N-sulfatado que tiene un grado de sulfatación por unidad dimérica de grupos amino de 1-70, que tiene actividad antitrombótica y se usa en la curación de heridas, o para el tratamiento del VIH, infección por herpes o reestenosis. El documento DE 102005004643 divulga ácido hialurónico sulfatado
20 carboximetilado con un grado de sulfatación entre 0.5 y 4 y un MW del HA inicial igual a 1000000 Da, para uso en el tratamiento o la prevención de la infección viral por herpes simplex solo o en combinación con un agente antiviral natural.

El documento EP0240098 divulga sulfato de ácido hialurónico con un contenido de azufre entre el 5 y el 22% para uso en el tratamiento o prevención del SIDA y el VIH.

25 La presente divulgación 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), pero, sobre todo, el solicitante ha encontrado sorprendentemente una actividad inesperadamente alta frente a diferentes tipos y cepas del virus del herpes, el VIH, el citomegalovirus y
30 el virus de la estomatitis vesicular.

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.

35 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.

40 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
45 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
50 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
55 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 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.

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.

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, vitiligo y eczema;
- estimula el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal que aumenta la liberación de algunos tipos de hormonas;
- 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;
- 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;
- 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.

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.

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 cartílago), en la producción de prostaglandinas y en la activación osteoclastica 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 cuali/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 divulga 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 (Alaeddine 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.

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier asunto objeto que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

Descripción detallada de la invención

Es objeto de la invención ácido hialurónico sulfatado para uso de acuerdo con las reivindicaciones.

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 150,000 a 250,000 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 de acuerdo con la invención y que es utilizado en todas las experimentaciones realizadas 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.

El solicitante ha demostrado, en las experimentaciones descritas a continuación, la poderosa acción antiviral de HAS contra diferentes tipos de virus:

Los datos experimentales confirman la acción antiviral de HAS1 y HAS3 frente al virus Herpes Simplex 1 y 2 y frente al virus de la estomatitis vesicular (VSV). La primera forma, extremadamente extendida, es responsable de la aparición de vesículas febriles características que normalmente afectan al cutis facial (labios, fosas nasales); También se le llama herpes simplex labialis. La infección causada por el herpes labial puede reaparecer fácilmente a medida que el virus sobrevive dentro de las células y ni siquiera se elimina con el uso de fármacos efectivos. La segunda forma es una infección genital, también conocida como herpes genitalis. Ambos son atrapados por el contacto físico y sexual. Debido a la ubicación de los viriones en los ganglios nerviosos, donde pueden permanecer inactivos durante un largo período de tiempo, la infección herpética tiene características recurrentes en correspondencia con los eventos de estrés del sistema inmunitario y, por lo general, reaparece en el sitio primario. El virus de la estomatitis vesicular es un virus de ARN, afecta a los mamíferos (principalmente animales) y se utiliza en el laboratorio para estudiar el desarrollo del ciclo de vida del virus de ARN. Una comparación entre HA-NS1 y HAS1 muestra que no todos los ácidos hialurónicos sulfatados son equivalentes, ya que HA-NS1 ha demostrado no estar activo en absoluto, mientras que tanto el HAS 1 como el 3 muestran una actividad antiviral muy fuerte en comparación con el Herpes Simplex y también contra VSV. Ninguna de las muestras probadas demostró ser citotóxica hacia la célula huésped, la concentración citotóxica mínima obtenida, de hecho, es igual a la de los

fármacos de referencia normalmente utilizados en la práctica clínica para el tratamiento del Herpes, y en promedio ha demostrado ser 100 veces superior a la revelada activa en la inhibición de la replicación viral.

Los datos experimentales obtenidos tanto para HAS1 como para HAS3 han revelado un resultado antiviral claro y significativo frente a Citomegalovirus: este es un tipo particular de virus que ingresa a algunos tipos de células de nuestro organismo en el que se reproduce parasíticamente y causa su muerte. Pertenece a la misma familia que el herpes labialis y el herpes genitalis, la varicela y la mononucleosis infecciosa. Las células epiteliales, las membranas mucosas, los linfonodos son el sitio de la infección primaria múltiple. Permanece en forma latente de por vida en la sangre periférica, en el epitelio de los túbulos renales y en el epitelio de las glándulas salivales. Las formas graves se encuentran en sujetos inmunocomprometidos (tal como los afectados por el SIDA y los sujetos de trasplante en terapia inmunosupresora) que involucran diversos órganos: neumonía, hepatitis, colitis, esofagitis, nefritis. El tratamiento terapéutico consiste en la administración de fármacos tales como ganciclovir, valganciclovir y foscarnet (inhibidores de la síntesis de ADN viral). También en este caso, HA-NS1 ha demostrado ser no activo en la inhibición de la proliferación del virus que confirma la diversidad absoluta, como capacidad antiviral, entre los dos tipos de productos sulfatados.

Por lo tanto, el Solicitante describe y reivindica HAS para uso en:

la prevención y/o tratamiento de herpes simplex labialis y herpes genitalis;

la prevención y/o tratamiento del virus de la estomatitis vesicular;

la prevención y/o tratamiento del Citomegalovirus.

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.

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.

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.

Algunos ejemplos de la preparación de HAS grado 1 y 3, las formulaciones farmacéuticas que lo contienen, se proporcionan para fines meramente descriptivos, 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)

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

Método A

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 (trío xido 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%).

5 Método B

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 PySO₃ 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±1°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%).

15 Ejemplo 3

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 PySO₃ 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 (referencia)

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 PySO₃ 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 PySO₃ 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

Evaluación de la acción antiviral de HAS grado 1 y grado 3 Vs HA-NS:

50 virus-1 de Herpes Simplex, virus-2 de Herpes Simplex, virus de la estomatitis vesicular

La actividad de las muestras probadas se determinó evaluando la inhibición de la citopatogenicidad causada por el virus Herpes Simplex Virus-1, (HSV-1: KOS, F y cepa de McIntyre) y por el virus Herpes Simplex Virus-2, (HSV-2:G, 196 y cepa de Lyons) en células de fibroblastos E₆SM que se derivan de tejido cutáneo muscular/embrionario.

Adicionalmente, la actividad antiviral se probó de nuevo frente a las células E₆SM infectadas por el virus de la estomatitis vesicular (virus de la estomatitis vesicular: VSV). HSV-1 es el virus que infecta preferencialmente la mucosa oral, mientras que HSV-2 ataca la mucosa genital. El procedimiento experimental se efectuó como se describe en Baba M. et al., *ANTIMICROB. AGENTES CHEMOTHER.*, 1988, 32: 1742-1745.

- 5 En resumen, los cultivos celulares confluentes se expusieron a dosis infecciosas de los virus listados anteriormente en presencia de las muestras HS-NS1 (EP0971961), HAS1 y HAS3 preparadas como se describe en los Ejemplos 1 y 2 (todas las muestras con un promedio de MW: 200 KD). Después de un período de incubación de 1 hora a 37 °C, el medio de cultivo se sustituyó con medio fresco que solo contenía las muestras a analizar. La citopatogenicidad del virus se probó el segundo día de incubación. La medición de la inhibición de la citopatogenicidad viral se evaluó mediante la determinación de la inhibición de la síntesis de ADN y ARN en las células "infectadas" y se sometió a un tratamiento como se indicó anteriormente: las células se sembraron en micropozos en un medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de las muestras a probar con 2.5 µCi de 3H-timidina y 3H-uridina por ml. Después de 16 h a 37 °C, las células se trataron con ácido tricloroacético, se lavaron en etanol, se dejaron secar y se contaron en 7.5 ml de líquido por centelleo. La actividad antiviral de las muestras probadas se expresa como la concentración mínima requerida para inhibir la citopatogenicidad del virus en un 50%: IC₅₀. Adicionalmente, con el fin de evaluar también la citotoxicidad de las muestras probadas, se determinaron las concentraciones mínimas necesarias para causar daño morfológico (observable con un microscopio óptico) a las células utilizadas. La comparación se realizó frente a dextrano-sulfato y al fármaco Aciclovir (ambas moléculas con una efectividad antiviral conocida, por lo tanto, se utilizan como control positivo).

- 20 Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 1:

Los datos experimentales confirman lo que se vio para el VIH, es decir, la potente acción antiviral tanto de HAS1 como de HAS3: una comparación entre HA-NS1 y HAS1 muestra que no todos los ácidos hialurónicos sulfatados son equivalentes, ya que HA-NS1 no demostró estar activo, y esta diferencia en la eficacia no depende del peso molecular o del grado de sulfatación del ácido hialurónico, por lo tanto, se encuentra en la estructura misma de HA-NS1 frente a HAS1, es decir, en la sulfatación. De hecho, el HAS muestra una eficacia igual a la del dextrano-sulfato y comparable a la del aciclovir, un fármaco de referencia para el tratamiento del Herpes Simplex. Adicionalmente, debe señalarse que el aciclovir está inactivo frente a VSV, mientras que HAS grados 1 y 3 tienen una actividad antiviral muy poderosa frente a VSV.

- 30 Todas las muestras probadas no son citotóxicas para la célula huésped, la concentración citotóxica mínima obtenida es, de hecho, igual a la de los fármacos de referencia que se usan normalmente en la práctica clínica para el tratamiento del Herpes, y demostró estar en un promedio de 100 veces más alto que el que se mostró activo en la inhibición de la replicación viral.

Citomegalovirus

- 35 La actividad de las muestras analizadas se determinó evaluando la inhibición de la citopatogenicidad determinada por el citomegalovirus (CMV: AD-169 y la cepa Davis) utilizando el protocolo anterior. La actividad antiviral se probó frente a las células HEL (células embrionarias pulmonares) y se expresó como la concentración requerida para inhibir el número de placas formadas por el virus anterior en un 50%. Los resultados obtenidos se expresan en la figura 2:

- 40 la tabla indica el resultado positivo claro y significativo obtenido tanto para HAS1 como para HAS3, lo que nuevamente los confirma como agentes antivirales efectivos. También en este caso, HA-NS1 no demostró ser activo inhibiendo la proliferación del virus, lo que confirma la diversidad absoluta entre los dos tipos de producto sulfatado de grado 1 al tener una capacidad antiviral.

Ejemplo 7

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

- 40 mg 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 8

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

- 55 100 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 9 (referencia)

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

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 10

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

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.

Ejemplo 11

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

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, Symdiol 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 anteriormente obtenida, para obtener la gelificación de la fase acuosa.

Ejemplo 12

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

30 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.

35 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.

40 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°C hasta que se obtienen barras sólidas.

Ejemplo 13

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

45 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°C hasta que se obtienen óvulos sólidos.

Ejemplo 14

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

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.

- 5 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 15

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

- 10 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 16

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

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

Ejemplo 17

Preparación de una formulación en forma de comprimidos que contienen HAS

- 20 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.

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

Ejemplo 18

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

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.

- 30 Tabla

Gel hidrófilo (Ejemplo 10)	
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 11)

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 12)	
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 13)	
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 14)	
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 15)	
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 16)	
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 17)	
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 18)	
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 uso en la prevención y/o tratamiento del herpes simple labialis HSV-1, herpes simplex genitalis HSV-2, virus VSV de la estomatitis vesicular, citomegalovirus del CMV, en donde dicho ácido hialurónico sulfatado (HA) tiene un grado de sulfatación, destinado como el número de grupos sulfato por unidad de disacárido, igual a 1 o 3, estando dicho ácido hialurónico sulfatado (HA) preparado a partir de un HA que tiene un peso molecular que varía de 150,000 a 250,000 Da, involucrando la sulfatación solamente a los hidroxilos de alcohol presentes en la cadena de polisacárido (HA).
2. Ácido hialurónico sulfatado para uso de acuerdo con la reivindicación anterior para administración sistémica.
3. Ácido hialurónico sulfatado para uso de acuerdo con la reivindicaciones 1-2 para administración por inhalación o tópica.

Fig. 1

Producto probado	Concentración citotóxica mínima (µg/ml)	Concentración inhibitoria mínima IC 50 (µg/ml)						
		Herpes simplex virus-1 (KOS)	Herpes simplex virus-1 (F)	Herpes simplex virus-1 (Melktyre)	Herpes simplex virus-2 (O)	Herpes simplex virus-2 (196)	Herpes simplex virus-2 (Lyons)	Vesicular stomatitis virus
HA-NB1	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
HA81	>400	48	16	9,6	9,6	3,2	3,2	1,92
HA83	>400	16	3,2	1,92	1,92	1,92	1,92	0,128
DS	>400	9,6	9,6	9,6	3,2	3,2	1,92	16
Acyclovir	>400	0,384	0,384	0,64	0,384	0,384	0,384	>80

Fig. 2

Producto probado	Concentración inhibitoria mínima IC 50 (µg/ml)	
	Cepa AD-169 de citomegalovirus	Cepa Davis de citomegalovirus
HA-NB1	>80	>80
HA81	8	3,4
HA83	0,2	0,2
DS	2,7	0,8