

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 575**

51 Int. Cl.:

A61K 31/136	(2006.01) A61P 17/06	(2006.01)
A61K 31/737	(2006.01) A61P 31/22	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01) A61P 31/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 38/47	(2006.01)	
A61Q 19/00	(2006.01)	
A61Q 1/06	(2006.01)	
A61P 11/06	(2006.01)	
A61P 17/00	(2006.01)	
A61P 17/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010 E 18185228 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3417855**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para uso tópico basadas en ácido hialurónico sulfatado como promotor de absorción de la piel**

30 Prioridad:
14.05.2009 IT PD20090134

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2021

73 Titular/es:
**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:
**D'ESTE, MATTEO y
GENNARI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 808 575 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

Composiciones farmacéuticas para uso tópico basadas en ácido hialurónico sulfatado como promotor de absorción de la piel

Campo de la invención

5 La invención se refiere a una composición farmacéutica para uso tópico que contiene ácido hialurónico sulfatado como promotor de absorción de la piel de diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos, en donde dicho ácido hialurónico sulfatado tiene un grado de sulfatación igual a 3, previsto como el número de grupos sulfato por unidad de disacárido, la sulfatación que involucra los hidroxilos de alcohol presentes en la cadena de polisacárido (HA) y en donde dicho ácido hialurónico sulfatado se prepara a partir de un ácido hialurónico (HA) que tiene un peso molecular
10 que varía de 150,000 a 250,000 Da y en donde dicho ácido hialurónico sulfatado es formulado con diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos.

Desde hace muchos años, la literatura científica/patente ha estado estudiando y describiendo el ácido hialurónico sulfatado que se obtiene a partir de ácido hialurónico (HA) adecuadamente sulfatado de conformidad con lo que se describe en el estado de la técnica (EP0940410B1 y EP0702699B1), al que se atribuyen efectos anticoagulantes. HAS
15 además puede obtenerse mediante la deacetilación y 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 además son conocidas, en las que el uso de HAS se describe en patologías tales como, por ejemplo, ARDS (insuficiencia respiratoria aguda), reumatismo articular y artritis reumatoide.

Además, el documento WO95/25751 divulga el HA sulfatado con un grado de sulfatación entre 0,5 y 3,5 que tiene actividad antitrombótica y anticoagulante, mientras que el documento US5639738 divulga una composición tópica que contiene NSAID, en particular diclofenaco y ácido hialurónico, en DONDE el ácido hialurónico mejora el transporte del NSAID a la piel.
20

Desde 1970, los científicos han entendido que las poblaciones de células linfoides seleccionadas pueden producir y liberar en el lecho circulatorio, moléculas de naturaleza proteica no asimilables a los anticuerpos, que se definen con el término "*citoquinas*". Ellas representan un nuevo tipo de "hormona", capaz de actuar sobre diferentes objetivos
25 celulares en numerosas regiones del cuerpo.

La progresión de conocimientos científicos relacionados con la síntesis y funciones biológicas/bioquímicas de estas proteínas, ha alterado la "vieja" visión 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
30 diferentes patologías, tópicos y/o sistémicas, que comprende además nuevas posibilidades terapéuticas relacionadas con la inmunoterapia del cáncer.

La célula central del I.S., es el linfocito, que representa aproximadamente el 20 % de todos los glóbulos blancos y, sobre la base de sus diferentes funciones, forma 3 grupos: linfocito B, linfocito T y linfocito asesino. Muchas citoquinas son proteínas solubles producidas por los linfocitos y/o monocitos, capaces de actuar contra otras células/tejidos
35 situados además muy lejos de su lugar de producción. Tienen funciones inmunológicas, de hecho, y además funciones de regulación en la síntesis de otras citoquinas por parte de las diferentes células del I.S. o células objetivos implicadas en la cascada de reacciones iniciadas por el I.S.

Numerosas citoquinas diferentes han sido estudiadas hasta ahora, que tienen además numerosos acrónimos diferentes, pero las estudiadas, en particular por el Solicitante son: La interleuquina 1 y 2, interleuquina 6, 7 y 12, de aquí en adelante definidas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e IL-12 que, con TNF, se definen como citoquinas de naturaleza
40 inflamatoria, mientras que la interleuquina 10 (IL-10) por el contrario, es una citoquina con fuertes propiedades anti-inflamatorias.

La primera citoquina que se estudió fue sin duda la IL-1: presente en dos formas α y β , que es un potente inductor de procesos proinflamatorios (sistémico y/o cutáneo). Se produce principalmente por los linfocitos B, T y macrófagos después del estímulo bacteriano o estimulación por parte de otros agentes que incluyen otras citoquinas; además se secreta a partir de los neutrófilos periféricos, células endoteliales, epiteliales y del músculo liso, fibroblastos, células de Langerhans de la piel, osteoclastos, sinoviocitos y muchos otros tipos de células. Ambas formas se unen al mismo receptor y tienen actividades biológicas si no idénticas, muy similares. Muchas de sus funciones proinflamatorias se vinculan a la estimulación de otras citoquinas, tales como IL-6 e IL-8, y su mucha síntesis puede inducirse por
45 citoquinas tales como TNF, interferón, endotoxinas bacterianas, virus y diferentes tipos de otros antígenos. Se implica en el choque séptico pero además hay que señalar que los estudios recientes han demostrado que la IL-1 es capaz de activar la expresión de algunos oncogenes y consecuentemente participar en la patogénesis de las neoplasias. Se combina con otras citoquinas, IL-1 por tanto representa uno de los mayores mediadores de los procesos inflamatorios: estimula las células T, de hecho, para producir IL-2 y las células B para producir inmunoglobulinas.
50 Además se implica en la patogénesis de la artritis reumatoide y la artrosis: altas cantidades de IL-1 de hecho se han encontrado en el líquido sinovial de pacientes afectados por artritis reumatoide y/o osteoartritis. Además es activa en numerosas patologías de una naturaleza prevalentemente cutánea, tales como dermatitis generalmente, dermatitis atópica y psoriasis. Por último, participa en el establecimiento de daño vascular, tales como trombosis venosa y está

presente en todos los vasos con patologías del tipo arterio/arterioesclerótico. Los antagonistas de los receptores actualmente ya están en uso clínico (y además están siendo experimentados) para esta citoquina, como el bloqueo del receptor resulta ser una manera efectiva de tratar estas patologías en las que IL-1 está entre los protagonistas.

- 5 TNF: El factor de necrosis es parte del grupo de citoquinas que promueve la fase de la inflamación sistémica aguda. TNF por lo tanto, se implica en un número extremadamente 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 que incluyen mastocitos, células linfoides, células musculares y endoteliales, fibroblastos y células nerviosas. Su síntesis puede estimularse por endotoxinas bacterianas, otras citoquinas tales como IL-2, Interferón e IL-1, y puede inhibirse por esteroides.

- 10 Al actuar sobre numerosos órganos y sistemas, generalmente junto con otras citoquinas, participa en el establecimiento y la regulación de muchos procesos patogénicos:

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

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

- activa los osteoclastos y por lo tanto induce la reabsorción del hueso, (osteoporosis);

- atrae fuertemente los neutrófilos y les ayuda a adherirse a las células endoteliales para extravasarse;

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

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

25 El TNF es capaz de unirse a sí mismo a dos receptores, TNF-R1 (receptor de TNF tipo 1) y TNF-R2 (receptor de TNF tipo 2), que se expresan en todas las células somáticas que excluyen los eritrocitos. En resumen, el TNF promueve la respuesta inflamatoria tanto sistémica como cutánea, que a su vez desencadena numerosas patologías además de naturaleza autoinmune, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis y asma. La investigación científica ha intentado hasta ahora perfeccionar los fármacos "biológicos" (tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que inhiben la síntesis de TNF y/o bloquean su receptor.

IL-2: esta es una citoquina aterogénica altamente proinflamatoria, producida principalmente por los linfocitos T, cuya síntesis se inhibe por esteroides y ciclosporinas. 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.

- 30 IL-2 además puede dañar la barrera hematoencefálica y la integridad del endotelio de los vasos cerebrales, causando trastornos neuropsiquiátricos tales como la desorientación y depresión.

Existen consecuentemente numerosas patologías que se han asociado con una producción aberrante de IL-2, tales como linfoma de Hodgkin, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y Lupus eritematoso.

- 35 IL-6: producida por muchos tipos de células, sobre todo, es decir, con el TNF que es uno de los miembros más importantes del grupo de mediadores químicos de la fase aguda del proceso inflamatorio, y por lo tanto se implica en patologías con un fuerte componente inflamatorio, tal como el asma (en donde participa en la aparición y mantenimiento del proceso inflamatorio), inflamación intestinal crónica (*enfermedad de Crohn*), artritis reumatoide y artrosis. Como se afirmó anteriormente, de hecho, las citoquinas tales como TNF, IL-1 e IL-6 han demostrado estar implicadas en gran medida en el proceso de la osteoartritis articular degenerativa, ya que tienen un papel principal
- 40 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, los niveles altos de citoquinas han sido registrados en los líquidos sinoviales de pacientes que sufren de artrosis y artritis reumatoide (R.A.). Estos descubrimientos han estimulado el uso de inhibidores en las interleuquinas anteriores y/o antagonistas de los receptores como una nueva estrategia de tratamiento de la patología de la artrosis.

- 45 Por último, estudios recientes han conectado el cáncer con la longevidad, y revelado cómo algunos tumores se influncian por el tipo de situación/cuantitativa de las proteínas citoquinas del paciente: en resumen, la evidencia reciente ha ligado un perfil de producción baja de IL-10 y secreción alta 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 pueden facilitar la supervivencia (Caruso C. y otros, Ann N.Y. Acad. SCI., 2004, 1028:1-13).

- 50 IL-7: una citoquina producida principalmente por las células del estroma de la médula ósea, que además se secreta por el timo y 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, altos niveles de IL-7 de hecho, han sido encontrados en los pacientes que padecen de R.A.

IL-12: esta proteína además 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 naturaleza autoinmune, tales como la colitis, artritis, diabetes dependiente de insulina, encefalomiелitis, psoriasis y esclerosis múltiple (Brahmachari S. y otros, *Minerva Med.*, 2008, 99(2):105-118).

IL-10: producida principalmente por los linfocitos, es una citoquina de una naturaleza antiinflamatoria, capaz de inhibir la síntesis de IL-2 e Interferón producido por los linfocitos T. La acción antiinflamatoria de IL-10 además 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 la diabetes mellitus y las inflamaciones intestinales crónicas, tal como la enfermedad de Crohn. Evidencia reciente ha conducido a IL-10 que se experimenta además como un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento del Lupus eritematoso sistémico. Los niveles bajos de IL-10 se han observado en los tejidos cutáneos de los pacientes que sufren de patologías tales como el vitiligo, psoriasis, eczema y dermatitis. Se debería señalar que tanto los corticosteroides como la ciclosporina aumentan la producción y/o liberación de esta interleuquina partir de las células competentes relativas durante la terapia de inmunosupresión convencional para el tratamiento de inflamaciones y rechazo de órganos (Zhou X. y otros, *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2005, 5(465475). Los datos experimentales además han demostrado su efectividad en la reducción de la liberación de prostaglandinas y la ciclooxigenasa inducidas *in vitro* por TNF en los sinoviocitos humanos, indicando así la capacidad de IL-10 de reducir los procesos inflamatorios que implican las articulaciones afectadas por la degeneración osteoartrósica (Alaaeddine N. y otros, *Arthritis & Rheumatism*, 1999, 42:710-718). Estudios recientes han confirmado su efectividad terapéutica hacia la patología del asma en modelos animales experimentales de hiperreactividad bronquial, que muestra 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 las altas concentraciones de TNF, IL-1, IL-5, IL-6 y IL-8 se han encontrado en el líquido de lavado bronquial y/o en un nivel de suero y/o nivel de tejido (Stankiewicz W. y otros, *Mediators of Inflammation*, 2002, 11:307-312). Para esta interleuquina, por lo tanto se ha asumido el papel importante de citoquina reguladora del mantenimiento de la homeostasis inmunológica.

El asma puede ser una enfermedad extremadamente invalidante de la que 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, consecuentemente ligada a una producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias 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 todavía no se conocen por completo, no obstante, existen factores genéticos, ambientales, virales y además nutricionales que contribuyen de diferentes maneras al desarrollo de esta patología. Consecuentemente, la búsqueda de una terapia efectiva (terapia sistémica y/o local) 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 en cualquier caso permite una reducción en el uso de esteroides) como para los casos menos graves, como podría ser total la suspensión de la terapia con esteroides.

Descripción detallada de la invención

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier asunto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. El objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para uso tópico que contiene ácido hialurónico sulfatado como promotor de absorción de la piel de diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos, en donde dicho ácido hialurónico sulfatado tiene un grado de sulfatación igual a 3, destinado al número de grupos sulfato por unidad de disacárido, involucrando la sulfatación los hidroxilos de alcohol presentes en la cadena de polisacárido (HA) y en donde dicho ácido hialurónico sulfatado se prepara a partir de un ácido hialurónico (HA) que tiene un peso molecular que varía de 150.000 a 250.000 Da, y en donde dicho ácido hialurónico sulfatado se formula con diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos.

El ácido hialurónico sulfatado adecuado para los propósitos de la presente invención se prepara de conformidad con el proceso descrito en EP 702699 B1: la sulfatación se realiza por medio del complejo SO₃-piridina e implica los hidroxilos de alcohol presentes en la cadena de polisacáridos a partir de un HA que se deriva de cualquier fuente, por ejemplo, mediante la extracción a partir de crestas de gallo, ya sea fermentativamente o biotecnológicamente, 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 inalteradas, en particular, el peso molecular del HA de partida no se reduce por el proceso de sulfatación permitiendo así que se mantengan todas las características fisicoquímicas del polisacárido de partida. La sulfatación implica varios grupos hidroxilo de la unidad de disacárido y es por lo tanto posible obtener diferentes grados de sulfatación, 0,5 a 3,5 (previsto como el número de grupos sulfato por unidad de disacárido), variando la cantidad de SO₃-piridina introducido como es conocido en el estado de la técnica.

El derivado usado en todas las experimentaciones realizadas tiene un grado de sulfatación 1 o grado 3 y se define de aquí en adelante como HAS1 y HAS3. Todos los grupos carboxilo libres del HA pueden salificarse con cationes de un origen orgánico y/o inorgánico.

Ambos grados de HAS son solubles en agua y además pueden esterilizarse con las técnicas normales conocidas por los expertos en el campo, incluso si es preferentemente la esterilización usando un autoclave.

El Solicitante describe y reivindica una composición farmacéutica para uso tópico que contiene ácido hialurónico sulfatado como un promotor de absorción de la piel de diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos, en donde dicho ácido hialurónico sulfatado tiene un grado de sulfatación igual a 3, previsto como el número de grupos sulfato por unidad de disacáridos, involucrando la sulfatación los hidroxilos de alcohol presentes en la cadena de polisacárido (HA) y en donde dicho ácido hialurónico sulfatado es preparado a partir de un ácido hialurónico (HA) que tiene un peso molecular que varía de 150.000 a 250.000 Da, en donde dicho ácido hialurónico sulfatado se formula con diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos.

10 También se divulga HAS para uso tópico en:

- la prevención y/o tratamiento de patologías de la piel asociadas con la deficiencia inmune y, particularmente, la deficiencia de IL-10, tales como vitíligo, eczema, psoriasis y dermatitis generalmente, que estimula la síntesis de citoquinas antiinflamatorias.

- la prevención y/o tratamiento tópico del asma, asociado con la activación de IL-1, IL-6 y TNF por inhalación;

15

- la prevención y/o tratamiento cutáneo de enfermedades de la piel asociadas con el aumento/activación de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 y TNF tales como, por ejemplo, dermatitis, dermatitis atópica, psoriasis, vitíligo, fotodermatitis, urticaria, todas las irritaciones de la piel (además gingivales) y eczema;

- la prevención y/o tratamiento de enfermedades de naturaleza autoinmune, tales como psoriasis, asma y manifestación de la piel de Lupus eritematoso sistémico (LES) y discoide;

20

- la prevención y/o tratamiento tópico de las neoplasias de la piel tales como, por ejemplo, basalioma, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células escamosas, linfoma cutáneo, micosis fungoide y la queratosis actínica;

- la prevención y/o tratamiento tópico de patologías vasculares tales como, por ejemplo, vasculitis y esclerodermia, asociadas con la activación de TNF, IL-1 e IL-6.

El Solicitante ha demostrado además de hecho, en las experimentaciones descritas a continuación, que:

25

- HAS es capaz tanto de estimular la producción de ARNm nuevo como la síntesis de proteínas de citoquinas de naturaleza anti-inflamatoria (tales como, por ejemplo, IL-10), aumentando así la capacidad de defensa inmune de las células y, consecuentemente 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 altamente proinflamatorias implicadas en numerosas patologías de la piel.

30

- HAS es efectivo tanto al disminuir la síntesis de ARNm nuevo como en al reducir significativamente la síntesis de proteínas de IL-2, IL-7 e IL-12, en situaciones en las que no se solicita una respuesta inmune y, en particular eventos de estrés inflamatorio en el que las células responden produciendo una cascada de citoquinas: especialmente en este caso, los datos presentados revelan el mayor efecto de HAS.

35

- HAS es efectivo al inhibir 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 producto sulfatado es completamente análogo a los anticuerpos monoclonales específicos para los receptores de las proteínas proinflamatorias anteriores, por lo tanto, capaces de bloquear su función, pero al mismo tiempo no teniendo esta especificidad del anticuerpo. Este bloqueo del receptor representa la forma más efectiva de antagonizar los efectos proinflamatorios y tumorales del factor TNF, IL-1 e IL-6, abriendo nuevos horizontes para la experimentación clínica, permitiendo el perfeccionamiento de nuevos enfoques terapéuticos en el tratamiento y/o la prevención de un número extremadamente grande de patologías, teniendo en cuenta el papel que TNF, IL-1 e IL-6 juegan en la aparición y la progresión de numerosas enfermedades sistémicas y de la piel.

40

Además el Solicitante describe HAS de uso tópico en:

- la prevención y/o tratamiento de Herpes Simple labialis y Herpes genitalis;

45

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

- la prevención y/o tratamiento de Citomegalovirus.

De hecho, el solicitante ha demostrado, en las experimentaciones que se describen a continuación, la poderosa acción antiviral de HAS contra diferentes tipos de virus:

50

- Los datos experimentales demuestran la acción antiviral de HAS1 y HAS3 versus el virus Herpes Simplex 1 y 2 y versus el 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 labialis 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 contacto físico o 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 estresantes del sistema inmunitario y, usualmente reaparece en el sitio primario. El virus de la estomatitis vesicular es un virus de ARN, afecta a los mamíferos 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 una vez más que no todos los ácidos hialurónicos sulfatados son equivalentes, ya que HA-NS 1 ha demostrado no estar activo en absoluto, mientras que ambos HAS 1 y 3 muestran una actividad antiviral muy fuerte en comparación con el Herpes Simplex y también vs VSV. Ninguna de las muestras analizadas 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 en comparación con el Citomegalovirus: este es un tipo particular de virus que ingresa a algunos tipos de células de nuestro organismo en el que se reproduce de forma parasitaria 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, membranas mucosas, 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). 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.

También se divulga HAS para uso tópico como agente fibrinolítico para la degradación de coágulos de fibrina que se forman a nivel cutáneo (superficial y/o en profundidad), después de la rotura del endotelio y/o la pared de los capilares y/o los vasos pequeños, debido a traumas mecánicos y/o hemorragias de una entidad mediana/pequeña..

En las experimentaciones descritas a continuación, el Solicitante ha demostrado de hecho:

• que HAS es efectivo como Plasmina en la fibrinólisis/desbridamiento de coágulos y trombos. La Plasmina es una enzima importante que pertenece al grupo de hidrolasas capaces de degradar muchas proteínas del plasma sanguíneo, y en particular la fibrina en trombos y coágulos. La degradación de la fibrina se llama fibrinólisis. Una deficiencia de plasmina puede conducir a trombosis, ya que los trombos no se degradan adecuadamente. Debe notarse la diferencia sustancial entre el proceso anticoagulante y el proceso fibrinolítico: en el primer caso, el agente anticoagulante debe prevenir la formación de coágulo, en este último caso, el agente fibrinolítico, por otro lado, debe intervenir en una situación en la que el coágulo ya está presente, y por lo tanto debe degradarse para su eliminación total.

También se divulga el HAS para uso tópico como un promotor de la absorción de la piel de fármacos tales como, por ejemplo, los de naturaleza antiinflamatoria y, finalmente, como un agente altamente deshidratante para el tratamiento de todas las patologías de la piel caracterizadas por sequedad, liquenificación, irritación, prurito y enrojecimiento, inflamación y descamación.

El Solicitante ha demostrado de hecho que:

- la sulfatación del ácido hialurónico aumenta esencialmente la absorción de la piel, consecuentemente,
- el poder hidratante de HAS ha demostrado ser significativamente mayor que el de HA no sulfatado y por lo tanto causa una importante disminución de la rugosidad de las superficies de la piel tratada con respecto a las formulaciones de HA y de control tópico, revelando así su capacidad de tratar efectivamente y proteger las superficies de la piel caracterizadas por sequedad, irritación, liquenificación, prurito y enrojecimiento, inflamación y descamación con todas las otras patologías de la piel que hacen la piel más sensible a los agentes externos.

• HAS es un potente y eficaz promotor de la absorción de fármacos por la piel. La capacidad de HAS de penetrar el grosor de la piel así eficientemente es la base científica sobre la que se basa esta sorprendente e inesperada nueva propiedad, que permite su formulación con agentes farmacológicos de diversa naturaleza, tal como por ejemplo, antiinflamatorios no esteroideos (particularmente diclofenaco, ketoprofeno e ibuprofeno) o de tipo esteroide, hormonas, vasodilatadores, agentes colinérgicos, antibióticos y otros, formulados en varias formas, preferentemente como geles, cremas o parches para una absorción dérmica y/o transdérmica.

Por último, el solicitante describe la preparación de varias 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, esteroideos, hormonas, proteínas, factores tróficos, vitaminas, fármacos anti-inflamatorios no esteroide (FANS), tales como, por ejemplo diclofenaco, ketoprofeno o ibuprofeno o sales de estos,

fármacos de quimioterapia de uso tópico, antibióticos, agentes antivirales, anestésicos locales, anticoagulantes y/o agentes fibrinolíticos, y/o enzimas tales como, por ejemplo, colagenasa y/o hialuronidasa y/o otras proteasas; que pueden formularse con polímeros tales como ácido hialurónico y sus derivados, carboximetilcelulosa (CMC) y/u otros polímeros de característica natural (tal como colágeno) o sintética.

5 La composición farmacéutica en cuestión puede formularse como una pomada, lipogel, hidrogel, lápiz labial, crema, óvulos vaginales y sondas, espuma, gel de la mucosa, preparaciones oftálmicas, duchas vaginales, enjuagues bucales, parches para la dermis y/o absorción transdérmica, especialmente de FANS y hormonas, soluciones, por lo tanto, puede administrarse mediante la aplicación tópica o mediante inhalación para el tratamiento de patologías del sistema respiratorio tal como por ejemplo, asma.

10 Particular atención se presta a las composiciones que contienen enzimas tales como hialuronidasa en la formulación de un medicamento para el tratamiento de hematomas de la piel, y las que contienen fármacos u hormonas no esteroides anti-inflamatorios, en forma de geles, cremas y parches para la absorción dérmica y/o transdérmica del fármaco.

15 Algunos ejemplos de la preparación de HAS grado 1 y 3, las formulaciones farmacéuticas que lo contienen, se proporcionan para propósitos 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 promedio igual a 200 KD (en el intervalo de 150.000 a 250.000 Da)

20 5,00 g de sal de sodio de ácido hialurónico de origen fermentativo (200 KD) se disuelven en 250 ml de agua y la solución resultante se percola a través de una columna de vidrio prellenada con 100 cm³ de resina Dowex en forma de tetrabutilamonio (TBA). La solución eluida de sal HA-TBA se recoge y liofiliza. Se obtienen 7,50 g de producto.

Ejemplo 2

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

25 Método A

30 10,0 g de la sal TBA de ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 200 KD preparado de conformidad con el Ejemplo 1, se disuelven en 300 ml de dimetilsulfóxido (DMSO); 26,0 g del complejo SO₃-piridina (trióxido de azufre y piridina, de aquí en adelante abreviado como PySO₃) se dispersan en 150 ml de DMSO, y después se añadió a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21 °C, la reacción se interrumpe mediante la adición de 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 dializa exhaustivamente frente a agua a través de una membrana con un corte de 12-14.000 Da. El producto dializado se somete a liofilización. 9,7 g de producto se obtienen con un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 88 %).

35 Método B

40 32,0 g de la sal TBA de ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 200 KD preparado de conformidad 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 después se añade a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21 ± 1 °C, la reacción se interrumpe mediante la adición de 0,5 volúmenes de agua. El pH inicialmente menor que 2,5, se lleva a neutralidad mediante la adición de un mol de NaOH (en solución). El producto 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 vuelve a disolver y se dializa frente a agua exhaustivamente usando una membrana con un corte de 12-14.000 Da. 30,4 g de producto se obtienen con un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 86 %).

45 Ejemplo 3 (no de conformidad con la invención)

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

50 Usando 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. 10,0 g del complejo PySO₃ se dispersan en 100 ml de DMSO, y después se añaden a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21 °C, la reacción se interrumpe mediante la adición de 0,1 volúmenes de agua; el producto de reacción 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 la neutralidad con NaOH 1 moles/l. La mezcla se dializa exhaustivamente frente a agua a través de una membrana

con un corte de 12- 14.000 Da. El producto dializado se somete a liofilización. 7,54 g de producto se obtienen con un grado de sulfatación igual a 1,0 grupo sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 93 %).

Ejemplo 4 (no de conformidad con la invención)

5 Síntesis de HA sulfatado a partir de HA que tiene un peso molecular bajo (MW promedio de 10 KD, en el intervalo de 5.000 a 30.000 Da) y un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva

Usando 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. 40 g de PySO₃ se dispersan en 100 ml de NMP, y después se añaden a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21 °C, la reacción se interrumpe mediante la adición de 0,5 volúmenes de agua. El pH inicialmente menor que 2,5, se lleva a neutralidad mediante la adición de un mol de NaOH 4M. El producto bruto de la reacción se aísla por precipitación mediante la adición de 2,5 volúmenes de metanol y se lava con 2 volúmenes de una mezcla de metanol/agua 8/2. El sólido se vuelve a disolver y se dializa frente a agua exhaustivamente usando una membrana con un corte de 3.500 Da. 12,0 g de producto se obtienen con un grado de sulfatación igual a 3,0 grupos sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 85%).

15 Ejemplo 5 (no de conformidad con la invención)

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

Usando el procedimiento ilustrado en el Ejemplo 1, 12,4 g de sal TBA de HA se disuelven en 300 ml de DMSO. 16,0 g de PySO₃ se dispersan en 100 ml de DMSO y se añaden después a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 21 °C, la reacción se interrumpe mediante la adición de 0,1 volúmenes de agua; el producto bruto de la reacción 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 dializa exhaustivamente frente a agua a través de una membrana con un corte de 3.500 Da. El producto dializado se somete a liofilización. 9,04 g de producto se obtienen con un grado de sulfatación igual a 1,0 grupo sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 90 %).

Ejemplo 6 (no de conformidad con la invención)

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 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 pre-llenada con 450 cm³ de resina Dowex en forma de TBA. La solución eluida de sal HA-TBA se recoge y se liofiliza. Se obtienen 32,0 g de producto, que se disuelven en 1,35 l de NMP; 100 g de PySO₃ se dispersan en 650 ml de NMP, y después se añaden a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 23 ± 1 °C, la reacción se interrumpe mediante la adición de 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 bruto de la reacción se aísla por precipitación mediante la adición de 2,5 volúmenes de metanol y se lava con 3,5 volúmenes de una mezcla metanol/agua 8/2. El sólido se vuelve a disolver y se dializa frente a agua exhaustivamente usando una membrana con un corte de 12-14.000 Da. 30,3 g de producto se obtienen con un grado de sulfatación igual a 3 grupos sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 83%).

40 Ejemplo 7 (no de conformidad con la invención)

Síntesis de HA sulfatado a partir de HA que tiene un peso molecular 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 pre-llenada con 450 cm³ de resina Dowex en forma de TBA. La solución eluida de la sal HA-TBA se recoge y liofiliza. Se obtienen 32,0 g de producto, que se disuelven en 1,65 l de NMP; 40 g de PySO₃ se dispersan en 350 ml de NMP, y después se añaden a la solución de HA. Después de 20 horas bajo agitación mecánica a una temperatura de 25 ± 1 °C, la reacción se interrumpe mediante la adición de 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 bruto de la reacción se aísla por precipitación mediante la adición de 3,5 volúmenes de metanol y se lava con 3,5 volúmenes de una mezcla metanol/agua 8/2. El sólido se vuelve a disolver y se dializa frente a agua exhaustivamente usando una membrana con un corte de 12-14.000 Da. 22,5 g de producto se obtienen con un grado de sulfatación igual a 1,0 grupo sulfato por unidad repetitiva (rendimiento = 87%).

Ejemplo 8 (no de conformidad con la invención).

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

Los sinoviocitos humanos previamente se expandieron *in vitro* y mantuvieron 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 pocillo (los sinoviocitos son células capaces de producir varios tipos de citoquinas, y por lo tanto se usan normalmente para este tipo de prueba experimental). HA sulfatado de grado 1 (HAS1) y grado 3 (HAS3) preparados como se describió en los Ejemplos 1-3, se añadieron después al medio de cultivo a concentraciones de 0,1 y 0,5 mg/ml (para ambas muestras), mientras que el tratamiento de control se representa por HA no sulfatado que tiene un peso molecular promedio (MW) de 200 KD. Después de 3 días de tratamiento, el *PCR en Tiempo Real* se realizó para evaluar la expresión génica de IL-10 e IL-12: el ARN celular se extrajo usando el método "Trizol", siguiendo las indicaciones del proveedor (reactivo de TRIZOL, LIFE Technologies, Gibco BRL). En resumen, las células se lisaron mediante la adición de 1,0 ml de Trizol y el ARN total se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm. Los *iniciadores* adecuados se seleccionaron para cada gen que se amplifica, usando el software Primer3 (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, EE.UU.). La expresión génica se evaluó por medio de *PCR en Tiempo Real* realizado con un TM5500 Rotor-Gene (Corbett research, Sydney, Australia). Las reacciones de PCR se realizaron usando los *iniciadores* a 300 nm y SYBR Green (Invitroge, Carlsbad, CA, EE.UU.) a 40 ciclos de 15s a 95 °C y 1 min. a 60 °C. El valor de "*umbrales de fluorescencia* (Ct)" se determinó automáticamente por el software, evaluando un coeficiente de amplificación de los genes estudiados entre el 92 y el 110 %. Para cada muestra de ADNc, el valor de la expresión génica se expresó en términos de la relación entre el ct del gen de *mantenimiento* (es decir, 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 (es decir, el gen de la IL-10 y IL-12), consecuentemente, el valor de ct de *mantenimiento* /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 se está estudiando. Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 1 y 2:

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

Figura 2:

Además en este experimento, ambos grados de sulfatación (grado 1 y grado 3) de HAS demostraron ser capaz de reducir significativamente la expresión génica de IL-12, reduciendo a la mitad la síntesis de su ARNm vs el control tratado con HA no sulfatado. Por lo tanto el ácido hialurónico sulfatado demostró 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 consecuentemente de todo el organismo, vs aquellas patologías descritas anteriormente en las que IL-10 demostró ser de importancia fundamental para la resolución y/o la mejora de enfermedades tales como asma, vitíligo y todas las inflamaciones en las que se implica IL-10.
- efectivo al disminuir la síntesis de ARNm nuevo de la citoquina altamente proinflamatoria IL-12, demostrando que es un agente antiinflamatorio válido capaz de intervenir en la expresión de proteínas implicadas en la patogénesis de enfermedades invalidantes tales como la psoriasis y todas aquellas descritas anteriormente.

Ejemplo 9 (no de conformidad con la invención)

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

Estos experimentos se realizaron para evaluar la efectividad de las muestras analizadas (preparado de conformidad con los Ejemplos 1-4) sobre la capacidad de inhibir la unión de TNF a su receptor expresado por las células del ES que se usan normalmente *in vitro* para este tipo de experimento, llevado a cabo con componentes de citoquinas yodados para una evaluación en ensayos de unión de radioligando.

El procedimiento experimental se realizó como se describe en Baglioni C. y otros, J Biol Chem, 1985, 260:13395-13397.

En resumen, se usó la línea de histiocitos humanos de 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 0,028nM (realizado en agua) simultáneamente con las muestras que se analizan (a una concentración de 1 mg/ml, que demostró ser la concentración más baja que causa la inhibición máxima), en un tampón de incubación consistente en 50 mM Tris-HCL pH 7,4, EDTA 0,5 mM, a 4 °C durante 3 horas.

Al final de la incubación, las células se centrifugaron con ftalato de dibutilo/dinonilftalato 2/1 y el precipitado obtenido se contó en un *contador* γ. Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 3:

Los resultados obtenidos muestran la efectividad de HAS al inhibir totalmente (100 %) la unión de TNF a su receptor, tanto para el grado 1 como 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 consecuentemente, representa la forma más efectiva de antagonizar los efectos proinflamatorios y tumorales del factor TNF.

Ejemplo 10 (no de conformidad con la invención)

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

Estos experimentos se realizaron para evaluar la efectividad de las muestras probadas (preparadas de conformidad con los Ejemplos 1-3 y 4 sobre la capacidad de inhibir la unión de IL-1 a su receptor expresado por las células 3T3 de ratón, que se usan normalmente *in vitro* para este tipo de experimento, llevado a cabo con componentes de citoquinas yodados para una evaluación en *ensayos de Unión de Radioligando*.

El procedimiento experimental se realizó como se describe en Chin J y otros., J Exp Med, 1987, 165:70-86.

En resumen, se usó la línea de fibroblastos murinos 3T3, sensible a la actividad citotóxica de la IL-1, que expresa su receptor relativo. Las células se incubaron inicialmente con ¹²⁵I-IL-1 10 pM (realizado en agua) simultáneamente con las muestras que se analizan (a una concentración de 1 mg/ml, que demostró ser la concentración más baja que causa la inhibición máxima), en un tampón de incubación que consiste en RPMI 1640 que contiene 20 mM HEPES pH 7,2 y 1 % de BSA, a 37 °C durante 2 horas. Al final de la incubación, las células se lavaron con tampón fosfato, después se disolvieron en 2,5 M de NaOH y se contaron en un *contador* y.

Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 4:

Los resultados obtenidos muestran la efectividad de HAS (tanto con MW medio como bajo) al inhibir la unión de IL-1 a su receptor en 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 describió anteriormente.

Ejemplo 11 (no de conformidad con la invención)

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

Estos experimentos se realizaron para evaluar la efectividad de las muestras probadas (preparadas de conformidad con los Ejemplos 1-3 y 4 sobre la capacidad de inhibir la unión de IL-6 a su receptor expresado en el mieloma humano U266, que se usa normalmente *in vitro* para este tipo de experimento, llevado a cabo con componentes de citoquinas yodados para una evaluación en *ensayos de Unión de Radioligando*.

El procedimiento experimental se realizó como se describe en Taga T. y otros, J Exp Med, 1987, 166:967-981.

En resumen, se usó la línea de mieloma humano U266, sensible a la actividad citotóxica de IL-6, que expresan su receptor relativo. Las células se incubaron inicialmente con ¹²⁵I-IL-6 0,08nM (realizado en agua) simultáneamente con las muestras que se analizan (a una concentración de 1 mg/ml, que demostró ser la concentración más baja que causa la inhibición máxima), en un tampón de incubación que consiste en RPMI 1640 que contiene 25 mM HEPES pH 7,1 y 10 % de BSA, a 4 °C durante 16 horas. Al final de la incubación, las células se lavaron con tampón fosfato, se centrifugaron a 9.000 rpm y el precipitado se contó en un *contador* y.

Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 5:

Los resultados obtenidos muestran la efectividad de HAS, tanto con MW medio como bajo, al inhibir totalmente (100 %) la unión de IL-6 a su receptor. Estos resultados demuestran consecuentemente el comportamiento del producto sulfatado, además 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 forma más efectiva de bloquear los efectos pro-inflamatorios de IL-6.

Ejemplo 12 (no de conformidad con la invención)

- 45 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 estas experimentaciones, se adoptaron células mononucleadas de sangre periférica humana (PBMC), que se derivan de varios donantes para evaluar el efecto de HAS en la producción de las citoquinas enumeradas anteriormente, usando:

- 50 - HA no sulfatado (MW promedio: 200 KD),

- HAS1 y HAS3 (preparado como se describió en los Ejemplos 1-3).

La separación de PBMC (Bøyum A., Scand J Clin Lab Invest 21 Suppl, 1968, 97:77-89) se realizó usando el producto Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) y siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. En el día cero 100.000 células se sembraron por pocillo (usando placas de 96 pocillos) en 200 µl de medio RPMI 1640, al que se había añadido 10 % de suero bovino fetal, HEPES 10 mM, Glutamina 2 mM, 1 % de Penicilina-Estreptomicina 100 U/ml. El efecto de todas las muestras se evaluó en PBMC no tratadas, o se estimuló con Lipopolisacárido LPS (10 µg/ml) (altamente proinflamatorio) o con Fitohemaglutinina PHA (10 µg/ml) (una sustancia capaz de estimular los linfocitos para 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 CO₂), 100 µl de sobrenadante se tomaron de cada pocillo para 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*®, usando una placa *Custom Human 9-Plex Array* siguiendo el protocolo indicado por el proveedor de 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 se estimulan como además cuando, por el contrario, se estimulan mediante factores y/o mitógenos inflamatorios específicos y potentes. HAS por lo tanto demuestra ser una molécula con características farmacológicas precisas, capaz de modular/regular la síntesis de citoquinas con una actividad anti-inflamatoria marcada, tanto en situaciones donde no se estimula una respuesta inmune y, particularmente eventos de estrés inflamatorio donde 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 otro lado, confirma el estímulo evidente para la producción de IL-10 además para las células que pertenecen al Sistema Inmune. Se confirma una vez más que, consecuentemente HAS es capaz de modular la síntesis de citoquinas, estimulando las que son antiinflamatorias e inhibiendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias.

Ejemplo 13 (no de conformidad con la invención)

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

Virus Herpes Simplex 1, virus Herpes Simplex 2, virus de la estomatitis vesicular

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

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 el Ejemplo 1-3. Después de un período de incubación de 1 hora a 37 °C, el medio de cultivo se sustituyó con medio fresco que contenía solamente 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 al tratamiento como se indicó anteriormente: las células se sembraron en micropocillos en un medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de las muestras a analizar 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 para escintilación. 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, para evaluar también la citotoxicidad de las muestras analizadas, se determinaron las concentraciones mínimas necesarias para causar daño morfológico (observable con un microscopio óptico) a las células utilizadas. La comparación se realizó con el dextrano-sulfato (DS) y el medicamento Aciclovir (ambas moléculas con una efectividad antiviral conocida, por lo tanto, se utilizan como control positivo).

Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 10:

Los datos experimentales confirman la potente acción antiviral de HAS1 y 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 vs HAS1. 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 vs VSV, mientras que los grados 1 y 3 de HAS tienen una actividad antiviral muy poderosa vs VSV.

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.

5 Citomegalovirus

La actividad de las muestras probadas 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 vs 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%.

10 Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 11:

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.

15 Ejemplo 14 (no de conformidad con la invención)

Evaluación in vitro de las propiedades fibrinolíticas del ácido HAS grado 3 con diferentes valores de MW

La evaluación de las propiedades fibrinolíticas de los productos sometidos a la prueba se comparó con la actividad fibrinolítica reconocida de la plasmina. En particular, se evaluó la tasa de disolución de la red de fibrina y la formación de productos solubles de la degradación de la fibrina (FDP).

20 Las muestras de plasma utilizadas provienen de sangre entera de sujetos sanos, sin ningún tratamiento farmacológico en curso.

Con el fin de probar la efectividad fibrinolítica de los productos sometidos a prueba, las muestras de sangre se distribuyeron en diversos tubos de ensayo en los que se indujo la formación de coágulos.

La formación de FDP se evaluó luego de la adición de:

- 25 • plasmina, como tratamiento de control.
- HAS3 preparado de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2
- HAS3 preparado de acuerdo con el Ejemplo 4.

Estudio experimental

30 Las muestras de sangre recién extraídas se distribuyeron en diversos tubos de ensayo que contenían citrato de sodio en una relación de 9:1. Los tubos de ensayo se centrifugaron inmediatamente a 3.000 rpm durante 5 minutos. El plasma obtenido se transfirió a un nuevo tubo de ensayo y se usó inmediatamente para efectuar la evaluación de FDP.

Se añadió trombina (300 mU/ml) precalentada a 37 °C a las muestras de plasma, como activador del fibrinógeno para inducir la formación del coágulo.

Lo siguiente se agregó a las diferentes probetas que contienen el coágulo de fibrina:

- 35 • una solución de plasmina 0,5 mU, 5 mU, 50 mU, 500 mU y 1 U
- soluciones de HAS3 en concentraciones de 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml y 200 mg/ml.

La variación de absorbancia a 405 nm durante 60 segundos se evaluó espectrofotométricamente para cada probeta. La reacción se dejó continuar hasta la disolución completa del coágulo.

40 El plasma coagulado, la solución de plasmina y una solución de HAS3 200KD y HAS3 20KD se mezclaron en una relación de 1:1 v/v y se mantuvieron a una temperatura de funcionamiento de 37 °C.

Tabla 1. Actividad fibrinolítica de PLASMINA.

<p>La tabla indica los valores promedio de mAbs/min registrados en las probetas que contienen plasma coagulado a las que se ha agregado plasmina a diferentes concentraciones. Los valores especificados indican la tasa a la que se disuelve el coágulo de fibrina y, en consecuencia, la tasa a la que se producen los FDP. La actividad fibrinolítica de la plasmina es proporcional a su concentración.</p> <p>Los valores medios de mAbs/min registrados para cada concentración de plasmina se representaron</p>
--

subsecuentemente frente a las Unidades de enzima respectivas para establecer la función matemática que correlaciona los valores de mAbs/min con las Unidades de enzima.				
PLASMINA: actividad fibrinolítica (mAbs/min)				
1 U	500mU	50mU	5mU	0,5mU
190	178	126	68	1

Tabla 2. Actividad fibrinolítica de HAS3 a diferentes valores de MW

Se calcularon los valores de mAbs/min registrados en las probetas que contenían plasma coagulado a los que se había agregado HAS3 a diferentes concentraciones. Los valores indicaron la tasa a la que se disolvió el coágulo de fibrina y, en consecuencia, la tasa a la que se produjeron los FDP. La actividad fibrinolítica de HAS3 fue proporcional a su concentración. En la tabla, la actividad fibrinolítica de HAS3 se expresa como Unidades equivalentes de plasmina.				
Actividad fibrinolítica de HAS3 (200KD) (expresada en equivalentes en mU de plasmina)				
200 mg/ml	150 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml
1,1 U	50 mU	10 mU	3 mU	0,5 mU
Actividad fibrinolítica de HAS3 (10KD) (expresada en equivalentes en mU de plasmina)				
200 mg/ml	150 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml
400 mU	25 mU	2 mU	0,3 mU	0,25 mU

Resultados:

- 5 La experimentación efectuada mostró cómo HAS es un agente fibrinolítico potente, con una efectividad igual a la plasmina. La plasmina es una enzima importante, que pertenece al grupo de hidrolasas, que degrada muchas proteínas del plasma sanguíneo y, en particular, la fibrina de los trombos y de los coágulos. La degradación de la fibrina se llama fibrinólisis. Una deficiencia de plasmina puede conducir a trombosis, ya que los trombos no se degradan adecuadamente. Aunque HAS no es una enzima, ha demostrado ser equivalente al control enzimático, lo que permite el uso del producto sulfatado como un nuevo agente fibrinolítico, con todas las ventajas de una molécula no enzimática como, por ejemplo, la estabilidad a temperatura ambiente con tiempos de conservación mucho más largos y facilidad de formulación.

Ejemplo 15

- 15 Evaluación de la permeación de la piel de HAS1 (no de conformidad con la invención) y HAS3 con valores de MW diferentes.

Evaluación de la absorción de la piel de diclofenaco formulado en asociación con HAS vs HA

- 20 La piel usada para realizar los experimentos se obtiene del abdomen de los pacientes entre 30 y 50 años de edad, sometidos a reducciones abdominales quirúrgicas. Las secciones de la piel con un grosor completo se congelan después de la intervención quirúrgica y se conservan a -20 °C hasta el momento del experimento, en el que las muestras se descongelan a temperatura ambiente y se separan con precisión a partir del tejido adiposo. La piel se divide en secciones cuadradas de 2,5cm², inmersas durante un minuto en agua a una temperatura de 60 °C y con la ayuda de pinzas específicas, la capa de la córnea y la epidermis (SCE) se separan con precisión de los tejidos subyacentes. Las muestras obtenidas se analizan con un microscopio óptico y se descartan si se encuentran punciones. La SCE se monta en la parte inferior de una celda de Franz con la epidermis hacia abajo y la capa de la córnea en contacto con la solución del donador que se encuentra arriba. El área de permeación es una superficie circular de 0,636 cm². La parte inferior y superior de la celda de Franz se fijan con precisión a la SCE para separar el compartimento donador (volumen de la solución del donador: 0,50 ml) y el compartimento aceptor (volumen de solución del receptor 5,00 ml), cuyos volúmenes se calibran con exactitud. Los disolventes que se usan se desgasifican para eliminar la formación de burbujas, que debe evitarse especialmente para la solución del receptor, que se regula por termostato a 37 °C por medio de un baño termostático de circulación; bajo estas condiciones la SCE está a una temperatura de 31-33 °C. Cada experimento se realiza triplemente y el resultado previsto como el promedio de los 3, expresado como la cantidad de analito que ha cruzado la unidad de superficie de la piel después de 24 horas.

La permeación de HA y HAS1 y HAS3 de ambos MW se realizó a partir de soluciones al 3 % (peso/volumen), con detección de la cantidad de permeado a través del ensayo de ácido glucurónico y espectrometría ICP (Plasma Acoplado Inductivamente) para azufre, respectivamente.

5 La permeación de la sal de diclofenaco sódico se realizó sobre la sal como tal en solución acuosa, sobre la sal en presencia de HA 200 KD a 3 % (peso/volumen) y sobre la sal en presencia de HAS3 preparado de conformidad con el Ejemplo 1-2, a 3 % (peso/volumen). En los tres casos, la concentración de sal de diclofenaco sódico en la solución permeante es igual a 1 % (peso/volumen). La concentración de diclofenaco se determinó a través de análisis de HPLC en fase inversa en un aparato Agilent 1200 Series y detección UV (254 nm), columna C18, eluyente acetonitrilo/agua/ácido acético 50/46/4 con un flujo de 1,2 ml/min.

10 Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 12 y la Figura 13

La Figura 12 muestra cómo la sulfatación de HA ha aumentado significativamente su permeación a través de la piel y cómo este resultado es particularmente evidente para el MW promedio.

La Figura 13, por el contrario, muestra cómo HAS se comporta como promotor de la absorción de la piel del principio activo diclofenaco, duplicando su cantidad total de permeado en 24 h con respecto al control y la asociación con HA.

15 Ejemplo 16 (no de conformidad con la invención)

Evaluación de la actividad hidratante y protectora obtenida con HAS vs HA y crema base de control.

20 sujetos humanos de edades comprendidas entre 18 y 70 años, sin patologías de la piel y tratamiento farmacológico en curso, se trataron diariamente con cantidades ciertas y constantes de los productos probados, a nivel del antebrazo. Los productos experimentales fueron:

- 20 ● control: que consiste en una crema base hidratante
- crema base (como control) que contiene HA 200 KD 01 %
- crema base (como control) que contiene HAS3 01 %, preparado de conformidad con Ejemplo 1-2

Crema Base: composición

	AGUA DESIONIZADA	85,10 %
DERMOL 88	ETIL HEXIL ETILHEXANOATO	6,50
NIKKOMULESE 41	POLIGLICERIL-10 PENTAESTEARATO ALCOHOL BEHENÍLICO, ESTEAROIL LACTILATO DE SODIO	5,00
SEPIGEL 305	POLIACRILAMIDA C13-14 ISO-PARAFINA LAURETH 7	2,50
ISOCIDE PF	FENOXIETANOL, METILPARABENO, ETILPARABENO, PROPILPARABENO, PROPILENGLICOL	0,50
KEMIPURE 100	IMIDAZOLIDINILUREA	0,30
EDTA DISÓDICO	EDTA DISÓDICO	0.10

25 Método de Producción

Cargar 90 % de agua y EDTA disódico e Isocide PF Calentar a 65-70 °C; disolver Nikkomulese en un contenedor adecuado, Dermol 88 mediante calentamiento a 65-70 °C; unir la fase grasa con la fase acuosa bajo la acción de una turbina. Enfriar a 30-35 °C, añadir Kemipure 100 disuelto en el restante 10 % de agua, añadir Sepigel para regular la viscosidad y enfriar a 25 °C.

30 La diferencia en los valores de hidratación obtenidos se evaluó por medio de un corneómetro CM825 mediante un promedio de 3 puntos y un análisis profilométrico de la superficie de la piel se realizó además usando una cámara de video Visioscan VC98 en el tiempo T0 (valor basal) y T7, después de 7 días de uso de los productos.

Los resultados obtenidos se grafican en las Figuras 14 y 15:

35 La Figura 14 muestra el mayor efecto hidratante de la piel después del tratamiento con HAS3, vs tanto la crema base y vs la que contiene HA. La Figura 15, por otra parte, demuestra cómo el índice de rugosidad de la piel, después de 7

días de tratamiento, se ha reducido de manera significativa con respecto a los controles. Estos datos demuestran claramente la efectividad de HAS en la mejora notablemente del índice de hidratación de la piel, que muestra una hidratación efectiva y actividad protectora sobre la piel reduciendo la transpiración de agua transepidérmica.

Ejemplo 17 (no de conformidad con la invención)

- 5 Preparación de una formulación en forma de una SOLUCION para inhalaciones que contienen HAS grado 1

40 mg (o 20 mg si el HAS tiene un MW de 500-730KD) de ácido hialurónico sulfatado grado 1, que tiene un MW bajo o medio, se introducen en un frasco de vidrio de 50 ml, después de que se añadió 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 añaden 2 ml de propilenglicol y además PBS 0,2 M a pH 7,4 estériles hasta que se alcanza el volumen total de 20 ml. La solución se mantiene bajo agitación durante unos pocos minutos.

Ejemplo 18 (no de conformidad con la invención)

Preparación de una formulación en forma de una SOLUCIÓN para inhalaciones que contiene HAS grado 3

100 mg de ácido hialurónico sulfatado grado 3 (HAS3) obtenido a partir de HA 200 KD se introducen en un frasco de vidrio de 50 ml, después de lo cual se añaden 15 ml de PBS 0,2 M a pH 7,4 estériles. La mezcla se somete a agitación durante aproximadamente 30 minutos, hasta la disolución completa del polvo. Cuando se ha obtenido la disolución completa, se añaden 2 ml de propilenglicol y además PBS 0,2 M a pH 7,4 estériles hasta que se alcanza el volumen total de 20 ml. La solución se mantiene bajo agitación durante unos pocos minutos.

Ejemplo 19 (no de conformidad con la invención)

Preparación de una formulación en forma de un GEL HIDROFÍLICO que contiene, HAS, HA y CMC

20 Metil y propil-parabeno se disuelven en agua purificada a 80 °C. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, se añade hialuronato de sodio bajo agitación hasta la disolución seguida de HAS1 (o HAS3), manteniendo la agitación hasta la disolución completa. El glicerol y el propilenglicol se añaden después bajo agitación hasta la disolución completa. Finalmente se añade carboximetilcelulosa sódica (CMC) y la mezcla hasta que se obtiene una solución gelificada se mezcla.

- 25 Ejemplo 20 (no de conformidad con la invención)

Preparación de una formulación en forma de GEL HIDROFÍLICO para uso de la mucosa (sin conservantes) que contiene HAS y HA

30 Hialuronato de sodio se disuelve bajo agitación, y después HAS1 (o HAS3) en una cantidad de agua de aproximadamente 90 % de la prevista en la fórmula. Propilenglicol, Symdiol 68 se añaden seguido por MP Diol Glycol, mezclando hasta la disolución completa de varios componentes. El carbómero 974P se añade posteriormente y se mantiene la agitación hasta la dispersión homogénea de este último. Las perlas de hidróxido de sodio se disuelven en el restante 10 % de agua y esta solución se añade lentamente a la previamente obtenida, la mezcla para obtener la gelificación de la fase acuosa se mezcla.

Ejemplo 21 (no de conformidad con la invención)

- 35 Preparación de una formulación en forma de un GEL HIDROFÍLICO que contiene HAS e Hialuronidasa

40 Metil y propil-parabeno se disuelven en agua purificada a 80 °C. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, se añade la enzima hialuronidasa bajo agitación, seguido de HAS3, manteniendo la agitación hasta la disolución completa de los dos componentes. El carbómero 974P se añade posteriormente y se mantiene la agitación hasta la dispersión homogénea de este último. Después se añade TEA para obtener la gelificación de la fase acuosa. El glicerol y propilenglicol se añaden finalmente bajo agitación.

Ejemplo 22 (no de conformidad con la invención)

Preparación de una formulación en forma de una CREMA HIDROFÍLICA (Emulsión O/A) que contiene HAS e Hialuronidasa

45 La fase oleosa se prepara mediante fusión de la 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 final de glicerol, hialuronidasa y posteriormente HAS3 bajo agitación hasta la disolución completa de varios componentes.

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

- 50 Ejemplo 23 (no de conformidad con la invención)

Preparación de una formulación en la forma de una ESPUMA que contiene HAS e Hialuronidasa

- 5 Metil y propil-parabeno se disuelven en agua purificada a 80 °C. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, se añade la enzima Hialuronidasa bajo agitación, seguido de HAS3, manteniendo la agitación hasta la disolución completa. El propilenglicol se añade después y la mezcla hasta la disolución completa se mezcla; polivinilpirrolidona se incorpora posteriormente, mezclando hasta la disolución completa y, finalmente, polisorbato 80 manteniendo la agitación hasta la disolución.

La fase de distribución de la solución obtenida se lleva a cabo después en un cilindro, procediendo con la presurización con un propulsor de isobutano, n-butano, propano.

Ejemplo 24 (no de conformidad con la invención)

- 10 Preparación de una formulación en forma de un UNGÜENTO que contiene HAS3 e Hialuronidasa

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

Ejemplo 25 (no de conformidad con la invención)

- 15 Preparación de una formulación en forma de un LIPOGEL que contiene HAS3 e Hialuronidasa

La parafina líquida ligera, vaselina blanca y alcohol cetilesteárico se funden bajo agitación a 90 °C. El agente lipogelificante aceite de ricino hidrogenado se añade bajo agitación hasta que se obtiene una solución homogénea y después la mezcla se enfría lentamente a temperatura ambiente. La Hialuronidasa, HAS3 se incorporan finalmente y la mezcla hasta que se obtiene una suspensión homogénea se mezcla.

- 20 Ejemplo 26 (no de conformidad con la invención)

Preparación de una formulación en forma de una LÁPIZ LABIAL que contiene HAS y HA

- 25 La cantidad correcta de parafina líquida indicada en la fórmula de fabricación se carga en un contenedor adecuado. Se calienta a 88-92 °C y la parafina blanda blanca, parafina dura, cera de abejas blanca, cerasina, Arlacel se añaden después bajo agitación, la agitación se mantiene hasta la fusión completa de varios componentes. Acetato de all-rac- α -tocoferilo, alantoína, butilhidroxitolueno, propil p-hidroxibenzoato de metilo se incorporan y la mezcla hasta la disolución completa se mezcla, manteniendo la masa a 88-92 °C.

La cantidad de agua purificada que se prevé en la fórmula se carga por separado en un contenedor adecuado, hialuronato de sodio, HAS1 (o HAS3) se añaden después bajo agitación hasta la disolución completa, seguido de Edetato disódico manteniendo la agitación hasta la disolución.

- 30 La fase acuosa se transfiere bajo agitación al contenedor que contiene la masa fundida, manteniendo el sistema a 88-92 °C y la agitación hasta que se obtiene una solución límpida. Los dos agentes aromatizantes se añaden después bajo agitación y la mezcla durante 10' se mezcla. La masa fundida se vierte en moldes y se enfría inmediatamente a T < 0 °C hasta que se obtienen barras sólidas.

Ejemplo 27 (no de conformidad con la invención)

- 35 Preparación de una formulación en forma de ÓVULOS VAGINALES que contienen HAS y HA

Se deja que la gelatina se hinche en 70 % de agua purificada a 85 °C; se disuelven el hialuronato de sodio y HAS1 (o HAS3) en la cantidad restante de agua y esta solución se mezcla con la glicerina llevada a la misma temperatura. La solución de glicerina se añade 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 los óvulos sólidos.

- 40 Ejemplo 28 (no de conformidad con la invención)

Preparación de una formulación en forma de una CREMA HIDROFÍLICA (Emulsión O/A) que contiene HAS y HA

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

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

Ejemplo 29 (no de conformidad con la invención)

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

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

5 Ejemplo 30

Preparación de una formulación en forma de un GEL HIDROFÍLICO que contiene HAS3, HA y diclofenaco

10 Metil y propil-parabeno se disuelven en agua purificada a 80 °C. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, el diclofenaco sódico, el hialuronato de sodio y después, el HAS3 se añaden bajo agitación, manteniendo la agitación hasta la disolución completa de los dos componentes. El carbómero 974P se añade posteriormente y se mantiene la agitación hasta la dispersión homogénea de este último. Después se añade TEA para obtener la gelificación de la fase acuosa. El glicerol y propilenglicol se incorporan finalmente bajo agitación.

Ejemplo 31

Preparación de una formulación en forma de una CREMA HIDROFÍLICA (Emulsión O/A) que contiene HAS3 y diclofenaco

15 La fase oleosa se prepara por fusión de la parafina líquida, ácido esteárico y Tefose 1500 bajo agitación a 50 °C. La fase acuosa se prepara por separado mediante la disolución inicial a 80 °C de metil-parabeno y, posteriormente, el enfriamiento a temperatura ambiente y la incorporación final de glicerol, diclofenaco sódico y, posteriormente, HAS3 bajo agitación hasta la disolución completa de los diversos componentes.

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

Ejemplo 32

Preparación de una formulación en forma de una ESPUMA que contiene HAS y diclofenaco

25 Metil y propil-parabeno se disuelven en agua purificada a 80 °C. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, se añade diclofenaco sódico con agitación, seguido de HAS3, manteniendo la agitación hasta la disolución completa. Después, se añade propilenglicol y la mezcla hasta la disolución completa se mezcla; se incorpora la polivinilpirrolidona posteriormente, mezclando hasta la disolución completa y, finalmente, el polisorbato 80 manteniendo la agitación hasta la disolución.

La fase de distribución de la solución obtenida se lleva a cabo después en un cilindro, procediendo con la presurización con un propulsor de isobutano, n-butano, propano.

30 Ejemplo 33

Preparación de las formulaciones en forma de un PARCHO cutáneo que contiene HAS y diclofenaco

35 Estos ejemplos se refieren a la preparación de una matriz polimérica que contiene HAS para la liberación controlada de fármacos de uso tópico, y en este caso, la sal de diclofenaco sódico FANS, que mejora la absorción dérmica y/o transdérmica del principio activo contenido en ella, gracias a la acción promotora de HAS. La matriz en cuestión comprende preferentemente copolímeros de ácido acrílico y sus ésteres acrílicos y/o metacrílicos con una temperatura de transición vítrea (Tg) inferior a la temperatura ambiente, preferentemente inferior a 0 °C, cuyos grupos de carboxilo libre presentes a lo largo de la cadena polimérica están salificados con bases orgánicas (por ejemplo, amoniaco, etilendiamina, copolímeros del éster de ácido acrílico y/o metacrílico que tiene una función de amonio catiónico en el grupo alquilo (EUDRAGIT® E100 se prefiere) o bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxidos o carbonato o bicarbonato de metales alcalinos, alcalino-terrestre y de transición) como es conocido por los expertos en el campo. Los copolímeros normalmente usados de acuerdo con la presente invención consisten de 2 o más monómeros en porcentajes variables; ejemplos de estos monómeros son:

- ácido acrílico
- acrilato de butilo y/o metilo
- 45 • acrilato de 2-etil hexilo
- metacrilato de glicidilo
- acetato de vinilo

Muchos copolímeros están disponibles en el mercado (tales como Duro-tak® 280-2416, 280-2516, 87-2620, 87-2852, 380-1054, 87-2051, Nacional y Almidón) disuelto en disolventes orgánicos, con un porcentaje de grupos carboxilo

libres en el intervalo de 0,1 a 15 %, que pueden salificarse con bases orgánicas o inorgánicas, como se describió anteriormente. Estos copolímeros están contenidos preferentemente en la matriz de parche cutáneo en una cantidad de 30-90 % en peso.

5 Adicionalmente, las matrices poliméricas que contienen HAS que comprenden los siguientes dos componentes principales pueden prepararse:

- a. Se prefieren los polimetacrilatos: es decir, copolímeros del éster de ácido acrílico y/o metacrílico que tiene una función de amonio catiónico en el grupo alquilo (EUDRAGIT® E100, EUDRAGIT® RS y EUDRAGIT® RL). Dichos polímeros pueden constituir de 10 a 40 % en peso del total de la matriz de adhesiva después del secado, preferentemente del 10 al 25 %.

10 - b. El ácido dicarboxílico o tricarboxílico orgánico (tales como, por ejemplo, ácido succínico, fumárico, adípico y láurico), como contraión para el componente catiónico a, (además, actúan como agentes reticulantes del componente a). El componente b puede ajustarse de modo que se afecta la neutralización parcial o completa. Un componente b adicional adecuado son los polímeros de acrilato o metacrilato ácido-funcionales, por ejemplo, el ácido poliacrílico Carbopol®. Los componentes b pueden estar contenidos en % en peso en el intervalo de 1 a 40 % del total de la
15 formulación adhesiva después del secado, preferentemente de 1 a 20 %.

La matriz polimérica anterior dentro de la formulación final está dentro del intervalo de 10-90 % con respecto al peso seco, preferentemente de 50 a 90 % basado en el peso seco de la composición final. La cantidad de principio activo incorporado varía con relación a su naturaleza y el efecto terapéutico dérmico o transdérmico deseado. Está normalmente presente en una cantidad en el intervalo de 0,1 a 30 % en peso con respecto al peso seco de la
20 composición final.

La formulación además puede contener excipientes, lenitivos, emolientes, agentes emulsionantes, moduladores de adhesión, conservantes, plastificantes, acidificantes/tampones. Las cantidades de los excipientes pueden variar en intervalos grandes, entre 0,01 y 30 %, en dependencia de su función.

25 Un promotor de la absorción cutánea con propiedades lenitivas, antipruriginosas y de anti-enrojecimiento es HAS de grado 3, presente en concentraciones en el intervalo de 0,1 a 30 % del peso seco de la composición final. La matriz anterior asegura: una permeación controlada, y constante del principio activo sin irritación, y adhesividad a la piel.

Método de preparación

30 1 kg del copolímero de metacrilato seleccionado (por ejemplo, Duro-tak® 280-2416, 280-2516 o 87-2852) que tiene un contenido de sólidos de 30-40 % p/p, se añade bajo agitación mecánica con 300g de una solución al 30 % p/p a base de disolvente/agua EUDRAGIT® E100; la mezcla se deja bajo agitación moderada durante 30 min. A partir de entonces, se añaden después, el principio activo (100 g de sal de diclofenaco sódico) y HAS3 previamente disuelto en una solución acuosa. La mezcla se deja en agitación hasta la disolución completa. Para la preparación de la capa de matriz, esta mezcla se puso después, en la parte superior de una película de poliéster/papel de silicio y el secado se
35 efectúa por evaporación de los disolventes residuales. La matriz de propagación tiene un peso seco de aproximadamente 60 g/m².

Por lo tanto, la matriz obtenida se acopla después, con una película de polietileno o tejido de poliéster no tejido para la formación final del parche.

La composición final de cada parche solo contiene 140 mg de diclofenaco y 40 mg de HAS3.

Tabla 3

GEL HIDROFÍLICO (Ejemplo 19) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad (mg/1g 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

ES 2 808 575 T3

Propil p-hidroxibenzoato	0,2 mg
Agua purificada	hasta 1g
GEL HIDROFÍLICO para uso de la mucosa (Ejemplo 20) (no de conformidad con la invención)	
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	hasta 1g
GEL HIDROFÍLICO (Ejemplo 21) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad (U.I o mg/1g de hidrogel)
HAS3	10 mg
Hialuronidasa	150 U.I
Carbómero 974P	15 mg
Glicerol	100 mg
Propilenglicol	66,75 mg
Trietanolamina	13,25 mg
Metil p-hidroxibenzoato	2 mg
Propil p-hidroxibenzoato	0,2 mg
Agua purificada	hasta 1 g
CREMA HIDROFÍLICA (Emulsión O/A) (Ejemplo 22) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad (U.I o mg/1g de crema)
HAS3	10 mg
Hialuronidasa	150 U.I
Tefose 1500	110 mg
Glicerol	80 mg

Ácido esteárico	33 mg
Parafina líquida	40 mg
Metil p-hidroxibenzoato	1 mg
Agua purificada	hasta 1 g
ESPUMA (Ejemplo 23) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad (U.I o mg/1 g de solución)
HAS3	10 mg
Hialuronidasa	150 U.I
Polisorbato 80	40 mg
Propilenglicol	40 mg
Polivinilpirrolidona	30 mg
Metil p-hidroxibenzoato	2 mg
Propil p-hidroxibenzoato	0,3mg
Agua purificada	hasta 1 g
Un cilindro contiene aproximadamente 94 % de la solución y 6 % de propulsor (isobutano, n-butano, propano)	
UNGÜENTO (Ejemplo 24) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad (U.I o mg/1 g de ungüento)
HAS3	20 mg
Hialuronidasa	200 U.I
Parafina ligera líquida	200 mg
Petrolato blanco	hasta 1 g
LIPOGEL (Ejemplo 25) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad (U.I o mg/1g de Lipogel)
HAS3	20 mg
Hialuronidasa	200 U.I
Aceite de ricino hidrogenado	10 mg
Alcohol Cetoestearílico	50 mg
Petrolato blanco	365 mg

Parafina ligera líquida	hasta 1 g
LÁPIZ LABIAL (Ejemplo 26) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad (mg/1g lápiz labial)
HAS1 (HAS3)	30 mg (10 mg)
Parafina líquida	253,2 mg
Parafina blanda blanca	326,2 mg
Parafina dura	144,3 mg
Cera blanca de abejas	96 mg
Ceresina	28,2 mg
Arlacel 582	95,8 mg
Hialuronato de sodio	2 mg
Alantoína	1,1 mg
Acetato de all-rac- α -tocoferilo	1,1 mg
Propil p-hidroxibenzoato	0,4 mg
Hidroxitolueno de butilo	0,4 mg
Agua purificada	19,2 mg
Edetato disódico	1,1 mg
Saborizante de vainilla	0,5 mg
Saborizante dulce	0,5 mg
ÓVULOS VAGINALES (Ejemplo 27)	
	No de conformidad con la invención
Componentes	Cantidad (mg/1 g de óvulo)
HAS1 (HAS3)	10 mg
Glicerina	580
Gelatina	200
Hialuronato de sodio	2
Agua purificada	hasta 1g
CREMA HIDROFÍLICA (Emulsión O/A) (Ejemplo 28) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad mg/1g de crema)
HAS1 (HAS3)	10 mg

ES 2 808 575 T3

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	hasta 1 g
UNGÜENTO (Ejemplo 29) (no de conformidad con la invención)	
Componentes	Cantidad (mg/1g de ungüento)
HAS1 (HAS3)	20 mg
Parafina ligera líquida	200 mg
Petrolato blanco	hasta 1 g
GEL HIDROFÍLICO (Ejemplo 30)	
Componentes	Cantidad (mg/1g de hidrogel)
Diclofenaco sódico (*)	30 mg
Carbómero 974P	15 mg
Glicerol	100 mg
HAS3	20 mg
Hialuronato de sodio	2mg
Propilenglicol	66,75 mg
Trietanolamina	13,25 mg
Metil p-hidroxibenzoato	2 mg
Propil p-hidroxibenzoato	0,2 mg
Agua purificada	hasta 1 g
(*) : diclofenaco sódico 3 %	
CREMA HIDROFÍLICA (Emulsión O/A) (Ejemplo 31)	
Componentes	Cantidad (mg/1g de crema)
Diclofenaco sódico	10 mg

ES 2 808 575 T3

Tefose 1500	110 mg
Glicerol	80 mg
HAS3	30 mg
Ácido esteárico	33 mg
Parafina líquida	40 mg
Metil p-hidroxibenzoato	1 mg
Agua purificada	hasta 1 g
(*) : diclofenaco sódico 1 %	
ESPUMA (Ejemplo 32)	
Componentes	Cantidad (mg/1g de solución)
Diclofenaco sódico	40 mg
Polisorbato 80	40 mg
Propilenglicol	40 mg
HAS3	10 mg
Polivinilpirrolidona	30 mg
Metil p-hidroxibenzoato	2mg
Propil p-hidroxibenzoato	0,3 mg
Agua purificada	hasta 1 g
Un cilindro contiene aproximadamente 94 % de la solución y 6 % de propulsor (isobutano, n-butano, propano)	
(*) : diclofenaco sódico 4 %	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para uso tópico que contiene ácido hialurónico sulfatado como promotor de absorción de la piel de diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos, en la que dicho ácido hialurónico sulfatado tiene un grado de sulfatación igual a 3, previsto como el número de grupos sulfato por unidad de disacárido, involucrando la sulfatación los hidroxilos de alcohol presentes en la cadena de polisacárido (HA) y en la que dicho ácido hialurónico sulfatado se prepara a partir de un ácido hialurónico (HA) que tiene un peso molecular que varía de 150.000 a 250.000 Da y en la que dicho ácido hialurónico sulfatado se formula con diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que contiene hialuronidasa.
- 10 3. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-2 en forma de ungüento, lipogel, hidrogel, lápiz labial, crema, parches, óvulos vaginales y sondas, espuma, gel de mucosa, preparaciones oftálmicas, duchas vaginales, enjuagues bucales, soluciones para aplicación tópica.
- 15 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 en forma de parches, en asociación con fármacos antiinflamatorios no esteroideos seleccionados del grupo que consiste en diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno o sales de los mismos.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que contiene diclofenaco.

Fig. 1 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCION

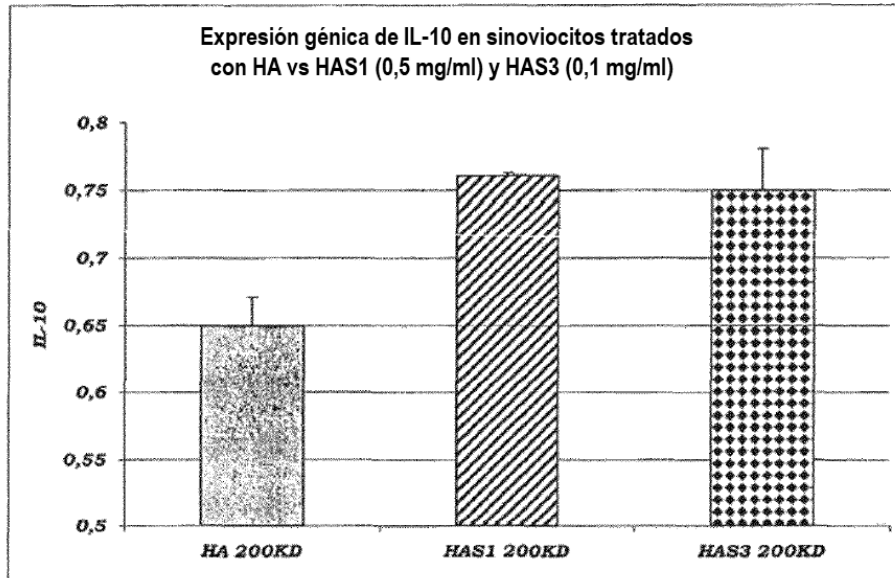


Fig. 2 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCION

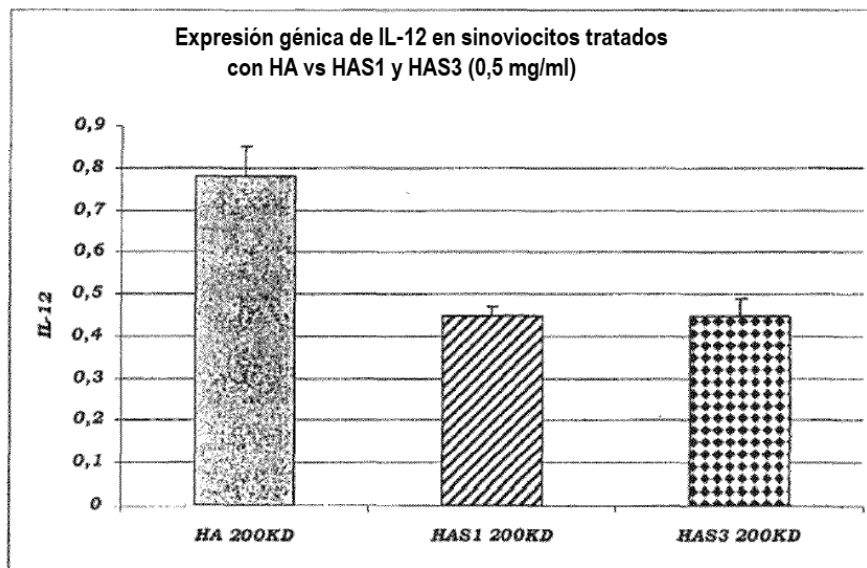


Fig. 3 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCIÓN

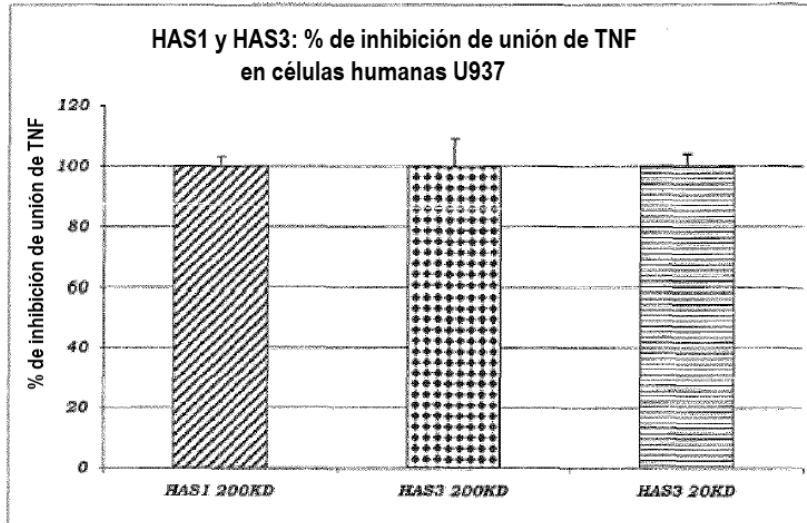


Fig. 4 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCIÓN

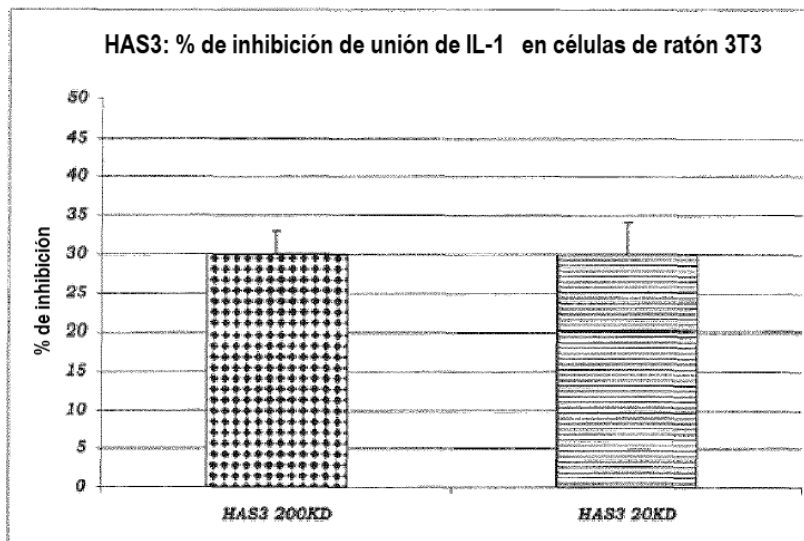


Fig. 5 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCION

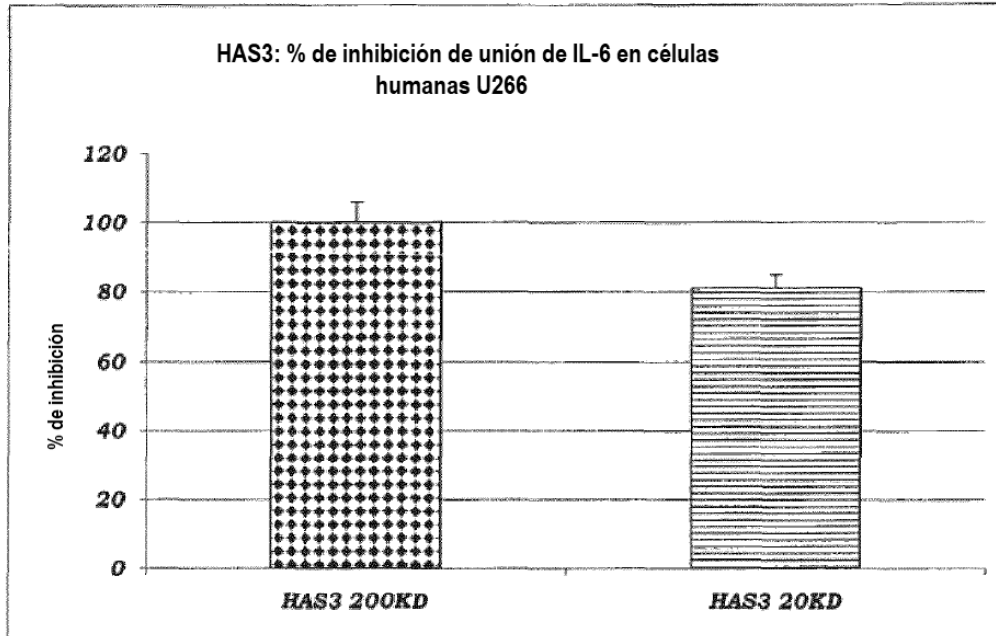


Fig. 6 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCION

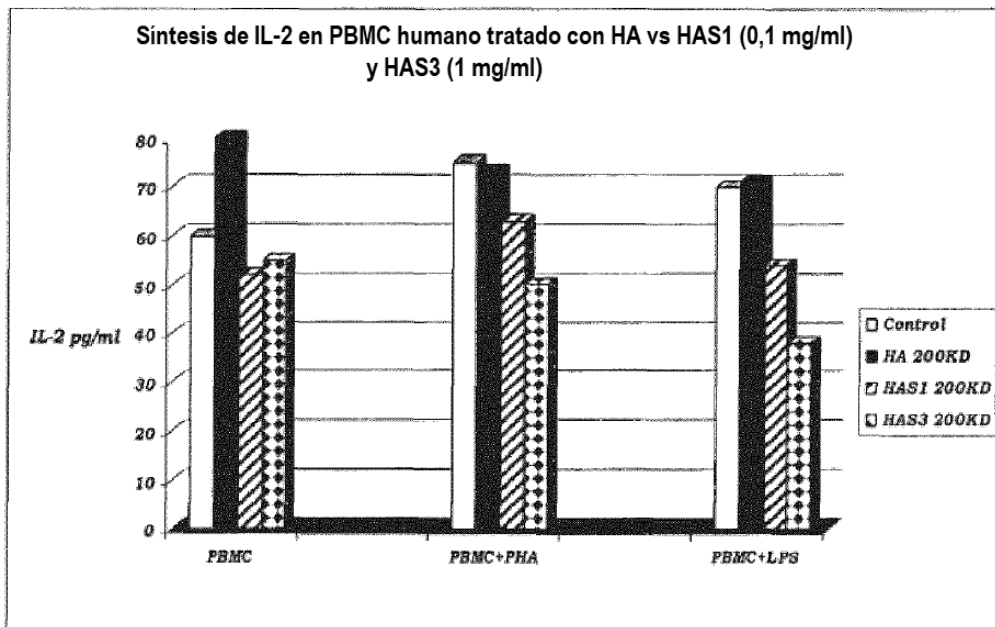


Fig. 7 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCIÓN

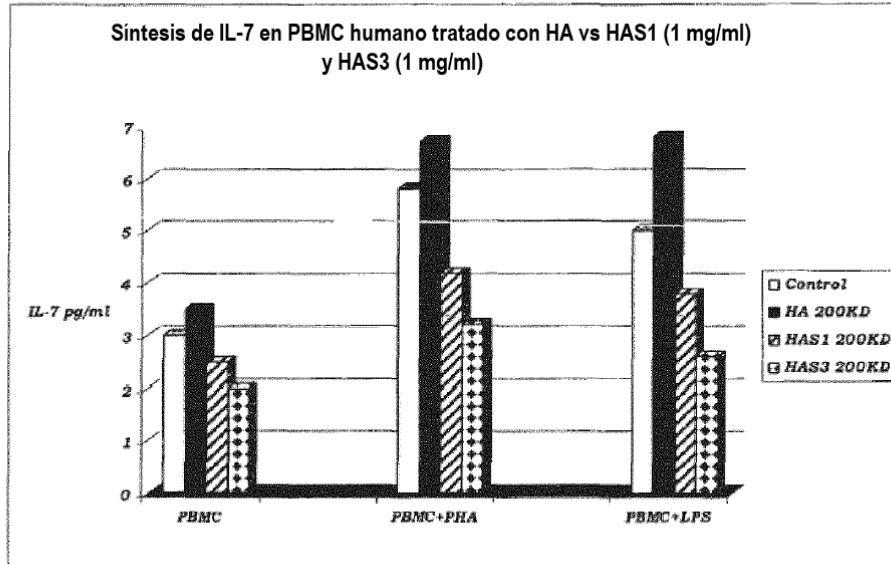


Fig. 8 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCIÓN

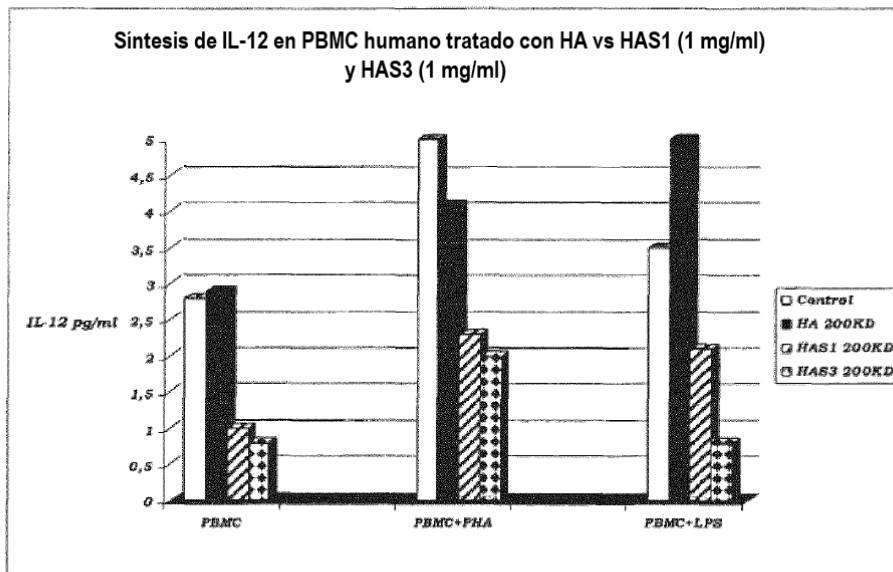


Fig. 9 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCIÓN

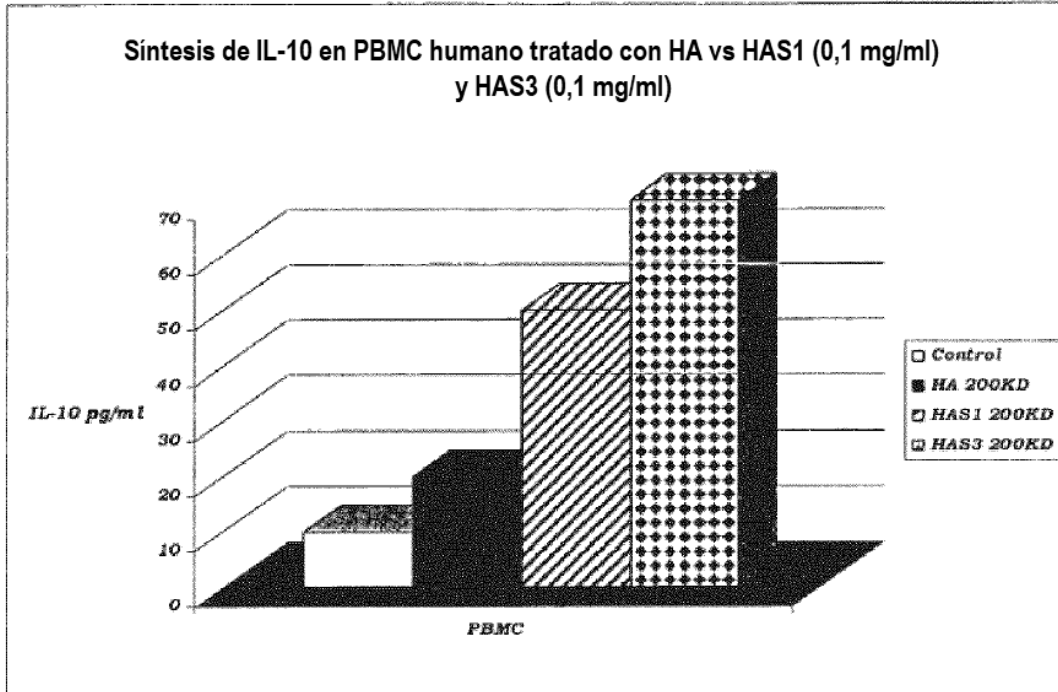


Fig. 10 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCION

Producto probado	Conc. citotóxica mínima (µg/ml)	Concentración inhibitoria mínima IC 50 (µg/ml)						
		virus-1 Herpes simplex (KOS)	virus-1 Herpes simplex (F)	virus-1 Herpes simplex (McIntyre)	virus-2 Herpes simplex (G)	virus-2 Herpes simplex (196)	virus-2 Herpes simplex (Lyons)	virus de estomatitis vesicular
HA-NS1	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
HAS1	>400	48	16	9,6	9,6	3,2	3,2	1,92
HAS3	>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. 11 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCION

Producto probado	Concentración inhibitoria mínima IC 50 (µg/ml)	
	Cytomegalovirus AD - cepa 169	Cytomegalovirus AD - cepa Davis
HA-NS1	>50	>50
HAS1	5	3,4
HAS3	0,2	0,2
DS	2,7	0,5

Fig. 12

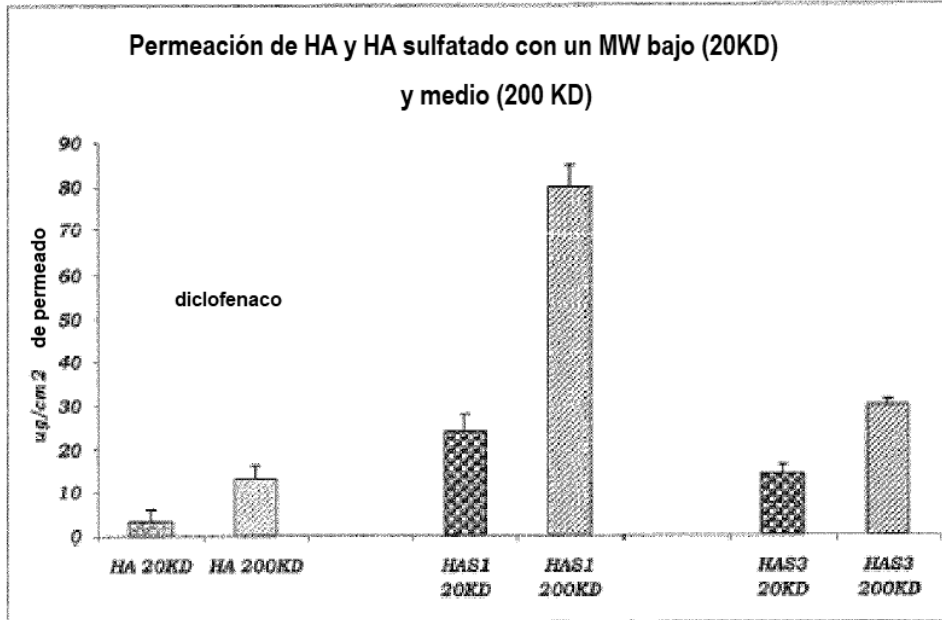


Fig. 13

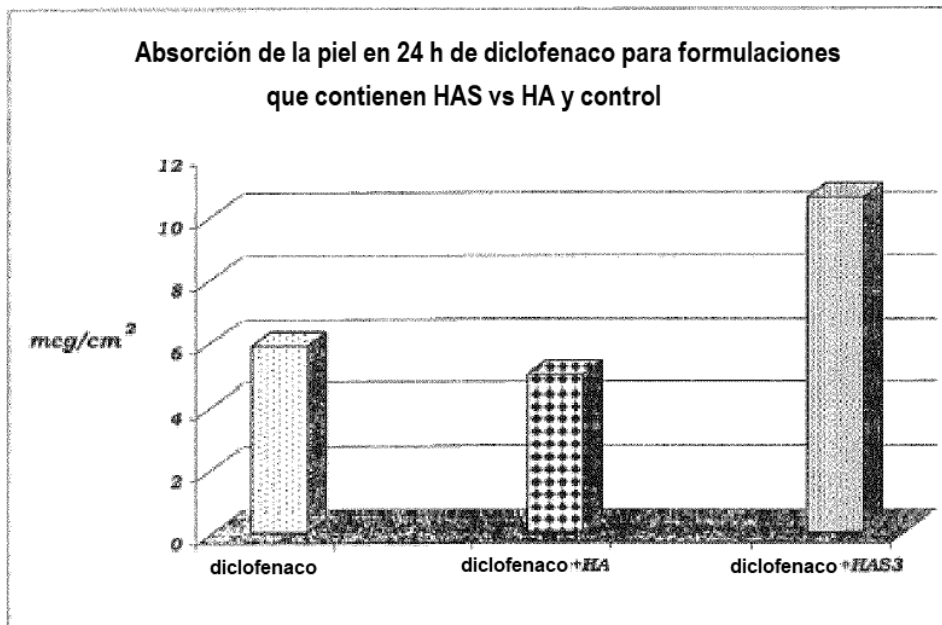


Fig. 14 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCION

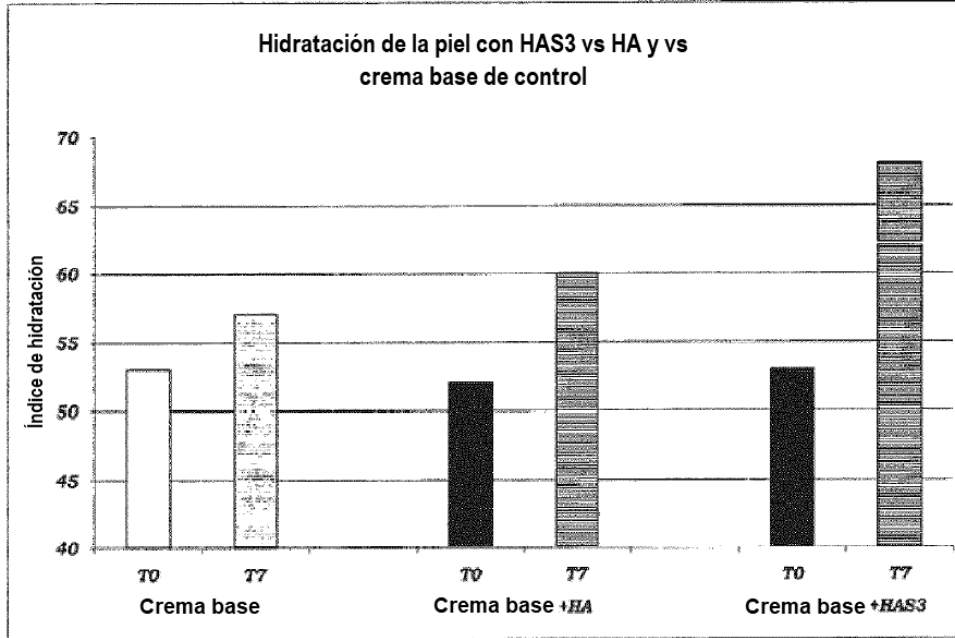


Fig. 15 NO DE CONFORMIDAD CON LA INVENCION

