



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 293 538**

(51) Int. Cl.:
C08B 37/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05708619 .1**

(86) Fecha de presentación : **25.02.2005**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1718679**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

(54) Título: **Ésteres de ácido hialurónico con reína, procedimiento para su preparación y composiciones que comprenden los mismos.**

(30) Prioridad: **26.02.2004 IT MI04A0347**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

(73) Titular/es: **LABORATOIRE MEDIDOM S.A.**
24, avenue de Champel
1206 Geneva, CH

(72) Inventor/es: **Pietrangelo, Antonello y**
Travagli, Valter

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Ésteres del ácido hialurónico con reína, procedimiento para su preparación y composiciones que comprenden los mismos.

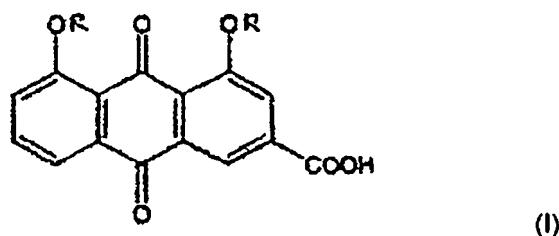
Campo de la invención

La presente invención se refiere a ésteres del ácido hialurónico (HA) con reína, más particularmente a un compuesto a base de ácido hialurónico, en el que los grupos alcohol del ácido hialurónico están esterificados con reína, a un procedimiento destinado a la preparación de dicho compuesto y a una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto.

Técnica anterior

La reína es un alcaloide derivado de la senna que posee propiedades antiinflamatorias y protectoras de los tejidos.

La reína, cuyo nombre químico es ácido 4,5-dihidroxi-9,10-dihidro-9,10-dioxo-2-antracen carboxílico, presenta la fórmula general siguiente (I)



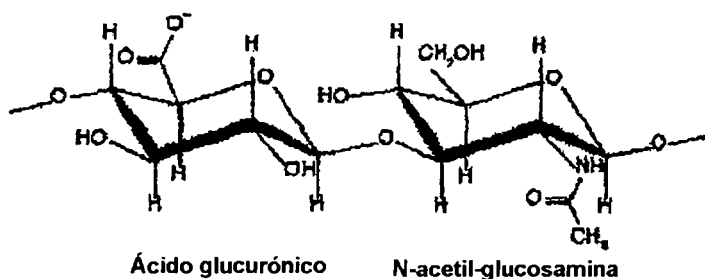
en la que R es H.

Esta sustancia se administra vía oral, generalmente como diacetilreína, un derivado de la fórmula general (I) anterior en la que cada uno de los grupos R es un grupo acetilo, posee una mayor biodisponibilidad y se utiliza principalmente en el tratamiento de la inflamación de las articulaciones.

Sin embargo, tanto la reína como la diacetilreína tienen el problema de poseer una considerable acción laxante, que puede incluso producir diarrea y por consiguiente su utilización es desaconsejable para los pacientes mayores y débiles.

Además, debido a la insolubilidad de la reína y de la diacetilreína en agua, estos efectos secundarios no se pueden evitar mediante la administración de estos principios activos por vía parenteral o por vía intraarticular.

El ácido hialurónico es un mucopolisacárido natural constituido por unidades de ácido D-glucurónico y N-acetil-glucosamina alternantes, tal como se representa de manera general a continuación



formando una cadena lineal con un peso molecular de hasta 13×10^6 Daltons.

El ácido hialurónico se encuentra en todos los tejidos blandos del organismo y en muchos fluidos fisiológicos tales como, por ejemplo, el líquido sinovial de las articulaciones y el humor vítreo de los ojos.

El ácido hialurónico se utiliza en muchas aplicaciones clínicas en forma de ácido o sal.

En particular, se utiliza con gran éxito en la inflamación de las articulaciones, administrándose mediante infiltración directa en la articulación en la que actúa mediante un doble mecanismo: por una parte reduciendo la inflamación de las articulaciones y por otra mediante el incremento de la viscosidad del líquido sinovial, beneficiando de este modo al cartílago, que en consecuencia está más lubricado.

También se aplica en oftalmología, en la que se utiliza por sus propiedades protectoras y antiinflamatorias y en la reparación de tejidos, en virtud de su actividad anabólica-reconstructora sobre el cartílago y la piel.

Sin embargo, es conocido que el ácido hialurónico sufre degradación.

Se ha informado sobre la degradación del ácido hialurónico, que produce la hidrólisis dependiendo de las condiciones de pH y la concentración de cationes [Uchiyama H., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:7753-7759 (1990); Yokita Y. y Okamoto A., *Polimer Degr. And Stab.* 48:269-273 (1995); Hawkins C.L. y Davies M.J. *Free Rad. Biol. Med.*, 24:1396-1410 (1998); Schiller J. *et al.*, *Current Med. Chem.*, 10:2123-2145 (2003).

Después de exhaustivos estudios, los presentes inventores descubrieron que el ácido hialurónico con grupos alcohol esterificados con reína posee, sorprendentemente, una estabilidad superior a la del ácido hialurónico y tiene además una mejor actividad farmacológica en comparación con la que se observa con el ácido hialurónico y la reína utilizados por separado.

Además, los presentes inventores han descubierto que el ácido hialurónico con grupos alcohol esterificados con reína se puede utilizar ventajosamente mediante administración local, evitando así los problemas asociados a la administración oral de reína.

La presente invención se ha basado en estos resultados.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto a base de ácido hialurónico, en el que los grupos alcohol del ácido hialurónico están esterificados con reína, como tales o en forma de derivado, o como una sal del mismo, que no solamente tiene una estabilidad superior a la del ácido hialurónico sino también una actividad farmacológica mejorada en comparación a lo observada con respecto al ácido hialurónico y reína utilizados por separado, y que además se puede utilizar mediante administración local, evitando de este modo los inconvenientes asociados con la administración oral de reína.

Según un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento destinado a la preparación del compuesto o una sal del mismo según el primer aspecto, que comprende hacer reaccionar el cloruro ácido de reína, como tal o en forma de un derivado, con ácido hialurónico.

Según un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal del mismo según el primer aspecto en combinación con un excipiente adecuado y/o diluyente.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un medicamento o a un dispositivo médico de uso humano o animal, que comprende una composición según el tercer aspecto y a la utilización de un compuesto o una sal del mismo según el primer aspecto con el fin de preparar un medicamento destinado al tratamiento de las enfermedades inflamatorias, o la reparación tisular, o la preparación de biomateriales.

En la siguiente descripción detallada se pondrán de manifiesto otras ventajas de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el espectro ¹H-RMN de la reína obtenido mediante saponificación del compuesto HA-Re de la presente invención,

la Figura 2 muestra el espectro IR de reína obtenido mediante la saponificación del compuesto HA-Re de la presente invención,

la Figura 3 muestra el análisis HPLC-MS de reína obtenido mediante la saponificación del compuesto de HA-Re de la presente invención,

la Figura 4 describe los resultados obtenidos en experimentos de RT-PCR que comparan el efecto del ácido hialurónico a la concentración farmacológica con los efectos del compuesto de HA-Re de la presente invención a la misma concentración,

la Figura 5 describe los resultados de experimentos de RT-PCR en los que el efecto reína a una dosis farmacológica se compara al efecto de una dosis similar del compuesto HA-Re de la presente invención,

la Figura 6 describe el espectro ¹³C-RMN de un compuesto de HA-Re según la presente invención, y

la Figura 7 muestra el espectro ^1H -RMN de un compuesto de HA-Re según la presente invención.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle.

La presente invención proporciona un compuesto a base de ácido hialurónico, en el que los grupos alcohol del ácido hialurónico se encuentran esterificados con reína, como tal o en forma de derivado o con una sal de la misma.

En la presente descripción, el compuesto de la presente invención se designará también como el “compuesto HA-Re”.

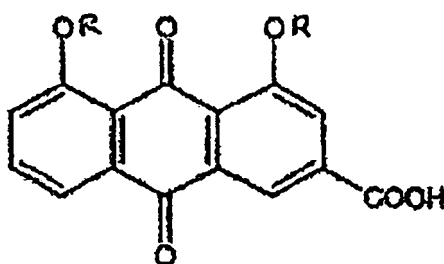
Se debe apreciar que en las presentes descripción y reivindicaciones, el término “reína” se refiere a reína como tal o en forma de derivado.

Las sales del compuesto HA-Re según la presente invención comprenden preferentemente las sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de magnesio, una sal de calcio u otras sales convencionales farmacéuticamente aceptables, más preferentemente la sal de sodio.

Según la presente invención, el termino “forma derivada” de reína comprende cualquier derivado de reína que es farmacológicamente activo *in vivo* y en el que el grupo ácido de reína está disponible para formar un enlace éster con los grupos hidroxilo del ácido hialurónico.

Resultan preferidos a los derivados de reína en los que dicha antraquinona esta disponible *in vivo*.

Los ejemplos de reína en forma derivada según la presente invención comprenden reína tal como se representa en la fórmula siguiente:



En la que R es independientemente cualquier grupo adecuado protector del hidroxilo, preferentemente un grupo acilo, por ejemplo un grupo acetilo, propionilo, butilo o pivaloilo, sin quedar limitado a estos.

En una forma de realización preferida de la presente invención reína se encuentra en forma de derivado, y más preferentemente como diacetilreína.

Según la presente invención, reína esterifica preferentemente por lo menos el 5% de los grupos de alcohol esterificables del ácido hialurónico, más preferentemente entre el 5 y el 50% y todavía más preferentemente entre el 5 y el 20%.

Resulta particularmente preferido un compuesto en el que reína esterifica el 10% de los grupos de alcohol esterificables del ácido hialurónico.

Dicho compuesto de HA-Re se puede preparar mediante un procedimiento según la presente invención, que comprende hacer reaccionar cloruro ácido de reína con ácido hialurónico, preferentemente en una cantidad tal que la proporción de entre los milimoles de cloruro de reína y los miliequivalentes de unidades de alcohol esterificado del ácido hialurónico sea superior al 5%, más preferentemente entre el 5 y el 50%, todavía más preferentemente entre el 5 y el 20%, y según una forma de realización particularmente preferida el 10%.

El procedimiento seleccionado tuvo en consideración la elección de disolventes dependiendo de la aceptabilidad de sus residuos (ICH-International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use).

Preferentemente, los procedimientos anteriormente mencionados según la presente invención comprenden las siguientes etapas:

- a) preparar una suspensión de ácido hialurónico y un disolvente no polar aprótico;
- b) añadir cloruro ácido de reína disuelto en la cantidad mínima de un disolvente no polar aprótico y un aceptor de iones de hidrógeno;
- c) agitar la mezcla a reflujo durante un tiempo suficiente para que ocurra la reacción de esterificación y
- d) evaporar el disolvente.

Los ejemplos de disolventes no polares apróticos que se pueden utilizar en la etapa a) comprenden ciclohexano, tetrahidrofurano, toluenos, diclorometano, n-hexano, más preferentemente ciclohexano.

El disolvente aprótico no polar que se puede utilizar para disolver el cloruro ácido de reína no está limitado, pero se debe seleccionar preferentemente para que sea el mismo que el utilizado en la etapa a).

Los ejemplos de aceptor de iones de hidrógeno que se puede añadir en la etapa b) comprenden piridina, trietilamina, más preferentemente Et_3N ;

El tiempo durante el que se deja la reacción a reflujo no está limitado, pero preferentemente debería ser de por lo menos 20 horas.

El ácido hialurónico que se puede utilizar con el fin de preparar el compuesto HA-Re según la presente invención preferentemente tiene un peso molecular comprendido entre 500.000 y 3.000.000 Da, más preferentemente de aproximadamente 600.000 Da.

El peso molecular del ácido hialurónico se puede determinar mediante procedimientos convencionales, por ejemplo mediante cromatografía de permeabilización de gel (GPC).

El ácido hialurónico que se utiliza en la preparación del compuesto HA-Re según la presente invención puede encontrarse comercialmente disponible (por ejemplo de Fidia Farmaceutici SpA- Abano T.PD) o se puede preparar, por ejemplo, mediante la extracción de crestas de gallo, mediante la fermentación de bacterias con una capa de mucina o mediante otros procedimientos convencionales (Proteoglycan Protocols, Humana Press, R.V. Iozzo Ed. Totowa, 2001).

El cloruro ácido de reína que se puede utilizar en el procedimiento de preparación del compuesto HA-Re según la presente invención se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- a') preparar una suspensión de reína en un disolvente no polar aprótico;
- b') añadir una cantidad de SOCl_2 suficiente para obtener una proporción molar entre SOCl_2 y reína superior a 10;
- c') agitar la reacción a reflujo en una atmósfera inerte durante el tiempo suficiente para que se forme el cloruro ácido de reína; y
- d') eliminar el disolvente y el exceso de SOCl_2 no reaccionado mediante destilación.

Los ejemplos de disolventes no polares apróticos que se pueden utilizar en la etapa a') comprenden ciclohexano, tetrahidrofurano, toluenos, diclorometano, n-hexano, preferentemente un disolvente de cloruro y más preferentemente CH_2Cl_2 .

El tiempo durante el que la reacción se deja a reflujo en la etapa c') no está limitado, preferentemente debe ser de por lo menos 3 horas.

La reína, como tal o en forma de derivado, que se puede utilizar en la etapa a') con el fin de preparar el cloruro ácido de reína puede ser de origen comercial (por ejemplo Aldrich) o se puede sintetizar según procedimientos convencionales [Nawa H *et al.*, *J. Org. Chem.* 26:979-981 (1961) y referencias publicadas en la presente memoria; Smith C.W. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 34:7447-7450 (1993); Gallagher P.T. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 35:289-292 (1994)].

Según una aplicación particularmente preferida, se purifica el compuesto de HA-Re de la presente invención obtenido utilizando el procedimiento según la presente invención.

La purificación preferentemente se realiza utilizando una membrana de diálisis.

En este caso, tal como se describirá en los ejemplos siguientes, se da preferencia a la utilización de una membrana de diálisis comercialmente disponible bajo la marca comercial "Slide-A-Lyzer 3.5K" (Pierce, Rockford, IL USA), según las instrucciones del fabricante.

5 Tal como se ha expuesto anteriormente, el compuesto HA-Re de la presente invención tiene una ventajosa elevada estabilidad, siendo estable por lo menos durante 36 mese a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 3,5^{\circ}\text{C}$ en disolución acuosa, preferentemente tamponada a pH 7,4 mediante, por ejemplo, una disolución salina de tampón fosfato preparada según la Farmacopea Oficial Italiana XI edición.

10 El compuesto HA-Re según la presente invención tiene propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes, reconstructivas y anabólicas para la piel y el cartílago.

La presente invención, por consiguiente, también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto HA-Re según la presente invención en combinación con un excipiente adecuado y/o diluyentes.

15 En particular, la composición farmacéutica según la presente invención puede ser un mecanismo médico y/o un medicamento para utilización humana o veterinaria.

20 La composición farmacéutica según la presente invención tiene preferentemente una formulación adecuada para la administración loco-regional.

Una composición farmacéutica particularmente preferida según la presente invención es una composición adecuada para su utilización vía infiltración intraarticular, vía administración oftálmica, por ejemplo, gotas para los ojos y ungüentos oftálmicos y vía administración tópica.

25 Preferentemente, la composición de la presente invención se encuentra en forma de dispersión acuosa.

30 Dicha dispersión preferentemente se encuentra en una disolución tamponante de pH fisiológico, más preferentemente a un pH de 7,4, para una disolución salina tamponada con fosfato preparada según la Farmacopea Oficial Italiana, edición XI.

Según otra forma de realización particularmente preferida, en la composición farmacéutica de la presente invención, el compuesto HA-Re o la sal del mismo según la presente invención se encuentra presente a una concentración comprendida entre 0,5% y 2% peso/vol., preferentemente a una concentración del 1% peso/vol.

35 Otro objetivo de la presente invención consiste en utilizar el compuesto HA-Re o la sal del mismo según la presente invención con el fin de preparar un medicamento destinado al tratamiento de las enfermedades inflamatorias, que preferentemente comprenden las enfermedades inflamatorias de las articulaciones, en particular la osteoartritis y la artritis reumatoide.

40 Otro objetivo adicional de la presente invención también es la utilización del compuesto HA-Re o una sal del mismo según la presente invención con el fin de preparar un medicamento para la reparación tisular, en la que dicho tejido es el cartílago o la piel.

45 Además, el compuesto HA-Re o la sal del mismo según la presente invención se pueden utilizar con el fin de preparar biomateriales, por ejemplo, gasas destinadas al tratamiento de heridas o quemaduras y matrices para el crecimiento de células que se utilizarán en el tratamiento de quemaduras y trasplantes.

50 La presente invención se ilustrará mediante los Ejemplos experimentales siguientes así como también mediante las Figuras.

Ejemplos

55 Ejemplo 1

Preparación de cloruro ácido de reína

60 Reína (proporcionada por Aldrich) (21,5 mg; 0,075 mmol) se cargó en un frasco de fondo redondo de 50 ml y a esto se añadió CH_2Cl_2 (15 ml). La suspensión adquirió un color naranja. A continuación, se añadió a la suspensión SOCl_2 (0,5 ml; 6,9 mmol).

65 La reacción se realizó con agitación a reflujo (50°C) en una atmósfera inerte (N_2). La mezcla de reacción se dejó a reflujo durante 3 horas y se volvió transparente de color amarillo naranja claro. Con el fin de eliminar el CH_2Cl_2 y el exceso de SOCl_2 no reaccionado, se añadió tolueno (aproximadamente 5 ml) y se destiló la mezcla a 500 mmHg, correspondiente a $6,6 \times 10^4$ Pa., por lo menos 4 veces con el fin de obtener 23 mg de cloruro ácido de reína crudo (rendimiento: cuantitativo). El producto se identificó mediante TLC, acetato de etilo.

Ejemplo 2

Preparación del compuesto HA-Re

- 5 Se suspendió ácido hialurónico (proporcionado por Fidia Farmaceutici SpA-Abano T. PD; peso molecular medio aproximado 600.000 Da) (277,3 mg; $4,6 \times 10^{-4}$ mmol; correspondiente a 0,75 meq. de unidades de alcohol primario esterificable) en ciclohexano (20 ml). Se añadió cloruro ácido de reína preparado tal como se describió en el Ejemplo 1 (21,5 mg, 0,075 mmol) disuelto en una cantidad mínima de CH_2Cl_2 . A continuación, se añadieron Et_3N (3 ml). La suspensión adquirió un color rojo. La reacción se realizó con agitación a reflujo (70°C) en una atmósfera inerte (N_2).
- 10 Después de un período de tiempo corto, la suspensión adquirió un color rojo-naranja, que se oscureció después de aproximadamente tres horas. Después de 20 horas, la reacción se paró y se evaporó el disolvente a presión reducida (650 mm Hg, correspondiente a $8,7 \times 10^4$ Pa) a sequedad, produciendo el compuesto HA-Re en forma de un precipitado amarillo claro.

15

Ejemplo 3

*Purificación del compuesto HA-Re*20 a) *Preparación de la muestra*

- Se añadió disolución salina tamponada con fosfato (5 ml) pH 7,4 al compuesto HA-Re (0,1019 g) obtenido tal como se describió en el Ejemplo 2. Se obtuvo un sistema de dos fases y la disolución adquirió un color amarillo naranja a la vez que el residuo constituyó una masa de color amarillo marrón de consistencia gelatinosa. Después de
- 25 esperar por lo menos 24 horas, se obtuvo un sistema coloidal viscoso de color marrón.

b) *Purificación*

- Se dejó hidratar una membrana de diálisis "Slide-A-Lyser® 3,5K" (Pierce, Rockford, IL USA) de modo adecuado
- 30 en una disolución salina tamponada con fosfato a pH 7,4. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se introdujo la cantidad adecuada del compuesto HA-Re que se debía purificar. La diálisis se realizó durante 2 horas contra un tampón de fosfato a pH 7,4 (después de solamente 20 minutos la disolución de tampón pareció adquirir un color ligeramente amarillo). La operación se repitió por lo menos tres veces hasta que la disolución de tampón permaneció incolora, demostrando ausencia de absorción en el espectro visible mediante ensayos de absorción. El compuesto HA-
- 35 Re purificado se recuperó de la membrana de diálisis. La pureza del compuesto HA-Re purificado obtenido de este modo fue del 99,8%.

Ejemplo 4

40

*Análisis del compuesto HA-Re de la presente invención obtenido*1) *Ensayo utilizando un espectrofotómetro UV-VIS*

- 45 La concentración de reína en el compuesto HA-Re purificado obtenido según el Ejemplo 3 se valoró mediante la lectura en el espectrofotómetro a 430 nm con base en una calibración "robusta" en el intervalo comprendido entre 10^{-5} y 10^{-3} ($R^2 = 0,9999$). Se seleccionó esta longitud de onda debido a que el ácido hialurónico absorbe en el UV, lo que dificulta la determinación cuantitativa de reína. Sobre la base de la lectura espectrofotométrica, se encontró que el rendimiento de la reacción de esterificación, basado en reína, fue del 58%.

50

Considerando el Ejemplo 2, la cantidad de reína utilizada en la reacción se seleccionó con el fin de esterificar un máximo del 10% de los grupos de alcohol primario esterificables del ácido hialurónico. Debido a que el rendimiento de la reacción de esterificación basado en reína se encontró que fue del 58%, se puede calcular que se esterificó el 5,8% de los grupos alcohol esterificables del ácido hialurónico.

55

2) *Análisis ^1H -RMN*

- El espectro ^1H -RMN del compuesto HA-Re obtenido en el Ejemplo 2 se realizó en una disolución tampón deuterada utilizando un espectrómetro Varian VRX300. Sin embargo, surgieron problemas cuando se interpretó este
- 60 espectro ya que el porcentaje de reína que reacciona con el ácido hialurónico no permitió identificar el anillo aromático. Teniendo en consideración la pobre solubilidad de la reína en un ambiente acuoso y considerando que la esterificación es una reacción reversible, se realizó la saponificación, es decir hidrólisis básica, con el fin de obtener reína a partir del compuesto HA-Re. El compuesto de saponificación obtenido se precipitó. Se realizó un espectro ^1H -RMN del compuesto de saponificación obtenido en dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando el
- 65 espectrómetro Varian VRX300. El espectro obtenido, mostrado en la Fig. 1, coincide completamente con el de reína.

3) *Análisis I.R.*

Se realizó un espectro I.R. en Nujol del compuesto obtenido de la saponificación del compuesto HA-Re de la presente invención (utilizando BX FT-IR System, Perkin Elmer). Tal como se muestra en la Figura 2, el espectro
5 obtenido coincide con el de reína pura.

4) *HPLC-MS*

Se realizó un análisis HPLC-MS (utilizando el equipo Agilent 1100, serie LC/MSD) sobre el compuesto obtenido
10 de la saponificación del compuesto HA-Re obtenido de la presente invención, utilizando como fase móvil una mezcla de metanol/agua 80:20 con 2,5% ácido fórmico, a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Tal como se puede observar en la Fig. 3, la masa del compuesto corresponde a la de reína.

15 Ejemplo 5

*Valoración de las características tecnológicas del compuesto HA-Re de la presente invención*1) *Valoración de la estabilidad a la hidrólisis*

20 El compuesto HA-Re de la presente invención obtenido en el Ejemplo 2 no purificado mediante diálisis se almacenó durante más de seis meses en estado seco en viales, en la oscuridad y a temperatura ambiente (22°C). A continuación, la muestra se purificó mediante diálisis tal como se describe en el Ejemplo 3 y se valoró la concentración de reína utilizando un espectrofotómetro UV-VIS. Se encontró que la concentración fue igual a la obtenida del producto sintetizado inmediatamente. (Mejor: “Se encontró que la concentración fue igual a la obtenida inmediatamente después de la síntesis del producto”) Los resultados experimentales, por consiguiente, demuestran que en seco, no se observa degradación. Además, el compuesto HA-Re de la presente invención producido tal como se describe en el Ejemplo 2 y purificado mediante diálisis tal como se describe en el Ejemplo 3 se almacenó durante 6 meses en una disolución del 2% de tampón fosfato pH 7, 4, en viales, en la oscuridad y a una
30 temperatura de 4°C. En la muestra se encontraron cuerpos extraños, debido a la utilización de materiales no estériles y al hecho de que no se utilizaron preservantes. La muestra se sometió de nuevo a diálisis utilizando el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 3, durante por lo menos cuatro días. Mediante un ensayo UV-VIS, no se pudo encontrar nada de reína liberada en las múltiples disoluciones tampón utilizadas en la diálisis. Por consiguiente, también en este caso se demostró que el compuesto es químicamente estable ya que no se
35 encontró reína liberada del compuesto HA-Re, por lo menos en los términos que permiten su demostración utilizando los procedimientos analíticos actuales. Por consiguiente, incluso en disolución, no se observó degradación por hidrólisis.

Los resultados obtenidos hacen posible afirmar que el compuesto HA-Re según la presente invención es estable
40 en disolución acuosa durante por lo menos 24 meses en condiciones de refrigeración (a 4°C ± 0,5°C). Esta afirmación proviene de la ausencia de detección de degradación por hidrólisis.

Además, con el fin de descartar la posibilidad de que se produzca degradación hidrolítica durante la reacción de esterificación con reína, se realizó un ensayo en blanco de dicha reacción. En particular, se utilizaron las mismas condiciones que en la reacción de enlace de reína al ácido hialurónico, pero en ausencia de reína. En particular, se añadió ácido hialurónico (100 mg) a una mezcla de ciclohexano (10 ml), diclorometano (1 ml) y trietilamina (1 ml) y se realizó la reacción a reflujo (70°C) en una atmósfera inerte (N₂) durante 24 horas; una vez transcurrido dicho tiempo, se eliminaron los disolventes de la reacción bajo una atmósfera de nitrógeno. El compuesto obtenido fue mucho menos soluble en agua que el ácido hialurónico en estado nativo y se caracterizó por una viscosidad no determinable después de 24 horas de dispersión. Esto quiere decir que la despolimerización se puede eliminar, ya que ello habría resultado en su solubilidad en agua y por consiguiente a una reducción de la viscosidad.

Finalmente, se hizo una comprobación de la estabilidad a la hidrólisis durante la esterilización del compuesto
55 HA-Re de la presente invención obtenido en el Ejemplo 3. Tal como se expuso anteriormente, se descubrió que la utilización de materiales no estériles y el hecho de que no se utilizaron preservantes conducen a la presencia de cuerpos extraños en las muestras del compuesto de la presente invención. En particular, se preparó una disolución del 1% de compuesto HA-Re de la invención, purificado mediante una membrana de diálisis, en una disolución salina tamponada con fosfato a pH 7,4. Dada la evidencia experimental que demuestra que el ácido hialurónico es una molécula sensible al calor [*Biomaterials* 23:4503-4513 (2002)], la muestra así obtenida se esterilizó mediante la utilización de vapor saturado a presión en un autoclave durante 20 minutos a 121°C. A continuación, la muestra se sometió otra vez a diálisis con una membrana de diálisis con el fin de evaluar la presencia de reína en el líquido de diálisis; no se encontraron trazas de reína. Estos resultados permiten concluir que la muestra es estable a la hidrólisis durante la esterilización en caliente.

65

2) *Análisis de las características reológicas y “inyectabilidad”*

La inyectabilidad del compuesto HA-Re de la presente invención se analizó en comparación a la de un ácido hialurónico de alto y bajo peso molecular.

En particular, se prepararon las siguientes tres muestras:

- a) una disolución al 1% peso/vol. de ácido hialurónico de elevado peso molecular (peso molecular medio de aproximadamente 1.200.000) en disolución salina tamponada con fosfato pH 7,4;
- b) una disolución del 1% peso/vol. de ácido hialurónico de bajo peso molecular (peso molecular medio aproximado de 600.000) en disolución salina tamponada con fosfato pH 7,4;
- c) una disolución del 1% peso/vol. del compuesto HA-Re de la presente invención en disolución salina tamponada con fosfato pH 7,4.

La viscosidad de las muestras se midió utilizando un VISCOMATE MODELO VM-10A (vial de vidrio: 3 ml; en ausencia de agitación; temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) obteniéndose los siguientes valores:

- a) $\eta = 78,4 \text{ mPa}\cdot\text{s}$
- b) $\eta = 64,8 \text{ mPa}\cdot\text{s}$
- c) $\eta = 47,9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$

Los resultados obtenidos demuestran que el compuesto HA-Re de la presente invención tiene una mejor inyectabilidad que el ácido hialurónico en estado nativo tanto de elevado como de bajo peso molecular. Ello es debido a que una disolución del 1% peso/vol. del compuesto HA-Re de la presente invención tiene una menor viscosidad que una disolución del 1% peso/vol. de ácido hialurónico de bajo peso molecular, que a su vez tiene menor viscosidad que una disolución al 1% peso/vol. de ácido hialurónico de elevado peso molecular.

La reducción de viscosidad que se observó, una vez demostrado que no se producían reacciones de despolimerización del ácido hialurónico después de la reacción de esterificación, se puede atribuir a la interacción covalente entre la reína y ácido hialurónico.

Ejemplo 6

Valoración de la actividad farmacológica in vitro del compuesto HA-Re de la presente invención

Se obtuvieron biopsias de cartílago normal de 5 individuos (3 machos y 2 hembras, edad media: $59,3 \pm 5,1$ años) durante cirugías de cadera o fémur resultantes de fracturas traumáticas. Los sujetos seleccionados para el estudio no presentaron síntomas bioquímicos o clínicos de inflamación o enfermedad en las articulaciones y presentaron cartílago normal tanto a nivel macroscópico como microscópico.

El cartílago se recogió en condiciones estériles y se trató inmediatamente con el fin de aislar los condriocitos. Las muestras primero se limpiaron de toda adherencia de tejido muscular, conectivo o hueso subcondrial, a continuación se fragmentaron en pedazos de un tamaño comprendido entre 1 y 3 mm³ y se enjuagaron con disolución salina tamponada con fosfato pH 7,2 (PBS). A continuación se liberaron los condriocitos sueltos mediante repetidas digestiones enzimáticas de entre 60 y 70 minutos a 37°C con 0,25% tripsina, 400 U/ml colagenasa I, 1000 U/ml colagenasa II y 1 mg/ml hialuronidasa. Las células se reunieron, se lavaron extensamente en PBS y se sembraron a una densidad elevada en placas de 35 mm (45×10^3 células/cm²). El medio de cultivo fue un medio de Ham F12 modificado por Coom suplementado 10% FCS (Mascia Brunelli, Milano, Italia). La persistencia de fenotipo de condriocito se estimó mediante la detección de colágeno tipo II después de digerir con pepsina el sobrenadante del cultivo. La viabilidad celular se valoró mediante el ensayo de exclusión de Trypan-Blue. La duplicación celular se determinó a intervalos regulares mediante tripsinización del cultivo y la cuantificación del número de células. Los experimentos de estimulación se realizaron cuando los cultivos primarios alcanzaron la confluencia (pase 0). A continuación, las células se cultivaron durante 2 días en presencia de ácido ascórbico (50 µg/ml) y se incubaron a partir de entonces durante 20 horas en ausencia o presencia de (rh)IL-1β (5 ng/ml), con o sin la adición de múltiples concentraciones de ácido hialurónico (HA), el compuesto de la presente invención (HA-Re) o reína. Se ha informado sobre los efectos beneficiosos que tanto el ácido hialurónico como la reína presentan con respecto a la osteoartritis debido a su capacidad para inhibir la actividad de las metaloproteinasas (MMP) implicadas en el catabolismo del cartílago.

Con el fin de estudiar el efecto de múltiples compuestos sobre la expresión de MMP en condriocitos humanos se realizaron ensayos de Real Time PCR. Se extrajo ARN total de condriocitos humanos cultivados utilizando Trizol (Gibco BRL) según las instrucciones del fabricante. Las cadenas de ADNc se sintetizaron utilizando un equipo de síntesis Superscript First-Strand (Gibco BRL) con 1 µg de ARN total. Los cebadores fueron como sigue:

ES 2 293 538 T3

MMP-1 (colagenasa) Sentido: 5'-CTGAAGGTGATGAAGCAGCC-3'

Antisentido: 5'-AGTCCAAGAGAATGGCCGAG-3' (tamaño de fragmento 428 bp);

5 MMP-3 (Stromelisin) Sentido: 5'-CCTCTGATGGCCCAGAATTGA-3',

Antisentido: 5'-GAAATTGGCCACTCCCTGGGT-3' (tamaño de fragmento 440 bp);

10 Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH),

Sentido: 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3';

Antisentido: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCA-3' (tamaño de fragmento 598 bp)

15 La amplificación se realizó a entre 60 y 64°C mediante 45 ciclos en un iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Hercules, CA) y los datos se analizaron utilizando el iCycler iQ Optical System Software. La expresión relativa en cada muestra se calculó mediante un procedimiento matemático a base de la eficacia de la PCR de real-time utilizando como referencia GAPDH ARNm. Todas las muestras se ensayaron por triplicado. Después de 45 ciclos de amplificación, se calcularon automáticamente los valores de los umbrales de los ciclos y se calcularon los fentogramos de ADNc a partir de curvas estándar comprendiendo un intervalo de cuatro órdenes de magnitud. Las curvas estándar tanto de MMP como de GAPDH comprendieron entre 1 y 1.000 fentogramos por 25 µl de reacción. Se calcularon las proporciones de cantidades iniciales de MMP a GAPDH. Las diferencias estadísticas de los resultados entre las múltiples variables experimentales y los controles relevantes se analizaron utilizando el ensayo *t* de Student.

25 Las Figuras 4 y 5 reportan los resultados obtenidos en los experimentos de RT-PCR.

Se ensayaron todas las muestras por triplicado. En cada experimento, el cambio en la expresión de ARNm de MMP se expresó como el número de veces de incremento en comparación con células no tratadas. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos. Se utilizó el ensayo *t* pareado de Student con el fin de determinar la significancia de los efectos de los múltiples tratamientos. También se reportan las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento y control:

* = $p < 0,01$; ** = $p < 0,001$ (ensayo *t* de Student).

35 El tratamiento con IL-1 produjo un incremento dramático de tanto MMP1 como de MMP3 que concuerda con los datos en la literatura. En los experimentos descritos en la Figura 4 se comparó el efecto de HA a la concentración farmacológica generalmente descrita en la literatura (1 mg/ml) con el efecto compuesto HA-Re de la presente invención a la misma concentración (1 mg/ml). Se obtuvieron resultados similares a las concentraciones de HA comprendidas entre 0,1 y 1,5. La exposición de condriocitos humanos a dosis farmacológicas de HA (1 mg/ml) evitó efectivamente la inducción de MMP1 y MMP2 por IL-1 (Figuras 4A y B). Sorprendentemente, dosis similares del compuesto HA-Re de la presente invención produjeron un efecto protector todavía más dramático bajando la expresión de MMP a nivel basal a pesar de la exposición a IL-1. La Figura 5 describe los resultados de experimentos en los que el efecto de reína a dosis farmacológica (10 µM) se compara a una dosis similar de HA-Re. También parece que el compuesto HA-Re de la presente invención es más potente que la Re sola en lograr la regulación negativa de la expresión de MMP inducida por IL-1.

Ejemplo 7

50 Se realizó una síntesis adicional de HA-Re según la presente invención tal como en el Ejemplo 2, con la excepción de que se utilizaron 20 mg de ácido hialurónico y 23 mg de cloruro ácido de reína, correspondiendo a concentraciones estequiométrica de reína y ácido hialurónico basadas en los grupos de alcohol primario del ácido hialurónico.

55 La Figura 6 muestra el espectro ^{13}C -RMN del compuesto HA-Re de la presente invención así obtenido, en el que aparece claramente el pico característico a 175 ppm, específico de la función éster.

La Figura 7 muestra el espectro ^1H -RMN del compuesto HA-Re de la presente invención así obtenido, en el que aparecen claramente los picos característicos entre 7 y 8 ppm, específicos de los anillos aromáticos de reína.

60 Por consiguiente, resulta evidente a partir de estos dos espectros RMN que en el compuesto HA-Re según la presente invención, reína esterifica los grupos alcohol del ácido hialurónico.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto a base de ácido hialurónico, en el que los grupos alcohol del ácido hialurónico están esterificados con reína, como tal o en forma derivada o una sal del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que la reína esterifica por lo menos el 5% de los grupos alcohol esterificables del ácido hialurónico.

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que la reína esterifica del 5% al 50% de los grupos alcohol esterificables del ácido hialurónico.

4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que la reína esterifica del 5% al 20% de los grupos alcohol esterificables del ácido hialurónico.

5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que reína esterifica el 10% de los grupos alcohol esterificables del ácido hialurónico.

6. Sal sódica del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Procedimiento para la preparación de un compuesto o una sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende hacer reaccionar cloruro ácido de reína, como tal o en forma derivada, con ácido hialurónico.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el cloruro ácido de reína y el ácido hialurónico se encuentran en una cantidad tal que una proporción en porcentaje entre los milimoles de cloruro ácido de reína y los miliequivalentes de las unidades de alcohol esterificable del ácido hialurónico es de por lo menos el 5%.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha proporción en porcentaje está en el intervalo comprendido entre 5% y 50%.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha proporción en porcentaje está en el intervalo comprendido entre 5% y 20%.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha proporción en porcentaje es del 10%.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, que comprende las etapas siguientes:

- a) preparar una suspensión de ácido hialurónico en un disolvente aprótico no polar;
- b) añadir cloruro ácido de reína disuelto en un disolvente aprótico no polar y un aceptor de iones de hidrógeno;
- c) dejar la mezcla agitar a reflujo durante un tiempo suficiente para que tenga lugar la reacción de esterificación; y
- d) evaporar el disolvente.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho disolvente aprótico polar de la etapa a) es el ciclohexano.

14. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, en el que en la etapa b), dicho aceptor de iones de hidrógeno es NEt_3 .

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que en la etapa c), la reacción se deja a reflujo durante por lo menos 20 horas.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, en el que el cloruro ácido de reína se obtiene mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- a') preparar una suspensión de reína en un disolvente no polar aprótico;
- b') añadir una cantidad de SOCl_2 con el fin de obtener una proporción molar entre SOCl_2 y reína superior a 10;
- c') dejar la reacción agitar a reflujo en una atmósfera inerte durante un tiempo suficiente para que se forme el cloruro ácido de reína; y
- d') eliminar el disolvente y el exceso de SOCl_2 no reaccionado mediante destilación.

ES 2 293 538 T3

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicho disolvente no polar aprótico de la etapa a') es un disolvente de cloruro.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dicho disolvente de cloruro es CH_2Cl_2 .

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que en la etapa c'), la reacción se deja a reflujo durante por lo menos 3 horas.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, que comprende además una etapa final de purificación.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha etapa de purificación se realiza utilizando una membrana de diálisis.

22. Composición farmacéutica que comprende el compuesto o una sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en combinación con excipientes y/o diluyentes adecuados.

23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22, que presenta una formulación adecuada para la administración loco-regional.

24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, que es adecuada para la administración vía infiltración intraarticular.

25. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, que es adecuada para la administración oftálmica.

26. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, que es adecuada para la administración tópica.

27. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en forma de dispersión acuosa.

28. Composición farmacéutica según la reivindicación 27, en la que dicha dispersión está en una disolución tampón que presenta un pH de 7,4.

29. Composición farmacéutica según la reivindicación 27 ó 28, en la que el compuesto se encuentra a una concentración comprendida entre el 0,1% y el 2% peso/volumen.

30. Composición farmacéutica según la reivindicación 29, en la que el compuesto se encuentra en una concentración del 1% peso/volumen.

31. Medicamento destinado a la utilización veterinaria o en humanos, que está constituido por una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 30.

32. Dispositivo médico para su utilización veterinaria o en humanos, constituido por una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 30.

33. Utilización de un compuesto o una sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las enfermedades inflamatorias.

34. Utilización según la reivindicación 33, en la que dichas enfermedades inflamatorias son enfermedades inflamatorias de las articulaciones.

35. Utilización de un compuesto o una sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento destinado a la reparación tisular, en la que dicho tejido es cartílago o piel.

36. Utilización de un compuesto o una sal del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de biomateriales.

Figura 1

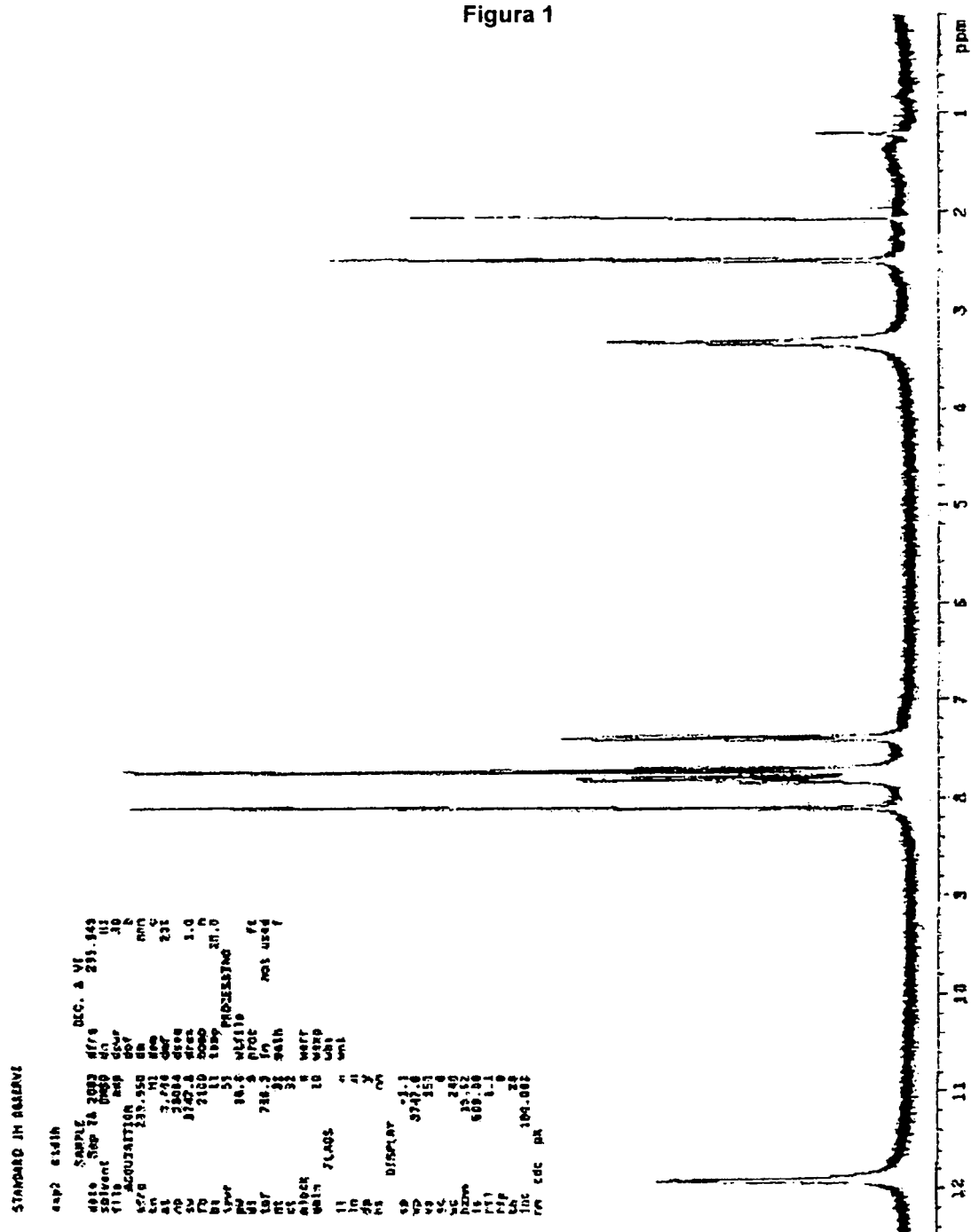


Figura 2

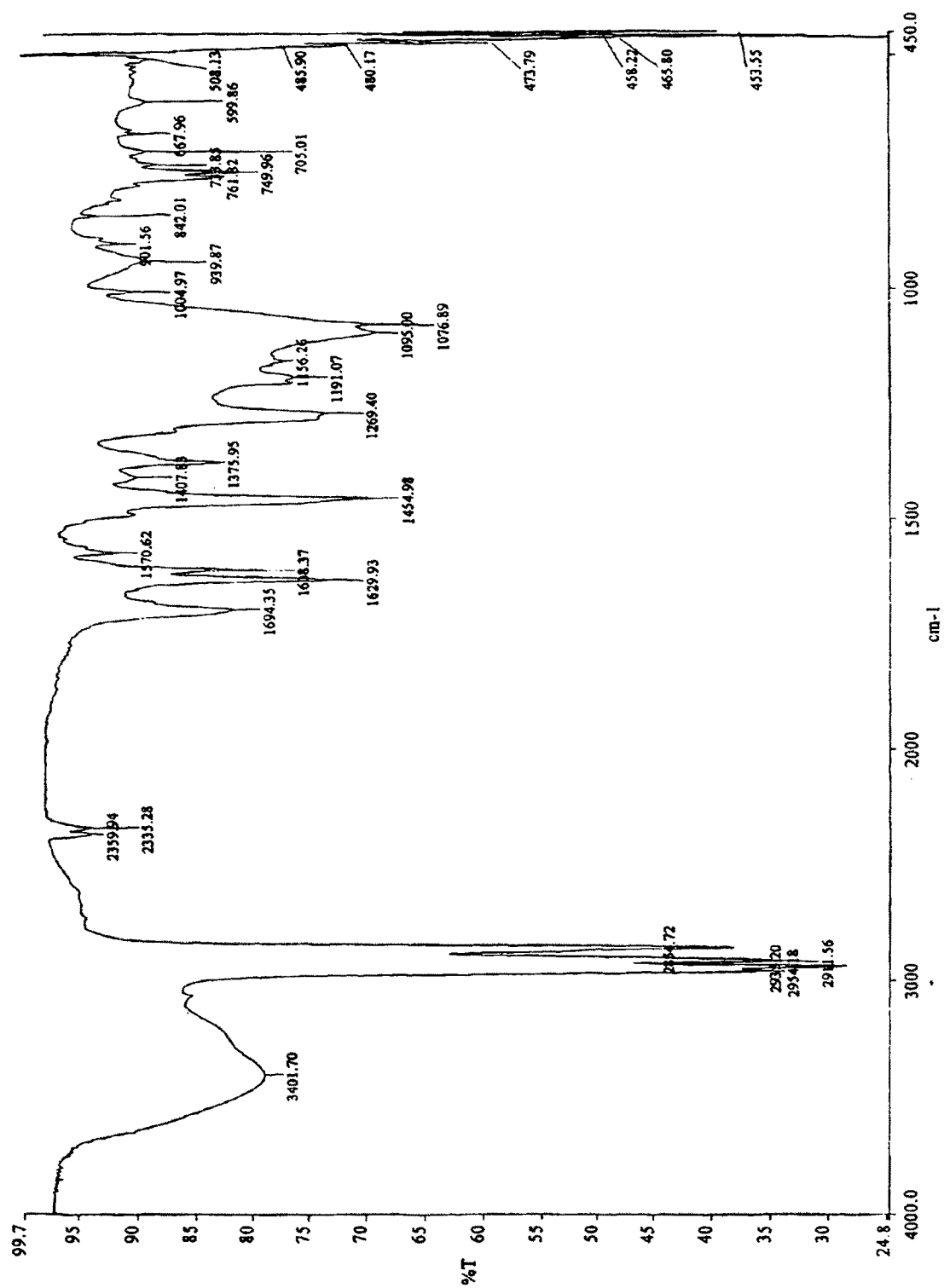


Figura 3

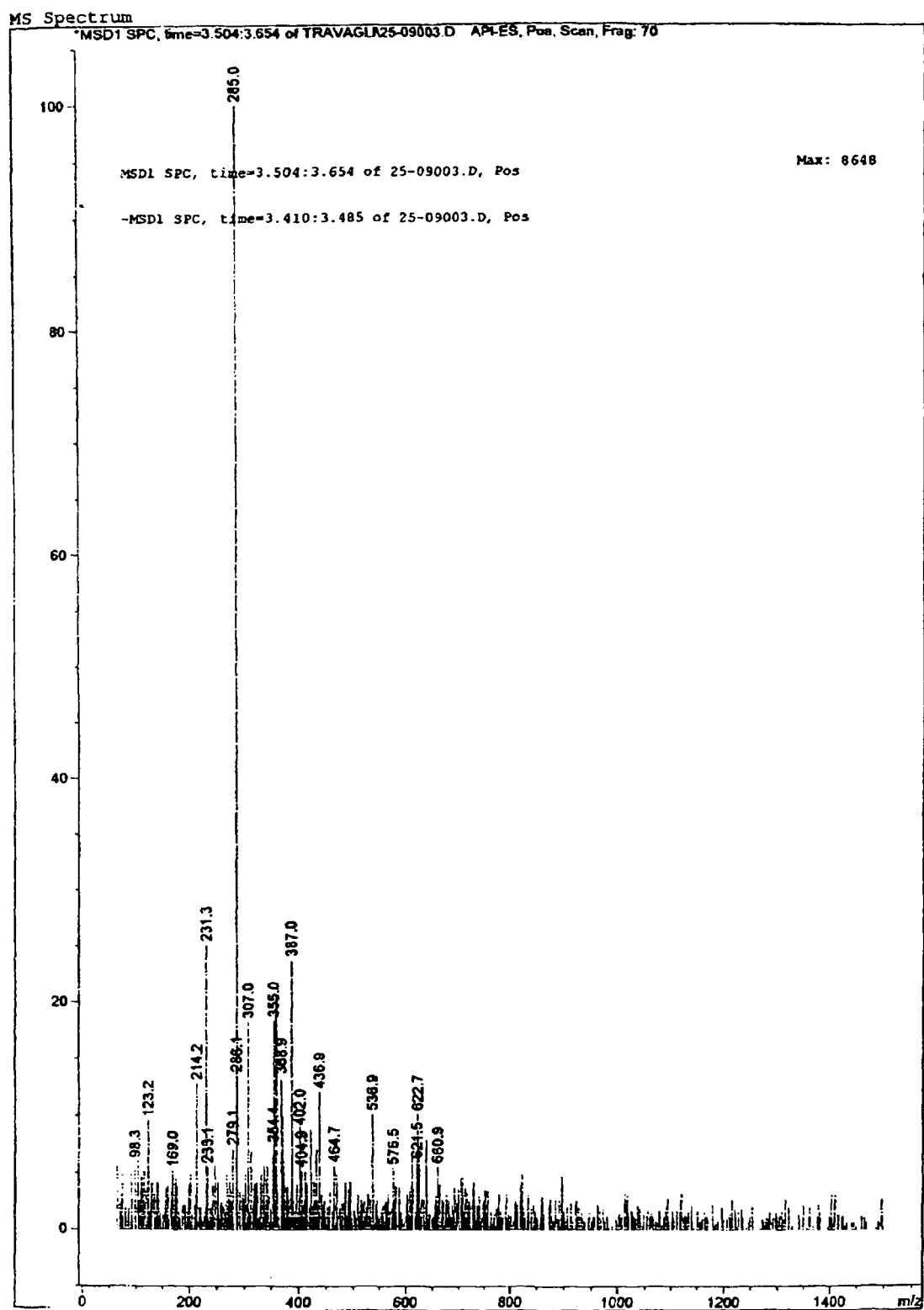


Figura 4

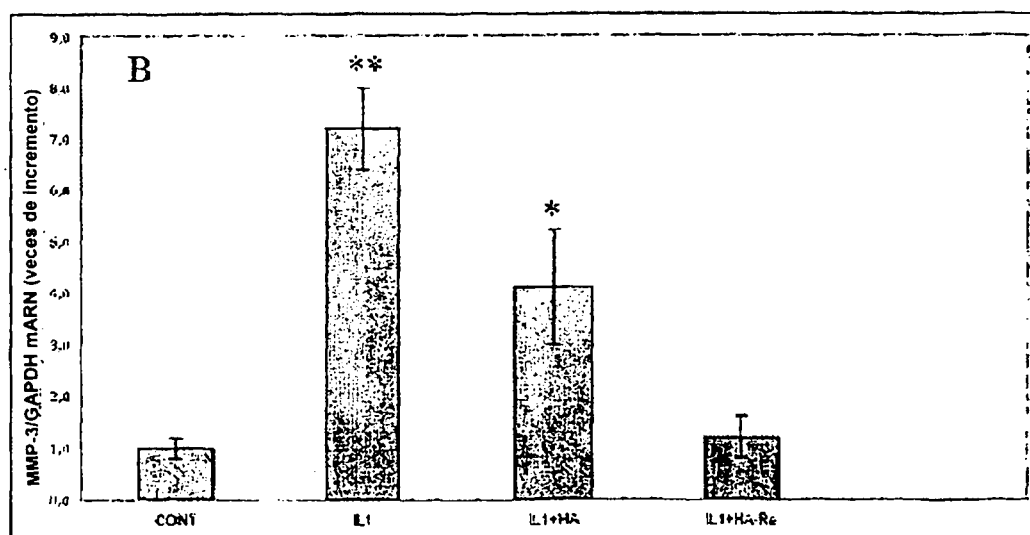
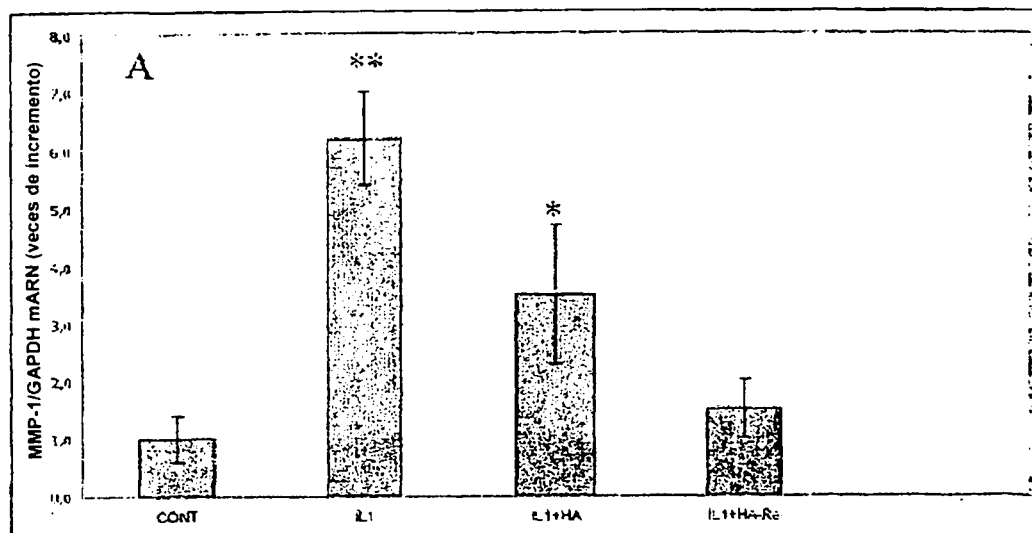


Figura 5

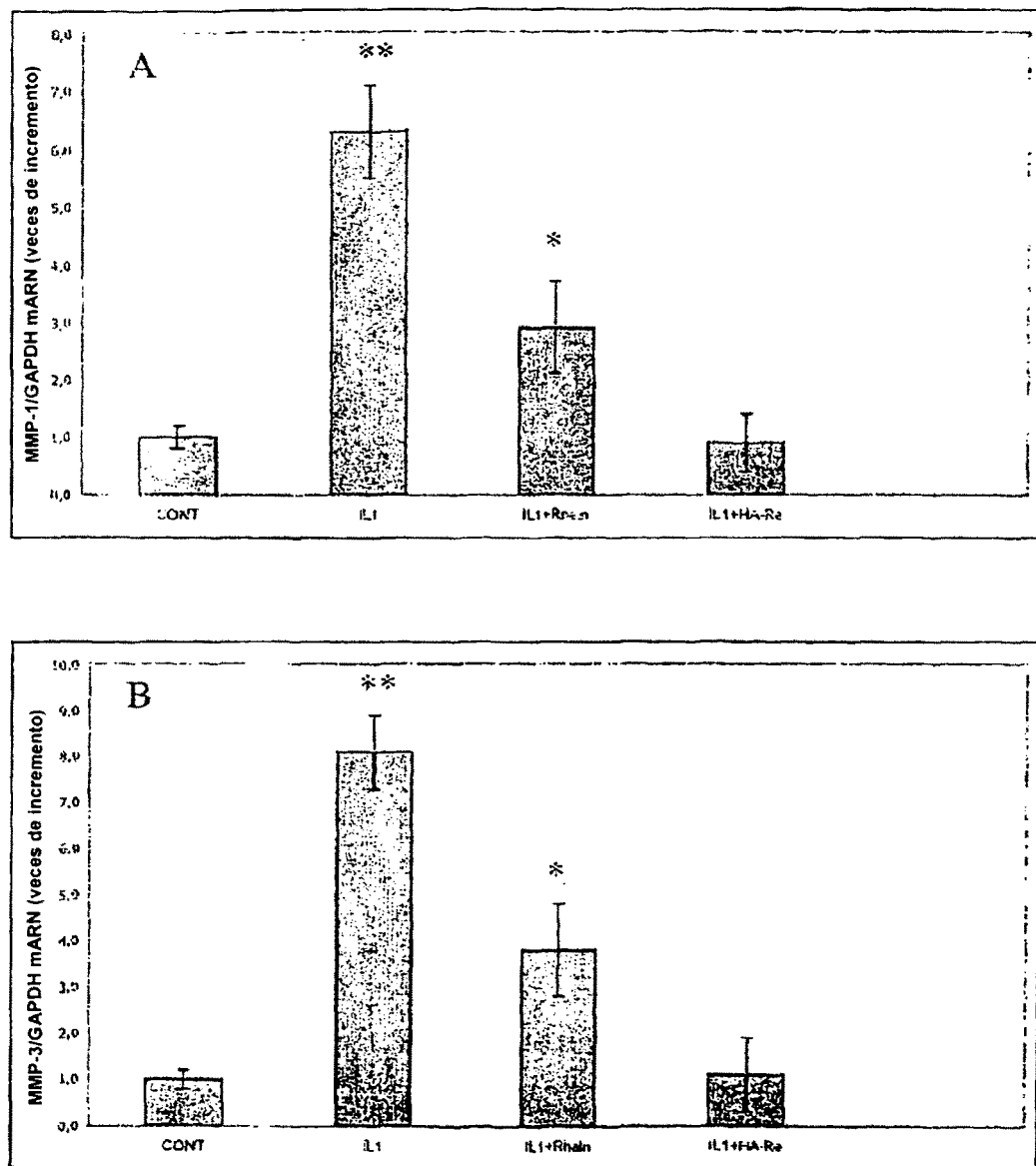


Figura 6

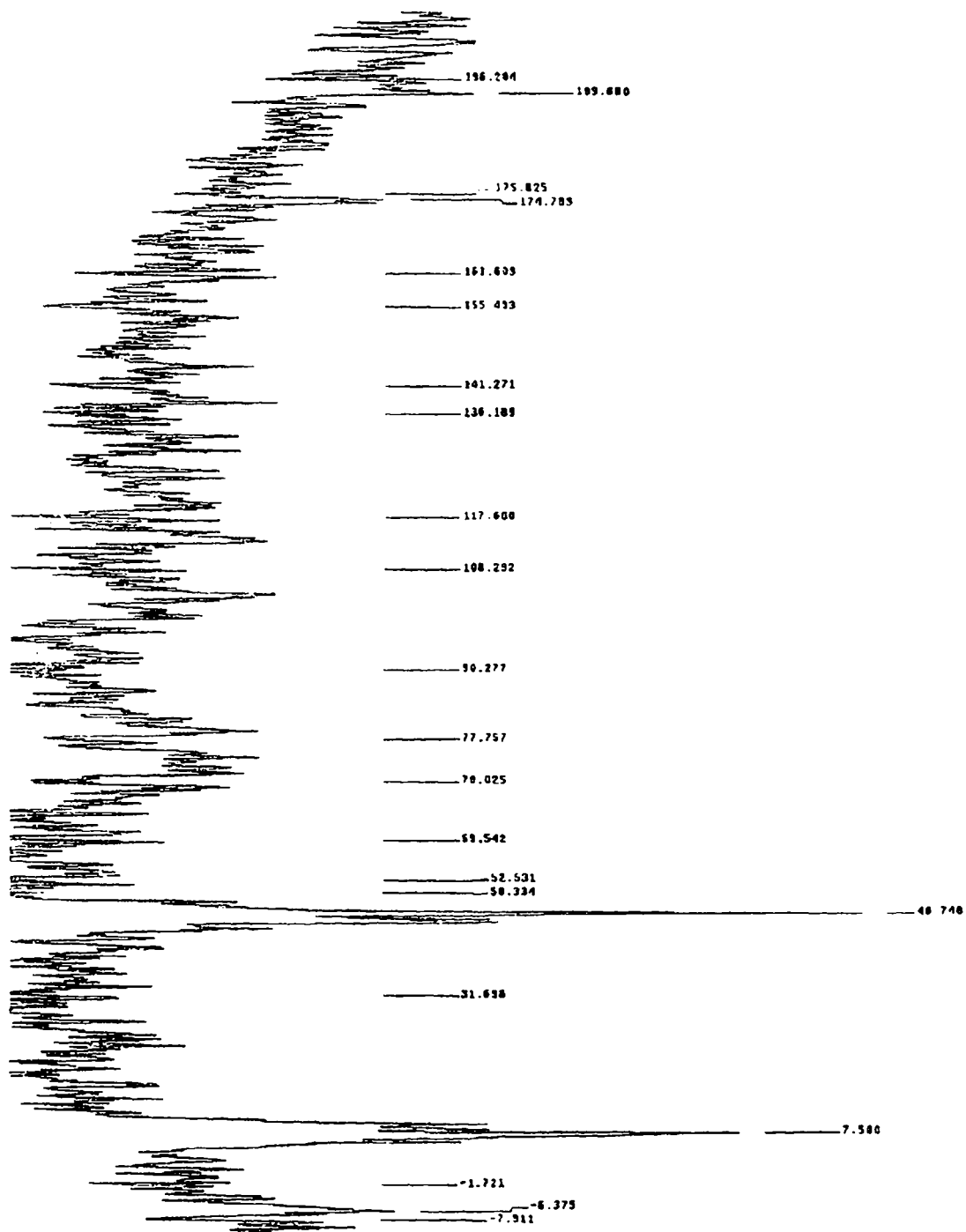


Figura 7

