

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 097**

51 Int. Cl.:

A61K 47/61 (2007.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2018** **PCT/IB2018/057697**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2019** **WO19069258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2018** **E 18796748 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023** **EP 3691691**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen un conjugado de ácido hialurónico y carnosina y uso relacionado**

30 Prioridad:

03.10.2017 IT 201700110784

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SCHIAVINATO, ANTONELLA;
GRECO, VALENTINA;
MESSINA, LUCIANO;
VACCARO, SUSANNA;
RIZZARELLI, ENRICO y
SCIUTO, SEBASTIANO

74 Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

ES 2 971 097 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 que contienen un conjugado de ácido hialurónico y carnosina y uso relacionado

- 5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen ácido hialurónico y carnosina y a su uso relacionado.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La **osteoartritis** (OA) es una patología gravemente incapacitante caracterizada por la erosión progresiva de los cartílagos articulares debido a la degradación de la matriz y la pérdida de los principales componentes celulares cartilaginosos: los condrocitos.

- 15 La etiología aún es parcialmente desconocida, sin embargo, resultados experimentales recientes han demostrado que el desequilibrio mecánico que puede afectar a la articulación en su complejidad puede ser también la causa inicial de la aparición de la patología antes mencionada. De hecho, una carga excesiva y/o incorrecta de las articulaciones puede provocar una respuesta de los condrocitos que se expresa en la síntesis de aquellas enzimas responsables de la degradación del propio cartílago. Estas enzimas proteasas se denominan Metaloproteasas (MMP) y son sintetizadas por los condrocitos cuando son estimuladas por citoquinas proinflamatorias, como la IL-1, IL-6 y TNF- α , que se producen y liberan en la cavidad articular sobre todo debido a la aparición de una patología inflamatoria. Estas citoquinas también estimulan la síntesis de niveles elevados de óxido nítrico (responsable de la muerte por apoptosis de los condrocitos) y, además, inhiben la síntesis de proteoglicanos (componentes estructurales de la matriz) (Dozin B. et al., Matrix Biology, 2002, 21:449-459).

- 25 También se han encontrado altos niveles de moléculas proinflamatorias en el líquido sinovial de pacientes que padecen artritis reumatoide (RA) y artritis psoriásica (Arend W.P. et al., Arthritis Rheum, 1995, 38:151-160).

- La **artritis reumatoide** (RA) es una poliartritis inflamatoria crónica, anquilosante y progresiva con patogénesis autoinmune y etiología desconocida, debida principalmente a las articulaciones sinoviales en las que provoca deformación y dolor hasta la pérdida del funcionamiento articular.

- 30 La progresión de la RA, de hecho, determina una fuerte respuesta inflamatoria de la membrana sinovial con la consiguiente inflamación de sus células, un exceso de líquido sinovial y el desarrollo de tejido fibroso. Más concretamente, la membrana sinovial es una membrana de origen mesenquimal formada por sinoviocitos (de tipo macrófago y fibrinoidal) que, en la enfermedad, sufre hiperplasia e hipertrofia y luego crece en espesor (las dos/tres capas de una afección no patológica se convierten en siete o más), formando el pannus sinovial que comienza a erosionar periféricamente el hueso no cubierto por cartílago.

- 40 Al mismo tiempo, las células polimorfonucleares con linfocitos T, B y células plasmáticas se mueven hacia el líquido sinovial, aumentando la inflamación de la articulación afectada, el cartílago articular afectado por la RA (con relativo hueso subyacente) sufre entonces un adelgazamiento con progresiva destrucción.

- 45 Esta patología se manifiesta generalmente a nivel sistémico involucrando también a otros órganos y aparatos. Son típicos los nódulos reumatoides, que pueden formarse a nivel pulmonar con la consiguiente fibrosis pulmonar, pleuresía y pleuropericarditis, a nivel cardíaco puede haber una aceleración de la aterosclerosis coronaria, mientras que a nivel ocular puede haber xeroftalmía, uveítis y escleritis. La amiloidosis y la osteoporosis también son complicaciones de la RA (Cecil, TEXTBOOK of MEDICINE, 1988).

- 50 La artritis reumatoide afecta del 0,5 al 1% de los adultos en el mundo y comúnmente comienza entre los 40 y 50 años de edad.

- El tratamiento de la RA es difícil, depende de su severidad y del tipo de órganos involucrados e incluye el uso de fármacos adecuados para controlar la inflamación para la prevención y/o tratamiento del daño articular (además de otros órganos) con el objetivo de frenar la discapacidad resultante. Los analgésicos y antiinflamatorios, incluidos los esteroides y los AINE, suprimen los síntomas, pero no detienen la progresión de la enfermedad; los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) pueden, sin embargo, ralentizarla.

- 60 En formas más agresivas se utiliza generalmente el metotrexato, un antimetabolito inhibidor de la síntesis de ácido fólico que, en dosis bajas, actúa como inmunosupresor, pero recientemente se han introducido fármacos biológicos que actúan de forma más selectiva y específica (Canete JD et al. Expert Opinion Biol Ther, 2017, 17:1-15), como Etanercept, una proteína de fusión que actúa antagonizando la citoquina proinflamatoria del TNF.

- 65 El TNF forma parte de ese grupo de citoquinas responsables de la fase aguda de la inflamación sistémica; participa en numerosos procesos como la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, la carcinogénesis y la replicación viral. Es producido principalmente por macrófagos; su síntesis puede ser estimulada por endotoxinas

bacterianas e inhibida por esteroides.

Al actuar sobre numerosos órganos y sistemas, junto con otras citoquinas, promueve la respuesta inflamatoria que a su vez desencadena muchas patologías (incluidas las enfermedades autoinmunes) como la RA y la OA, la enfermedad de Crohn, la psoriasis y el asma; esta citoquina también es capaz de activar los osteoclastos y, por lo tanto, inducir la resorción ósea, es capaz de estimular la producción de macrófagos de moléculas con acción oxidante, está implicada en patologías particulares del sistema cardiovascular participando en la formación de trombos venosos, en la patogénesis de aterosclerosis y vasculitis (Alam J., Biomed Pharmacother, 2017, 92:615-633), y finalmente es capaz de aumentar la resistencia de los tejidos a la insulina favoreciendo la aparición de diabetes tipo II (Nicolau J et al., Joint Bone Spine, 2017, 84 (4): 411-416).

Para la OA y la RA existen varios tipos de fármacos que son eficaces para frenar la progresión de las patologías antes mencionadas o en el tratamiento de los síntomas relacionados, sin embargo, pueden tener importantes efectos secundarios, a menudo tóxicos, tanto como moléculas sintéticas (por lo tanto no naturales), por el régimen de tratamiento farmacológico que debe mantenerse durante períodos de tiempo muy prolongados, y también por la vía de administración, generalmente parenteral, pero sobre todo oral y, por lo tanto, involucrando a todo el organismo aunque, en muchos casos, sólo se debe tratar la articulación inflamada. Por ejemplo, el documento de patente EP 1724287 A1 divulga conjugados de metotrexato-HA para el tratamiento de la osteoartritis. En particular, los conjugados tienen un efecto sobre la sinovitis, la inflamación de las articulaciones y la destrucción del cartílago. En el artículo de FRANTISEK et al.: "Carnosine inhibits degradation of hyaluronan induced by free radical processes in vitro and improves the redox imbalance in adjuvant arthritis in vivo (*La carnosina inhibe la degradación del hialuronano inducida por procesos de radicales libres in vitro y mejora el desequilibrio redox en la artritis adyuvante in vivo*)", (NEUROENDOCRINOLOGY LET, MAGHIRA & MAAS PUBLICATIONS, vol. 31, no. Suppl. 2, 28 de diciembre de 2010, páginas 96-100,) se divulga que la carnosina implica propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en animales artríticos. Además, el artículo de CAMPO et al. "Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression (*El hialuronano reduce la inflamación en la artritis experimental modulando la expresión del cartílago TLR-2 y TLR-4*)", (BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, vol. 1812, no. 9, 13 de junio de 2011, páginas 1170-1181) examina los efectos de la administración intraperitoneal prolongada de HA de alto peso molecular, a diferentes concentraciones moleculares, sobre la modulación de TLR-2 e ILR-4 en ratones artríticos. La solicitud de patente ITMI20081829 A1 divulga el uso de una composición farmacéutica que comprende ácido hialurónico y carnosina para el tratamiento de patologías articulares, como la osteoartritis.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es identificar composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de ácido hialurónico (HA)/carnosina particularmente eficaces para su uso en el tratamiento y la prevención de la OA y en el tratamiento de la RA, preferentemente mediante administración oral (sobre todo cuando la enfermedad ha adquirido manifestaciones sistémicas claras) y/o mediante administración intra-articular en la articulación en una fase temprana de la enfermedad, o en una fase de intensificación localizada en la misma articulación. La carnosina es un dipéptido que se obtiene de la reacción de condensación entre β -alanina y L-histidina en el organismo. Se encuentra en grandes cantidades en los músculos y en el cerebro; la literatura científica es unánime al otorgarle una actividad antioxidante, antirradicales y antiinflamatoria (Budzen S. et al., Adv Clin Exp Med, 2013, 22 (5): 739-44).

Los estudios preclínicos han demostrado su capacidad antirradicales en la prevención y el tratamiento de cataratas (Babizhayev M. et al., Biochim, Biophys, Acta, 1989, 1004(3):363-371), mientras que su actividad inflamatoria ha sido demostrada en algunos tejidos del sistema digestivo, en los ojos y en la piel (US4508728, WO01/52808); también se ha demostrado su actividad específica como eliminador del radical hidroxilo (La Mendola D. et al., Helv. Chim. Acta, 2002, 85 (6):1633-1643).

Sin embargo, la naturaleza peptídica de la carnosina impone algunas limitaciones a su uso, limitaciones asociadas con su naturaleza termolábil y su alta degradabilidad *in vivo* debido a peptidasas específicas. Para superar esta limitación, se ha propuesto el uso de N-acetil-carnosina (WO95/10294), que se degrada mucho más lentamente que la versión libre (Babizhayev MA et al., Clin. Chim. Acta, 1996, 254 (1):1-21) y, al mismo tiempo, también se ha sintetizado el derivado químico de la carnosina con ciclodextrinas (EP1176154), oligosacáridos cíclicos naturales utilizados en medicina como excipientes farmacológicos. En este caso, la ciclodextrina estabiliza el dipéptido, protegiéndolo de la actividad hidrolítica de la carnosinasa (Schaschke N. et al., JACS, 1998, 120 (28):7030-7038), permitiendo así que la molécula antes mencionada ejerza su actividad biológica. Con el mismo razonamiento, posteriormente se patentó el conjugado de carnosina con trehalosa como sistema con actividad antioxidante, antiglicante y antiagregante (EP1860116).

También es conocido el derivado de HA, que se obtiene conjugando carnosina con dicho polisacárido mediante un enlace amida que involucra el carboxilo de HA y el grupo amino del dipéptido (WO2016016847).

Sin embargo, no se contempló el uso de este derivado en el tratamiento de la RA y la OA; además, de acuerdo con la referencia mencionada anteriormente, este derivado sólo podría derivatizarse hasta un 25% (relación mol/mol entre HA y carnosina).

- 5 La presente invención describe una composición que comprende el derivado de amida de HA con carnosina con un grado de derivatización superior al 25%, por lo tanto, un conjugado cuya síntesis no fue considerada posible por los expertos en la técnica con base en las enseñanzas del estado de la técnica.

10 El HA es un heteropolisacárido compuesto de residuos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Este es un polímero de cadena lineal con un peso molecular que oscila entre 50.000 y 13×10^6 Da, dependiendo de la fuente de la que se obtenga y de los procedimientos de preparación utilizados. Está presente en la naturaleza en geles pericelulares, en la sustancia fundamental del tejido conectivo de los organismos vertebrados, en el líquido sinovial de las articulaciones, en el humor vítreo y en el cordón umbilical. Por lo tanto, el HA desempeña un papel importante en el organismo biológico, tanto como soporte mecánico de las células de muchos tejidos como la piel, tendones, músculos y cartílagos, como también como agente activo capaz de modular (a través del receptor CD44) numerosos procesos relacionados con la fisiología y biología celular, tales como, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación celular y angiogénesis; su papel en el mantenimiento de la hidratación de los tejidos y la lubricación de las articulaciones también es conocido. De hecho, el HA es un polisacárido que tiene propiedades viscoelásticas particulares, sintetizado y secretado en la cavidad articular principalmente por sinoviocitos (Asari A. et al., Arch. Histol. Cytol., 1995, 58 (1):65-76) y es uno de los principales componentes del líquido sinovial. Durante los movimientos lentos de la articulación, el HA actúa como un lubricante viscoso, mientras que durante los movimientos rápidos absorbe con propiedades elásticas los posibles traumatismos o microtraumatismos que puedan afectar a la articulación.

- 25 El intercambio de HA en el líquido sinovial no patológico es generalmente extremadamente rápido, mientras que en OA se ha encontrado una disminución de la concentración con una disminución del peso molecular promedio (MW), pero sobre todo una fuerte disminución de su flujo de intercambio (Balazs EA, et al., J Rheumatol, Suppl., 1993, 12: 75-82).

30 Por estos motivos, Balazs sugirió por primera vez la posibilidad de modificar la evolución del proceso artrósico mediante el aporte de HA exógeno (especialmente con un alto MW) directamente en la cavidad articular, y gracias a esta terapia de tratamiento se pudo demostrar el efecto protector del HA frente a la degeneración implicada en el cartílago de una articulación dañada por enfermedades inflamatorias o traumatismos.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

El objeto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de ácido hialurónico (HA)/carnosina con un enlace amida directo entre el grupo carboxilo de HA y el grupo amino de carnosina para su uso en la prevención y tratamiento de la OA y en el tratamiento de la RA, en el que el grado de derivatización de HA oscila entre 30 y 60% y el peso molecular promedio de HA oscila entre 1×10^5 Da y 1×10^6 Da.

45 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención comprenden el conjugado de HA/carnosina con un grado de derivatización (amidación) del grupo carboxilo de HA (DS) que varía preferentemente dentro del intervalo de $35 \pm 3\%$ (es decir, de 32% a 38%) a $45 \pm 5\%$ (es decir, de 40% a 50%). Dicho derivado de amida de HA con carnosina (es decir, conjugado de HA/carnosina) se obtiene combinando covalentemente el dipéptido (es decir, carnosina) con ácido hialurónico (HA) formando un enlace amida directo (sin la ayuda de espaciadores permanentes) entre el carboxilo de HA y grupo amino de la carnosina.

50 Como se demuestra a continuación, el Solicitante de hecho ha descubierto sorprendentemente cómo el conjugado objeto de la invención tiene efectos sinérgicos inesperados entre la carnosina y el HA en el tratamiento curativo de la RA y la OA, logrando una mejora clínica/histológica significativa de las patologías antes mencionadas, con una reducción significativa de los indicadores plasmáticos tanto de inflamación como de oxidación lipídica. El grado de derivatización del conjugado objeto de la presente invención se mide mediante el procedimiento descrito en el siguiente Ejemplo 4.

60 El HA utilizado para la síntesis del conjugado de HA/carnosina de la presente invención puede derivar de cualquier fuente, por ejemplo, mediante extracción de crestas de gallo (EP138572), mediante fermentación (de *Streptococcus Equi* o *Zooepidemicus*, EP716688), o mediante biosíntesis (de *Bacillus*, EP2614087), y tiene un peso molecular (MW) promedio que oscila entre 1×10^5 Da y 1×10^6 Da, más particularmente dentro del intervalo de 130-220 kDa y/o dentro del intervalo de 500-750 kDa. Las composiciones farmacéuticas de la invención tienen un grado de derivatización de HA que varía dentro del intervalo de 30 a 60% y el peso molecular promedio de HA que oscila entre 1×10^5 Da y 1×10^6 Da. Son más preferidas las composiciones farmacéuticas en las que el DS de HA varía dentro del intervalo de 30 a 60% y el peso molecular promedio de HA está dentro del intervalo de 130-220 kDa, o 500-750 kDa y mezclas relacionadas.

Aún más preferidas son las composiciones farmacéuticas en las que el DS de HA varía dentro del intervalo de 31 a 34% ($35 \pm 3\%$) o dentro del intervalo de 40 a 50% ($45 \pm 5\%$) y mezclas relacionadas, y el peso molecular promedio de HA está dentro del intervalo de 130-220 kDa o 500-750 kDa y mezclas relacionadas; en particular,

Cabe señalar que el peso molecular promedio se refiere al MW promedio en peso calculado con el procedimiento de "viscosidad intrínseca" (Terbojevich et al., Carbohydr Res, 1986, 363-37).

El ácido hialurónico utilizado para la síntesis del conjugado en cuestión se selecciona entre la sal sódica de HA (EP138572), preferible para la síntesis del conjugado de HA/carnosina hasta un DS de aproximadamente el 40% (por lo tanto del 25% al 40%), y la sal de tetrabutylamonio (TBA) de HA (EP216453), preferible para la síntesis del conjugado de HA/carnosina con un DS superior al 40% (por lo tanto del 40% al 100%), el producto final (descrito en los ejemplos de preparación proporcionados a continuación) se prepara (preferentemente) como la sal sódica del conjugado de HA/carnosina, independientemente de la sal de HA utilizada como reactivo.

También se divulgan biomateriales que consisten en derivados de HA conjugados (nuevamente a través del enlace amida) con carnosina, en los modos y en los grados descritos para HA, definidos en la presente memoria descriptiva como "biomateriales de HA/carnosina" (no son objeto de la presente invención). Los derivados de HA que se pueden usar en la formación de los biomateriales mencionados anteriormente se enumeran a continuación:

HYAFF®: ésteres de HA con alcoholes de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de esterificación que puede variar dependiendo del tipo y longitud del alcohol utilizado, preferentemente del 1 al 70%, mientras que el porcentaje restante de HA no esterificado se puede salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP216453);

HYADD®: amidas de HA con aminas de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación que oscila entre 0,1 y 50%, mientras que el porcentaje restante de HA no sometido a amidación puede salificarse con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP1095064);

ACP®: ésteres internos de HA con un porcentaje de esterificación no superior al 20%, oscilando preferentemente entre 0,05 y 10% de esterificación, mientras que el porcentaje restante de HA no esterificado puede salificarse con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP341745);

HYOXX®: derivados de percarboxilatos de HA obtenidos por oxidación del hidroxilo primario de la fracción de N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación que oscila entre 0,1 y 100% y, preferentemente, entre 25 y 75%. Los grupos carboxilo de HA se pueden salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP1339753).

Derivados O-sulfatados de HA hasta el 4º grado de sulfatación (EP702699). También es posible partir del conjugado de HA/carnosina para sintetizar (según lo que conocen los expertos en la técnica) los biomateriales de HA/carnosina mencionados anteriormente, derivatizando aún más el HA: por lo tanto, es posible utilizar el conjugado en cuestión como material de partida (en lugar de la sal sódica de HA o sal de TBA) para proceder a la síntesis de HYAFF, ACP, HYADD, HYOXX o derivados sulfatados según lo conocido por los expertos en la técnica, para obtener productos previamente definidos como biomateriales de HA/carnosina.

Los ésteres y amidas son, entre los derivados del HA, aquellos que revisten especial importancia en el proceso de formación de los biomateriales divulgados, no objeto de la invención; particularmente interesantes bajo este perfil son los ésteres bencílicos (HYAFF) con un porcentaje de esterificación que oscila preferentemente entre 5 y 50% y la hexadecilamida de HA (HYADD4) con un grado de derivatización de hasta el 5% (medido en HPLC), esta amida ha demostrado ser resulta particularmente relevante por su papel como gel viscoelástico que se puede usar clínicamente como sustituto sinovial en caso de lesión articular (EP1853279).

Numerosos experimentos científicos han demostrado ampliamente cómo HYAFF es un polímero biodegradable completamente biocompatible (Campoccia D. et al., Biomaterials, 1998, 19:2101-2127) y cómo se puede utilizar el uso de derivados éster de HA para la formación de fibras (EP618817) procesados en forma no tejida o como esponja, puede constituir una matriz tridimensional que se puede usar en los campos dermatológico y ortopédico.

Los derivados del ACP han sido utilizados con éxito como materiales de relleno cutáneos y como geles antiadherentes (EP0850074), mientras que para el derivado sulfatado del HA se están estudiando sus efectos antiinflamatorios como componente tópico de composiciones para uso dermatológico (EP2429515), o su efecto protector/regenerador de la matriz del cartilago en el caso de composiciones orales o intra-articulares (EP2021078, EP2786782). Por consiguiente, los biomateriales divulgados formados por el enlace amida del carboxilo de los derivados de HA antes mencionados con carnosina, no objeto de la presente invención,

encuentran un uso eficaz en el tratamiento de la RA (además de todas las enfermedades causadas directamente por la RA o indirectamente relacionadas con/dependientes de la RA) y la OA (y también en la prevención de la OA), como biomateriales procesados en forma de fibras, geles, hidrogeles, microesferas, esponjas, tejidos o no tejidos, películas.

Las enfermedades causadas directamente por la RA son manifestaciones clínicas sistémicas de la misma patología que involucran órganos y aparatos distintos de la articulación. En concreto, existe una RA en la que los nódulos reumatoides se han formado a nivel pulmonar con la consiguiente fibrosis pulmonar, pleuresía y pleuropericarditis, mientras que a nivel ocular hay xeroftalmía, uveítis y escleritis.

Las patologías indirectamente relacionadas con/dependientes de la RA se definen en la presente memoria descriptiva como patologías que han sido causadas indirectamente por la RA al estar vinculadas a situaciones graves de perfil inmunológico alterado y/o a condiciones de alto estrés oxidativo.

De hecho, una producción alterada de radicales libres puede causar daños graves a la estructura de los tejidos conectivos, a la estructura de las proteínas, a las membranas celulares y a los genes del ADN. Por lo tanto, el estrés oxidativo puede considerarse como una condición patológica causada por la ruptura de un delicado equilibrio entre la producción y la eliminación de radicales libres.

Actualmente se considera que el estrés oxidativo contribuye activamente a la aparición de la RA y, por consiguiente, a otras enfermedades importantes que frecuentemente surgen contextualmente y/o dependen de la RA, tales como envejecimiento patológico prematuro, ataque cardíaco, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis y aterosclerosis coronaria, hipertensión arterial, demencia, diabetes, osteoporosis y amiloidosis, muchas formas de cáncer, ciertas enfermedades hepáticas o renales como proteinuria y nefritis, lesiones gástricas, cataratas.

Por otra parte, las enfermedades relacionadas con un perfil inmunológico alterado incluyen artritis psoriásica, gastritis, vasculitis, diabetes tipo I y enfermedades autoinmunes que incluyen, por ejemplo, tiroiditis autoinmune.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de HA/carnosina de la invención se describen para una aplicación tópica, oral, intra-articular, parenteral o quirúrgica, en todos los campos en los que se requiere dicha administración en relación con la prevención y el tratamiento de la osteoartritis o tratamiento de la RA, y puede estar asociado con sustancias farmacológicas y/o biológicamente activas tales como, por ejemplo, esteroides, citoquinas antiinflamatorias, interferón, factores de crecimiento (tales como, por ejemplo, BMP2 y BMP7), AINE y/o con sistemas de liberación controlada de fármacos como, por ejemplo, ciclodextrinas, y/o polímeros naturales, como HA y sus derivados, preferentemente con el derivado de amida de HA con hexadecilamina denominado HYADD4 (EP1095064), o de naturaleza sintética.

A continuación, se describe la síntesis de los conjugados de HA/carnosina objeto de la invención, cuyo proceso de conjugación entre éster metílico de carnosina y sal sódica de ácido hialurónico o sal de tetrabutilamonio se realiza en un medio que comprende DMSO o DMSO/H₂O como disolvente principal.

En la solicitud de patente WO2016016847 comentada anteriormente, se describió exclusivamente un proceso de conjugación entre la sal sódica de HA y el éster metílico de carnosina en THF.

Por lo tanto, en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, la síntesis tiene lugar en un disolvente dipolar, aprótico y fuertemente higroscópico, a temperatura ambiente. La síntesis en THF según el estado de la técnica se realizó en un disolvente aprótico, volátil y de menor polaridad, por lo que se llevó a cabo a 4 °C.

Las características químicas de los diferentes disolventes, asociadas a diferentes temperaturas de reacción que también permiten el uso de una sal de HA diferente a la sal sódica, permitieron obtener los grados de derivatización del HA con carnosina descritos y reivindicados a continuación.

Procedimientos de preparación de los conjugados de HA/carnosina objeto de la invención

Ejemplo 1

Síntesis de Éster Metílico de Carnosina (como sal de clorhidrato)

La reacción se llevó a cabo en un ambiente anhidro. Se trataron 1,5 g de carnosina, bajo agitación, dentro de un matraz de 250 ml, con 50 ml de una solución de cloruro de acetilo en metanol anhidro (premezclada) en una proporción de 1:20 (v/v) durante 12 horas, después de lo cual se eliminó aproximadamente el 90% del disolvente mediante evaporación al vacío. Al residuo de la reacción se le añadieron 20 ml de metanol anhidro y de nuevo se eliminó por evaporación aproximadamente el 90% del disolvente. La operación se repitió hasta que se eliminó todo el HCl (que se formó durante la reacción); a continuación, se llevó el producto a sequedad al vacío.

El producto se sometió a control mediante electroforesis sobre papel y los diversos componentes de la muestra se detectaron utilizando ninhidrina.

5 Ejemplo 2

Síntesis del conjugado de HA/carnosina con DS incluido dentro del intervalo de $35\pm 3\%$ mol/mol)

Se introdujeron 1,1 g de sal sódica del ácido hialurónico (HANA) con un MW de 700 kDa en un reactor al que posteriormente se le añadieron 80 ml de una mezcla de H₂O:DMSO (en una proporción de 1:1 v/v) bajo agitación constante (a temperatura ambiente) durante al menos 4 horas. Luego se añadieron en secuencia 40 ml de una solución de H₂O:DMSO (1:1 v/v) que contenía 480 µl de Tris [2-(2-metoxietoxi)etil]amina (TMEA), 400 mg de 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (HOObt) en forma de polvo y 20 ml de H₂O que contenía 240 mg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC HCl).

Después de 30 minutos, se añadieron 20 ml de una solución que contenía 365 mg de éster metílico de carnosina en DMSO. Luego esta mezcla se sometió a agitación vigorosa durante 4 días a 25 °C.

Luego se precipitó el producto de la reacción anterior con la adición de etanol (1 litro) y posteriormente se llevó a cabo la desprotección (hidrólisis básica) del éster metílico de carnosina con NaOH 0,1 N, en agitación constante durante 2 horas a 25 °C.

A continuación, se neutralizó el pH mediante la adición de HCl 1 N y el producto se precipitó con 800 ml de etanol. A continuación, este precipitado se disolvió en agua, se dializó en agua durante 2 días y posteriormente se liofilizó.

Ejemplo 3

Síntesis del conjugado de HA/carnosina con DS incluido dentro del intervalo de $50\pm 5\%$ mol/mol)

Se introdujeron 1,5 g de sal de tetrabutilamonio del ácido hialurónico (HATBA) con un MW de 200 kDa en un reactor al que posteriormente se añadieron 50 ml de DMSO, bajo agitación constante (a temperatura ambiente) durante al menos 4 horas. Luego se añadieron en secuencia 2,4 ml de Tris [2-(2-metoxietoxi)etil]amina (TMEA), 400 mg de 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (HOObt) en forma de polvo y 20 ml DMSO que contenía 240 mg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC HCl).

Después de 30 minutos, se añadieron 10 ml de una solución que contenía 365 mg de éster metílico de carnosina en DMSO. Luego esta mezcla se sometió a agitación vigorosa durante 1 día a 25 °C.

Finalmente se efectuó una segunda adición de 10 ml de DMSO que contenía 240 mg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, HCl), y 10 ml de la solución que contenía 365 mg de carnosina metil-éster en DMSO.

Esta mezcla se dejó en agitación vigorosa durante 3 días a 25 °C.

Luego se precipitó el producto de reacción anterior con la adición de 5 ml de una solución saturada de NaBr y 800 ml de etanol y luego se llevó a cabo la desprotección (hidrólisis básica) del éster metílico de carnosina con NaOH 0,1 N bajo agitación constante durante 2 horas a 25 °C.

A continuación, se neutralizó el pH mediante la adición de HCl 1 N y el producto se precipitó con 800 ml de etanol. A continuación, este precipitado se disolvió en agua, se dializó nuevamente en agua durante 2 días y posteriormente se liofilizó.

Ejemplo 4

Análisis por HPLC de la muestra preparada según los ejemplos 2 y 3 (análisis cuantitativo de la p-alanina presente en la carnosina unida al carboxilo de HA)

Preparación de la muestra:

- el conjugado de HA/carnosina se disolvió en HCl 6 M a una concentración de 25 mg/ml a 70 °C durante 5 minutos, luego se diluyó 1:110 en HCl 6 M;
- luego se transfirieron 0,1 ml de la solución de muestra a un tubo de ensayo al que se añadieron 1,9 ml de HCl 6 M;
- la muestra se hidrolizó durante 2 horas a 165 °C, se dejó enfriar y luego se agregaron 8 ml de H₂O MilliQ, se mezcló toda la muestra hasta su completa resuspensión y se filtró;
- luego se transfirieron 8 ml de esta muestra filtrada a un matraz de 20 ml, al que se añadieron 10 ml de NaOH 1 M;
- se transfirieron 0,2 ml de la muestra preparada de este modo a un vial y luego se añadieron 0,2 ml de tampón borato 0,2 M, pH 9,3 y 0,2 ml de FMOC-Cl (preparado a una concentración de 1 mg/ml en ACN (acetonitrilo)); tiempo de reacción: al menos 30 minutos;
- finalmente, la muestra se inyectó en HPLC utilizando el siguiente procedimiento de HPLC con un detector UV:
 - Columna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (15 cm, 5 µ, 100 Å)
 - Caudal: 1 ml/min
 - Volumen de inyección: 50 µl
 - Longitud de onda: 262 nm
 - Fase móvil A: Na₂HPO₄ 40 mM pH 7,8
 - Fase móvil B: ACN/MeOH/H₂O 45/45/10
 - Proporción de Fase A/Fase B = 60/40 (con gradiente).

Resultados: la muestra del Ejemplo 2 mostró un grado de derivatización al carboxilo de HA del 35% mol/mol, mientras que la muestra del Ejemplo 3 mostró un grado de derivatización igual al 50% mol/mol.

Experimentos con animales de conjugados de HA/carnosina.

Ejemplo 5

Modelo experimental de RA: Artritis Inducida por Colágeno (CIA) en ratones

Tratamiento oral con conjugado de HA/carnosina

La CIA ha sido reconocida durante muchos años como un modelo experimental válido de RA en ratones o ratas, ya que determina las características humores, celulares, histológicas y patológicas de la RA en el animal (Holmdahl et al., Immunological reviews, 1990, 118: 193-232). De hecho, tras la inducción de la CIA en ratones, un gran número de neutrófilos/macrófagos/linfocitos activados están presentes en sus articulaciones, con la consiguiente producción del pannus sinovial de la RA.

Inducción de CIA: se disolvió colágeno de pollo tipo II (CII) en ácido acético 0,01 M a una concentración de 2 mg/ml, luego se preparó el adyuvante completo de Freund (CFA) mediante la adición de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (2 mg/ml) al adyuvante incompleto (compuesto por una emulsión de agua/aceite mineral), los dos componentes (CII y CFA) se mezclaron y emulsionaron en la misma proporción v/v. Se inyectaron 100 µl de la emulsión obtenida de este modo (que contenía 100 µg de CII) en la base de la cola del ratón mediante inyección intradérmica (día 1). Después de 21 días se efectuó una segunda inyección idéntica.

Grupos experimentales:

Se utilizaron ratones macho DBA/IJ de nueve semanas de edad, de aproximadamente 30 g cada uno, 20 ratones por grupo.

Grupo 1: CIA-control: los animales fueron tratados mediante inducción de CIA y posteriormente con agua destilada administrada por vía oral cada 24 horas a partir del día 25 después de la CIA hasta el día 35, final de la experimentación.

Grupo 2: CIA + conjugado de HA/carnosina: los animales fueron tratados mediante inducción de CIA y posteriormente con el conjugado mencionado anteriormente cada 24 horas a partir del día 25 después de la CIA hasta el día 35. El conjugado utilizado para la prueba se preparó según el Ejemplo 3, por lo que se derivatizó al 50% mol/mol, la dosis, administrada por vía oral, fue de 81 mg/kg de conjugado (20 mg de carnosina y 61 mg de HA).

Grupo 3: Mezcla de CIA + HA/carnosina: los animales fueron tratados mediante inducción de CIA y posteriormente con HA/carnosina cada 24 horas a partir del día 25 después de la CIA hasta el día 35. Esta preparación consistió en una mezcla de sal sódica de HA mezclada con carnosina en agua, administrada por vía oral a una dosis de 20 mg/kg de carnosina con 61 mg/kg de HA.

Evaluación clínica

El desarrollo de la enfermedad se evaluó diariamente 20 días después de la primera inyección según el siguiente esquema de evaluación para cada pata:

- 0 = sin indicación del desarrollo de artritis
- 1 = hinchazón y/o enrojecimiento de la pata
- 2 = hinchazón y/o enrojecimiento de la pata en al menos 2 articulaciones
- 3 = hinchazón y/o enrojecimiento de la pata en al menos 3 articulaciones
- 4 = desarrollo de una forma severa de artritis de toda la pata con afectación de todos los dedos.

Para cada animal, el índice total de desarrollo de CIA (definido como Puntuación de Pata Artrítica) se calculó sumando los valores obtenidos (y evaluados como anteriormente) para cada pata.

El índice de severidad clínica viene dado por el volumen de las patas (medido cada dos días mediante un pletismómetro) que aumentó progresivamente a lo largo de todo el período de análisis en función de la severidad de la enfermedad: *aumento de la pata*.

Evaluación histológica

Al final del período de evaluación, es decir, el día 35 después del inicio de la experimentación, se sacrificaron los animales, se retiraron las patas tratadas (incluidas las articulaciones de las rodillas) y se fijaron en formalina al 10%. Posteriormente se descalcificó y empapó en parafina para la preparación de secciones de microtomo de 5 µm, luego se tiñó con hematoxilina/cosina. El análisis con microscopio óptico se realizó siguiendo la siguiente *puntuación Histológica*:

- 0 = sin daño
- 1 = edema
- 2 = presencia de infiltrado de células inflamatorias
- 3 = evidencia de resorción ósea

Análisis de plasma:

Cuantificación plasmática de TNF-α

Los niveles de TNF-α se midieron en plasma animal al final de la experimentación utilizando el kit ELISA de Calbiochem-Novabiochem Corporation, IT, para determinar los niveles de TNF-α (límite de lectura 10 pg/ml).

Cuantificación plasmática del índice de peroxidación lipídica

El ataque por parte de los radicales libres de los lípidos presentes en las membranas biológicas determina el inicio de un proceso de deterioro dependiente de oxígeno (peroxidación lipídica) que conduce a la alteración de la integridad de las membranas biológicas y a la formación de proteínas lipídicas oxidadas y peróxidos lipídicos, con subproductos como aldehídos, incluido el malondialdehído (MDA). Todos estos procesos conducen al estrés oxidativo. Para medir el daño de los radicales libres causado en el ratón debido a la aparición de CIA, se hicieron reaccionar muestras de plasma (que contienen los aldehídos anteriores) de los grupos tratados tomadas al final del experimento con ácido barbitúrico (TBA), en comparación con el estándar dado por la MDA (es decir, soluciones de tetrametoxipropano al 99%, Sigma, Milán). El resultado fue un aducto fácilmente detectable con un espectrofotómetro de OD650 nm (Ohkawa H et al., Anal. Biochem., 1979, 95: 351-358).

Resultados:

Evaluación clínica

Como se indica en la Figura 1 (Puntuación de Pata Artrítica), el índice máximo de manifestación patológica se muestra con signos claros de eritema periarticular y edema de las patas de 30 a 35 días después del tratamiento con CIA (grupo de control); la administración oral del conjugado de HA/carnosina provocó una reducción significativa de la inflamación articular, especialmente a los 30 días, también frente al grupo CIA + mezcla de HA/carnosina. Esta diferencia significativa en eficacia, índice de sinergia entre HA y carnosina cuando se une covalentemente al DS experimentado, se mantiene durante tiempos aún más prolongados hasta el final de la

experimentación.

La Figura 2 muestra la tendencia del aumento de la pata: también en este caso el tratamiento con el conjugado objeto de la invención confirma el efecto sorprendente de la Figura 1, en la que, al final del experimento, la hinchazón de la pata tratada con el conjugado fue significativamente menor frente al control no tratado y también frente al grupo tratado con la mezcla de HA/Carnosina.

Evaluación histológica

Figura 3: al día 35 (final) de la experimentación, la evaluación histológica de los animales control-CIA reveló signos histológicos claros e importantes del desarrollo de una forma severa de RA, con erosión ósea y necrosis moderada/severa de los tejidos articulares. El tratamiento con el conjugado de HA/Carnosina, por otro lado, redujo significativamente esta erosión tanto frente al control como frente al grupo tratado con la mezcla HA/Carnosina.

Análisis de plasma: Cuantificación plasmática de TNF- α

Al final de la experimentación, se analizó el nivel plasmático de la citoquina proinflamatoria TNF- α en todos los animales sometidos a CIA y los que no (muestra Simulada, es decir, en los que no se había inducido a CIA a tener el valor de TNF plasmático de los animales sanos no operados como comparación).

Como se muestra en la Figura 4, el valor de la citoquina inflamatoria mencionada anteriormente en el grupo de control CIA fue extremadamente alto, casi 5 veces mayor que el control Simulado, mientras que el tratamiento con el conjugado objeto de la invención se redujo a más de la mitad del valor de TNF- α , reduciéndolo también significativamente frente al grupo al que se le había administrado la mezcla de HA/Carnosina.

Ejemplo 6

Modelo experimental de OA: Inducción de osteoartritis por yodoacetato monosódico (MIA) en ratas

Se indujo OA en las articulaciones posteriores de la rodilla de las ratas sometidas a prueba mediante la inyección intra-articular de MIA: se inyectaron 25 μ l de solución salina que contenía 1 mg/kg de MIA en la articulación (rodilla) de la pata derecha de cada animal (en tratamiento) a través del ligamento infrapatal, mientras que la articulación izquierda recibió un volumen igual de solución salina al 0,9% (Sagar DR et al, Ann. Rheum. Dis., 2013, 73: 1558-1565).

Tratamiento intra-articular con el conjugado de HA/carnosina

Grupos experimentales:

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley, de aproximadamente 230 g cada una, 20 ratas por grupo.

Grupo 1: MIA-control: los animales fueron tratados mediante inducción de MIA y posteriormente con 25 μ l de agua destilada administrados por vía intra-articular en la rodilla derecha los días 7, 10, 13, 16 y 19 después de MIA, el día 21, la experimentación terminó con la eutanasia de los animales.

Grupo 2: MIA + conjugado HA/carnosina: los animales fueron tratados mediante inducción de MIA y posteriormente con 25 μ l del conjugado preparado según el Ejemplo 2, luego derivatizados al 35% mol/mol, intra-articularmente en la rodilla derecha a los días 7, 10, 13 y 16 19 después de MIA hasta el día 21. Los 25 μ l de conjugado de HA/carnosina contenían 250 μ g de conjugado, es decir, 45,75 μ g de carnosina y 204,25 μ g de HA.

Grupo 3: Mezcla de MIA + HA/carnosina: los animales fueron tratados mediante inducción de MIA y posteriormente con 25 μ l de HA y carnosina intra-articularmente en la rodilla derecha a los días 7, 10, 13, 16 y 19 después de MIA hasta el día 21. Esta preparación consistió en una mezcla de sal sódica de HA mezclada con carnosina en agua, por lo tanto 25 μ l de esta preparación contenían 45,75 μ g de carnosina y 204,25 μ g de HA.

Cuantificación plasmática de TNF- α

Al final de la experimentación, se midieron los niveles de TNF- α en el plasma de los animales utilizando el kit ELISA de Calbiochem-Novabiochem Corporation, '1'1', para determinar los niveles de TNF- α (límite de lectura 10 pg /ml).

Resultados

La Figura 6 muestra los resultados obtenidos en los grupos de tratamiento y en el grupo Simulado, definido como un grupo en el que los animales no habían sido sometidos a tratamiento con MIA: también en este caso, el nivel plasmático de la citoquina TNF del grupo de MIA-control resultó ser extremadamente alto, mientras que el tratamiento con el conjugado de HA/Carnosina redujo significativamente el valor de TNF- α no sólo frente a este control, sino también frente al grupo al que se le había administrado la mezcla de HA/Carnosina que no mostró ninguna eficacia, demostrando una vez más el sorprendente efecto del conjugado objeto de la invención y, por lo tanto, su nivel de derivatización que es particularmente elevado respecto al estado de la técnica.

Tratamiento oral con el conjugado de HA/carnosina

Grupos experimentales:

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley, de aproximadamente 230 g cada una, 20 ratas por grupo.

Grupo 1: MIA-control: los animales fueron tratados mediante inducción de MIA y posteriormente con agua destilada administrada por vía oral cada 24 horas desde el tercer día después de MIA hasta el día 20, final de la experimentación.

Grupo 2: MIA + conjugado de HA/carnosina: los animales fueron tratados mediante inducción de MIA y posteriormente con el conjugado mencionado anteriormente cada 24 horas desde el tercer día después de MIA hasta el día 20. El conjugado utilizado para la experimentación se preparó según el Ejemplo 2, luego se derivatizó al 35% mol/mol, la dosis, administrada por vía oral, fue igual a 88,5 mg/kg de conjugado (16,2 mg de carnosina y 72,3 mg de HA).

Grupo 3: Mezcla de MIA + HA/carnosina: los animales fueron tratados mediante inducción de MIA y posteriormente con HA/carnosina cada 24 horas a partir del tercer día después de MIA hasta el día 20. Esta preparación consistió en una mezcla de sal sódica de HA mezclada con carnosina en agua, administrada por vía oral a una dosis de 16,2 mg/kg de carnosina con 72,3 mg/kg de HA.

Grupo 4: MIA + naproxeno: los animales fueron tratados mediante inducción de MIA y posteriormente con naproxeno administrado por vía oral a una dosis de 10 mg/kg cada 24 horas a partir del tercer día después de MIA hasta el día 20.

Evaluación histológica

Al final del período de experimentación, es decir, el día 21 desde el comienzo de la inducción de MIA, se sacrificaron los animales, se retiraron las patas tratadas (incluidas las articulaciones de las rodillas) y se fijaron en formalina al 10%. Posteriormente se descalcificaron y se empaparon en parafina para la preparación de secciones de microtomo de 5 μ m y luego se tiñeron con hematoxilina/eosina. El análisis con microscopio óptico se realizó siguiendo una puntuación histológica modificada de Mankin, con un intervalo de puntuación de 0 a 12, es decir, desde una organización celular normal hasta una desorganización completa e hipocelularidad; (Mankin HJ et al., J Bone Joint Surg Am., 1971, 53 (3): 523-537).

Resultados:

El examen histológico de las muestras del grupo 1 mostró irregularidades en la organización de los tejidos con fibrilación de la capa superficial, celularidad reducida y degeneración de la capa cartilaginosa. El tratamiento oral con el conjugado de HA/carnosina redujo muy significativamente el daño histológico y la degeneración del cartílago, totalmente comparable al efecto provocado por el naproxeno (AINE conocido de eficacia documentada), mientras que el tratamiento con la mezcla de HA/carnosina no condujo a ninguna mejora histológica con respecto a las muestras no tratadas del Grupo 1 (MIA-control) (Figura 7).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de ácido hialurónico (HA)/carnosina con un enlace amida directo entre el grupo carboxilo del ácido hialurónico y el grupo amino de la carnosina para su uso en la prevención y el tratamiento de la osteoartritis y el tratamiento de la artritis reumatoide (RA), en la que el grado de derivatización de los grupos carboxilo de HA con carnosina oscila entre 30 y 60% y el peso molecular promedio de HA oscila entre 1×10^5 Da y 1×10^6 Da.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el conjugado de ácido hialurónico (HA)/carnosina se obtiene conjugando covalentemente el dipéptido de carnosina con ácido hialurónico mediante la formación de un enlace amida directo entre el carboxilo de HA y el grupo amina de carnosina, con un grado de derivatización, es decir, amidación, de los grupos carboxilo de HA con carnosina que varía dentro del intervalo de $35 \pm 3\%$ o $45 \pm 5\%$ y mezclas de los mismos.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que el peso molecular promedio de HA oscila dentro del intervalo de 130-220 kDa o 500-750 kDa y mezclas de los mismos.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en la que el ácido hialurónico utilizado para la preparación del derivado de amida de HA con carnosina es la sal sódica de HA o la sal de tetrabutilamonio de HA.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores para aplicación tópica, oral, intra-articular, parenteral o quirúrgica.
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, asociada a sustancias farmacológicas y/o biológicamente activas y/o a sistemas de liberación controlada de fármacos y/o polímeros naturales o polímeros de naturaleza sintética.

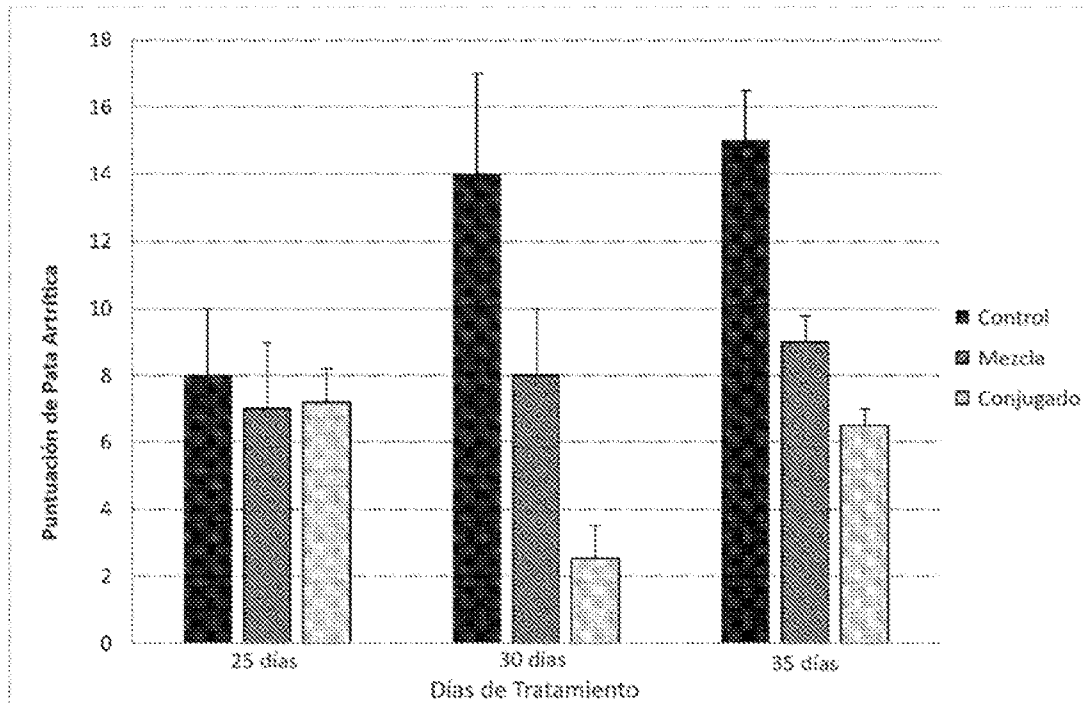


Fig. 1

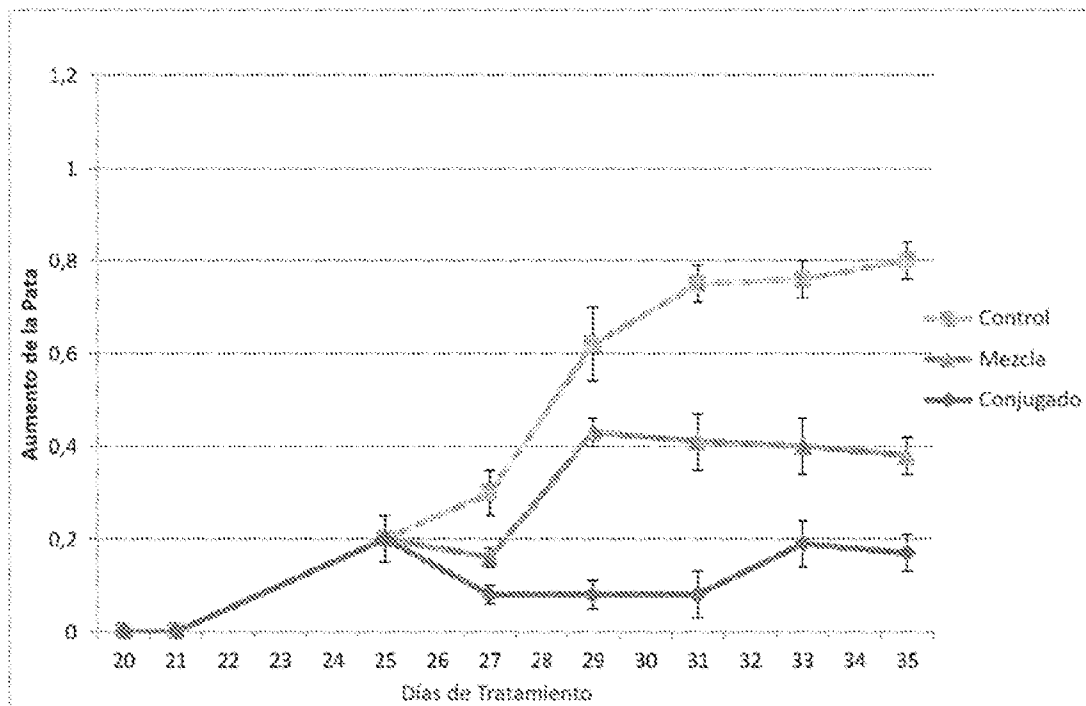


Fig. 2

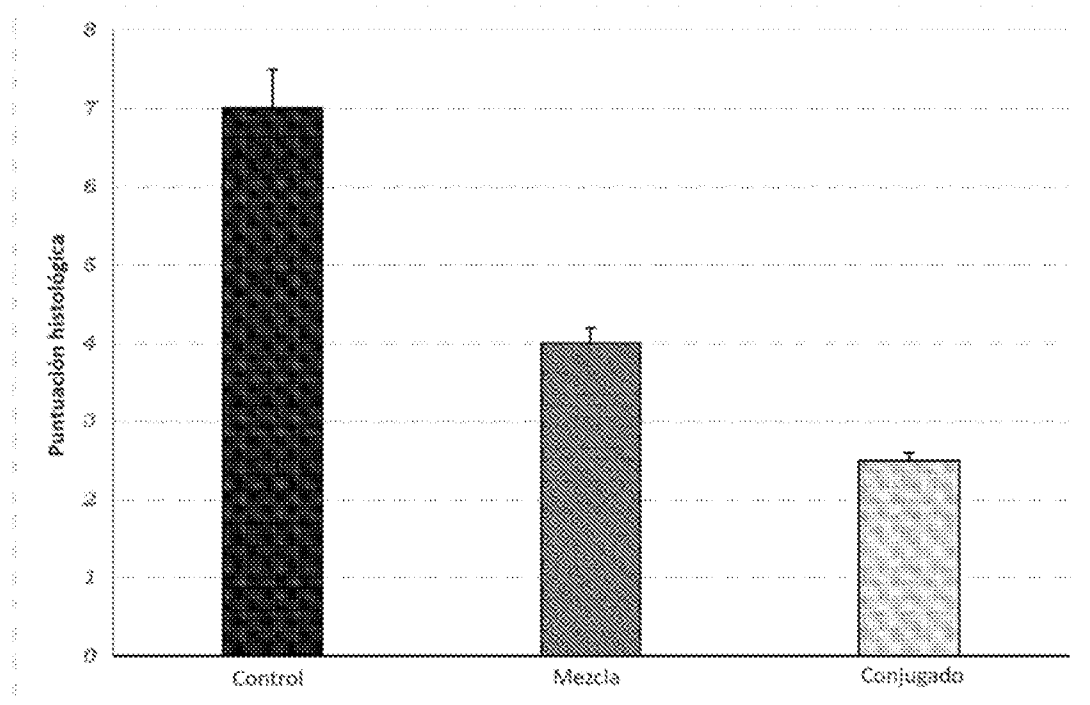


Fig. 3

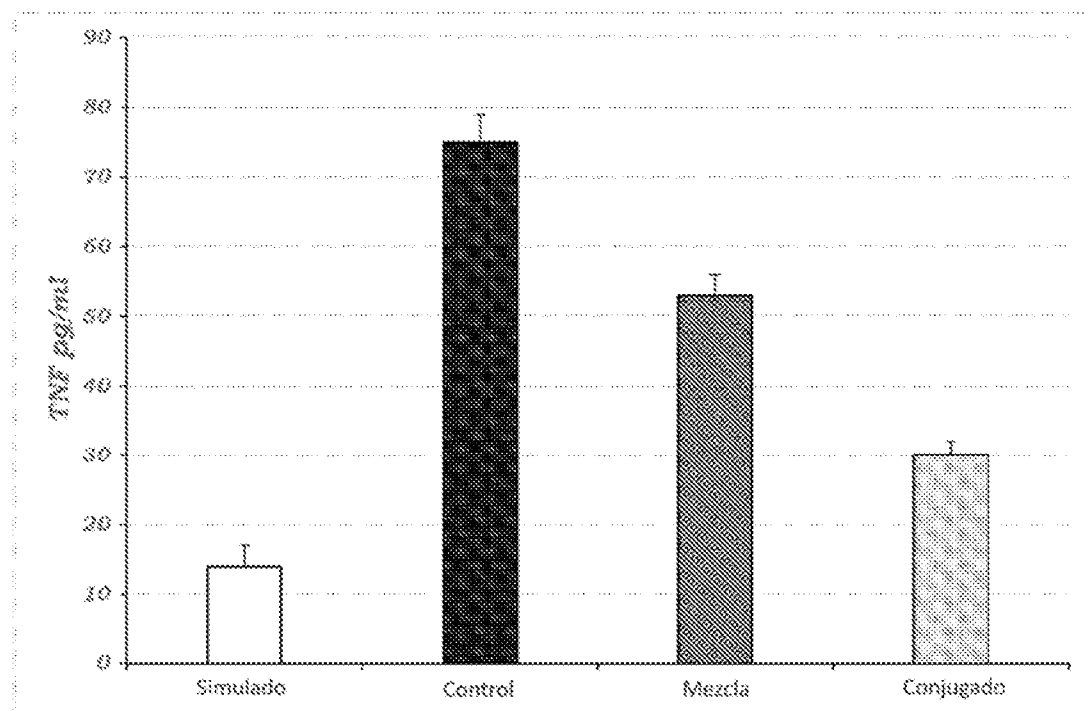


Fig. 4

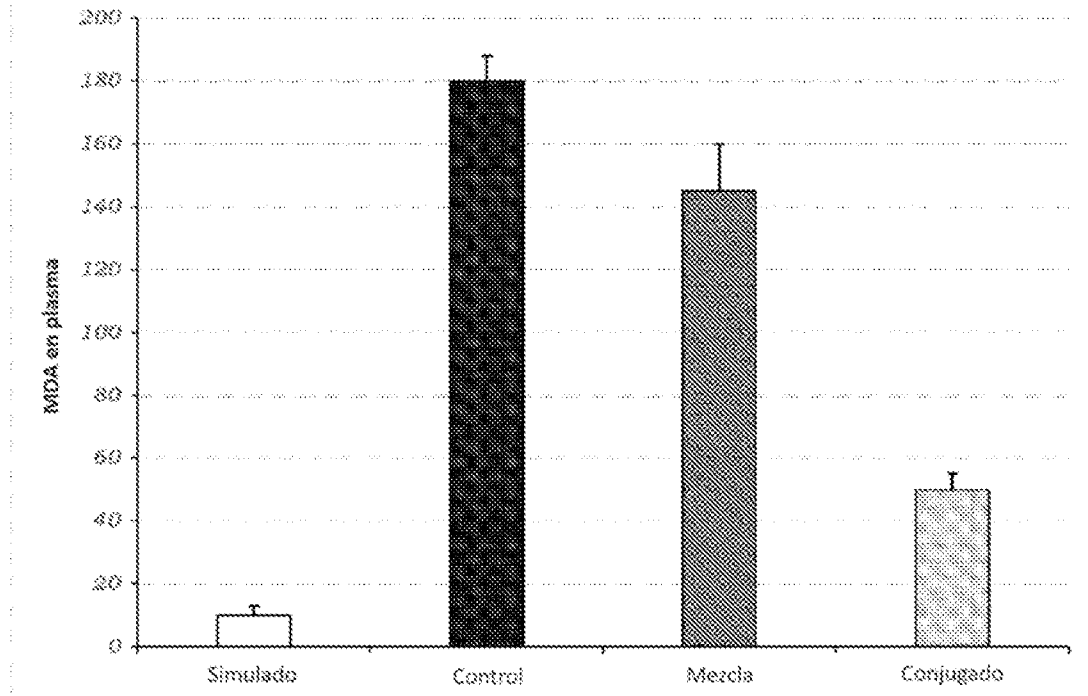


Fig. 5

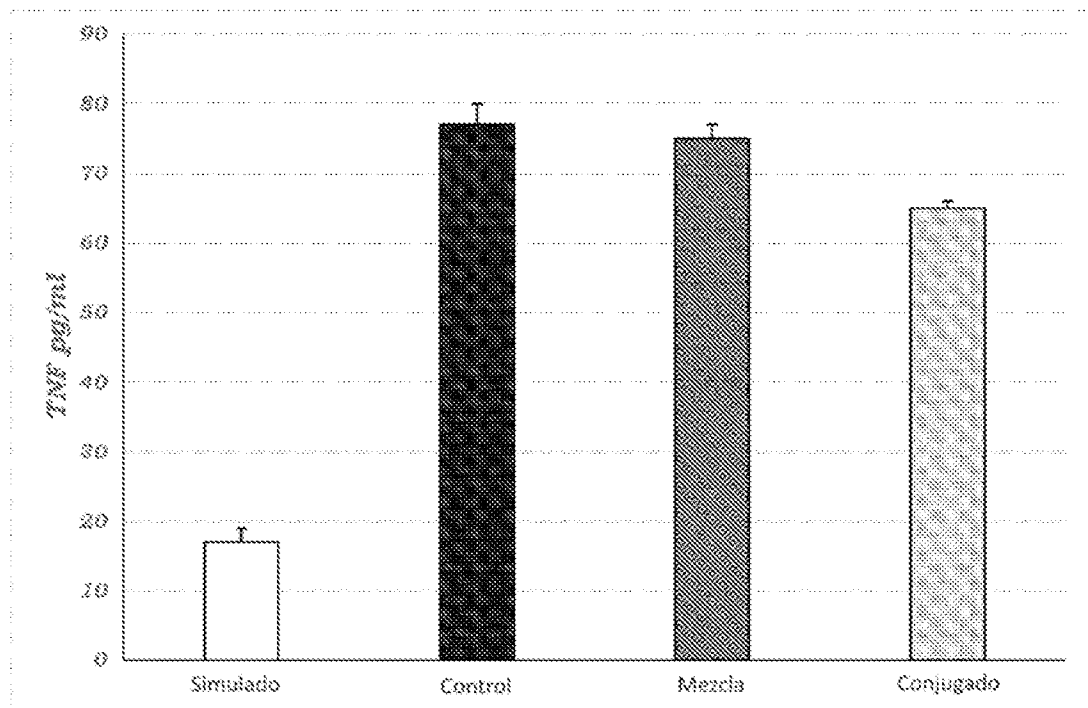


Fig. 6

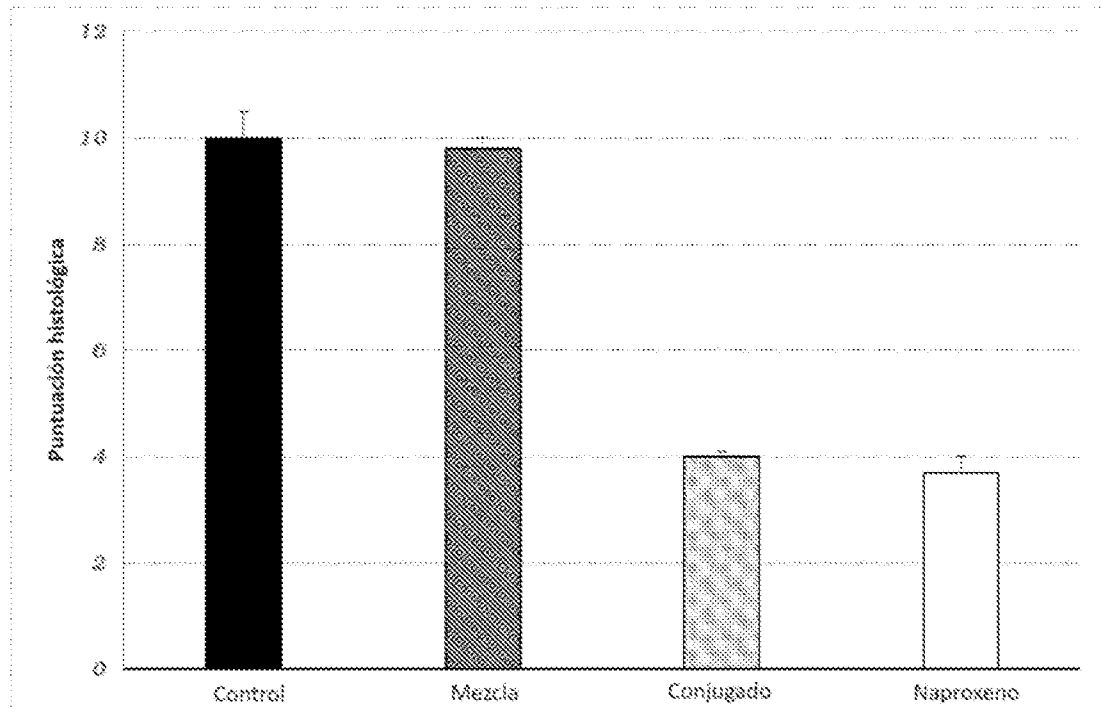


Fig. 7