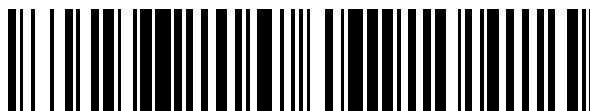


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 888 648**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 31/726 (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)
A61K 47/61 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2016** **PCT/IB2016/051960**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016** **WO16162809**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2016** **E 16726940 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.06.2021** **EP 3280396**

54 Título: **Ésteres de glicosaminoglicanos, procedimientos para su preparación y su uso en formulaciones para uso oftálmico**

30 Prioridad:

07.04.2015 IT FI20150102

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.01.2022

73 Titular/es:

HYALBLUE S.R.L. (100.0%)
Vía Cavour, 2
22074 Lomazzo, IT

72 Inventor/es:

BARICORDI, NIKLA y
MERIGHI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 888 648 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

Ésteres de glicosaminoglicanos, procedimientos para su preparación y su uso en formulaciones para uso oftálmico

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los productos para uso oftálmico, en particular a los glicosaminoglicanos esterificados útiles para proteger los ojos de la luz azul.

Antecedentes de la técnica

Como se sabe, la luz eléctrica tiene un fuerte impacto en el ritmo circadiano; en particular, la luz artificial que llega a la retina entre el anochecer y el amanecer inhibe la acción de las neuronas que promueven el sueño, activa la producción de orexina en el hipotálamo y suprime la liberación nocturna de melatonina, fenómenos que dan como resultado la reducción de la somnolencia, aumento del estado de alerta e interferencias con el sueño.

Estudios realizados por Czeisler ("Casting light on sleep deficiency" *Nature*, 497, S13, 2013) muestran que el 30% de los trabajadores de oficina estadounidenses y el 44% de los trabajadores nocturnos se quejan de que duermen, en promedio, menos de 6 horas por noche, mientras que solo el 3% de la población adulta estadounidense dormía tan poco en 1960. Además, el artículo señala que los dispositivos optoelectrónicos con diodos emisores de luz (LED), tales como televisores, pantallas de ordenador, ordenadores portátiles, tabletas y teléfonos móviles, utilizan un tipo de luz blanca que es rica en luz azul. Las ipRGC (células ganglionares fotosensibles), que se encuentran en el ojo, son más sensibles a la luz que es visible a bajas longitudes de onda (azul y verde), dice Czeisler, por lo tanto, la exposición a los LED en las horas nocturnas generalmente provoca una mayor interrupción del ritmo circadiano, secreción de melatonina y sueño en comparación con la exposición nocturna a la luz de las bombillas.

Estudios adicionales, realizados por Masuda y Watanabe ((Short Wavelength Light-Induced Retinal Damage in Rats. *Jpn J. Ophthalmol.*, 44:615-619, 2000) mostraron que la luz a longitudes de onda de 350 nm provoca daño en las células fotorreceptoras, mientras que la luz a longitudes de onda de 441 nm daña el epitelio pigmentario de la retina. En un artículo titulado "Evaluation of Blue-Light Hazards from Various Light Sources", 2002, *Progress in lens and Cataract Research*, Tsutomu Okuno destaca que una exposición promedio de 270 segundos al día a la luz azul de los LED puede provocar daños fotoquímicos en la retina.

Este tipo de daño a la retina ha sido estudiado por Elawady A. Ibrahim ((Neuroprotective Effects of Grape Seeds against Photo-Chemical Damage-Induced Retinal Cell Death. *Nature and Science* 9(11):83-89, 2011): sostiene que la exposición prolongada a la luz azul daña permanentemente las neuronas de la retina. Roehlecke *et al.* (Influence of blue light on photoreceptors in a live retinal explants system. *Molecular Vision* 17: 876-884, 2011) también informaron de estudios *in vitro* en los que la irradiación de luz azul en trasplantes de retina produce cambios ultraestructurales que implican necrosis de las células fotorreceptoras.

Recientemente, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la irradiación de luz azul a 470 nm afecta al sistema nervioso central, puede provocar el restablecimiento completo del ritmo circadiano (Jones - Manipulating circadian clock neuron firing rate resets molecular circadian rhythms and behavior - *Nature Neuroscience*, Publicación anticipada virtual).

Aunque existen en el mercado protecciones físicas frente a la luz azul (tal como gafas y pantallas para monitores), estas soluciones suelen ser voluminosas o caras.

Además, aunque para este propósito están disponibles lentes de contacto, estas últimas implican los mismos efectos secundarios (por ejemplo, hiperemia, infecciones oculares, úlceras corneales) que las lentes convencionales.

También se sabe que los carotenoides son una clase de compuestos orgánicos presentes en plantas y otros organismos fotosintéticos. Por lo general, se dividen en dos clases, dependiendo de la presencia o ausencia de átomos de oxígeno en la molécula: la primera es la de las xantofilas, mientras que la última comprende los carotenos. El color de estas moléculas varía de amarillo claro a rojo brillante dependiendo del tipo de longitudes de onda absorbidas y reflejadas.

Se ha documentado ampliamente que una dieta basada en carotenoides protege del daño provocado por los radicales libres ya que estos compuestos, ricos en dobles enlaces PI, pueden oxidar y eliminar especies nocivas del cuerpo.

Los productos de degradación oxidativa, denominados apocarotenoides, son en muchos casos moléculas con efectos beneficiosos adicionales, como en el caso de la vitamina A (retinol, ácido retinoico, retinal), bixina y crocetina.

Los apocarotenoides son capaces de absorber luz azul, como en el caso de la bixina (*Food Chemistry* 141; 4: 3906-3912, 2013) y crocina, el éster de crocetina. Aicha Laabich *et al* "Protective Effect of Crocine against Blue Light and White Light-Mediated Photoreceptor Cell Death in Bovine and Primate Retinal Primary Cell Culture", (*Investigative. Ophthalmology. & Visual Science*, vol. 47, n.º 7, 1 de julio de 2006 página 3156-3163 da a conocer un efecto protector del apocarotenoide crocetina frente a la muerte de células fotorreceptoras mediada por luz azul y luz blanca en cultivos de células primarias de retina de primates y bovinos.

Hasta la fecha, no existen en el mercado compuestos químicos capaces de garantizar una protección eficaz de los ojos frente a la luz azul; el documento WO 2004/063364 describe ésteres retinoicos de ácido hialurónico como productos útiles para la diferenciación de células madre totipotentes. Por otro lado, también se sabe que las gotas oculares no son métodos óptimos para la administración de principios activos, ya que tienen baja biodisponibilidad y, por tanto, están sujetos a una baja respuesta terapéutica, principalmente debido a la presencia, en el ojo, de sistemas de drenaje: por esta razón, productos de este tipo requieren múltiples aplicaciones para lograr el efecto terapéutico deseado.

El interés en desarrollar compuestos que sean capaces de proteger los ojos del daño causado por la radiación azul se desprende de lo anterior.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención permite superar los inconvenientes antes mencionados con nuevos ésteres de glicosaminoglicanos, en donde al menos parte de los grupos hidroxilo presentes en el residuo de N-acetilglucosamina están esterificados con un apocarotenoide, en donde dicho glicosaminoglicano es: ácido hialurónico y dicho apocarotenoide se selecciona de: crocetina y bixina. El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones; cualquier otra divulgación en la presente descripción se proporciona únicamente con fines de referencia.

El glicosaminoglicano dado a conocer en el presente documento se refiere a, por ejemplo: ácido hialurónico, condroitín sulfato, heparina, heparán sulfato; se prefiere ácido hialurónico.

Entre los apocarotenoides dados a conocer en el presente documento se puede mencionar: ácido retinoico, crocetina, bixina, ácido abscísico.

El ácido hialurónico (en lo sucesivo, HA) es un polisacárido lineal natural que consiste en residuos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina en unidades repetidas.

El HA puede utilizarse en forma pura como fármaco para los trastornos que surgen del síndrome del ojo seco, tal como la queratoconjuntivitis seca, tal como lo describe DeLuise (Annals of Ophthalmology 16: 823-824, 1984), Laflamme (Canadian Journal of Ophthalmology 23: 174-176, 1988) y Sand (Acta Ophthalmologica 67: 181-183, 1989).

Se observa que según la presente invención, a diferencia de lo que ocurre en otras gotas oculares, el ácido hialurónico no se usa como excipiente sino que forma un nuevo producto químico al reaccionar con el apocarotenoide.

Los productos según la presente invención pueden prepararse según procedimientos conocidos en la técnica; en particular siguiendo el procedimiento descrito en el documento US 20090239822.

Por ejemplo, en primer lugar se prepara una sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA) salificando una resina de intercambio iónico (tal como Amberlite®) con una solución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio (TBAI) que se percola sobre la resina dispuesta en una columna cromatográfica.

Una vez que ha pasado toda la solución, la resina se lava con agua y luego se pasa una solución de hialuronato de sodio disuelto en agua sobre la resina salificada y finalmente se recoge el eluido y se liofiliza.

Normalmente, la solución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio tiene una concentración del 15-45%, preferiblemente del 30-40%, más preferiblemente del 40%; mientras que la solución de hialuronato de sodio en agua normalmente tiene una concentración de 1,5-4,5 g/l, preferiblemente 3 g/l.

La sal (HA-TBA) obtenida tal como se describió anteriormente se hace reaccionar luego con el apocarotenoide seleccionado con calentamiento. La función carboxilo del apocarotenoide se activa por reacción con carbonildiimidazol a temperatura ambiente; el compuesto resultante se añade lentamente al gel HA-TBA en dimetilformamida.

La mezcla se deja bajo agitación entre 25 y 35°C durante 12-20 h, luego se precipita el producto mediante la adición de cloruro de sodio y etanol.

El grado de sustitución de apocarotenoide en los ésteres según la invención es del 0,1-5%, donde el término "grado de sustitución" indica el número de moles de apocarotenoide por mol de glicosaminoglicano.

Los ésteres según la invención tienen normalmente un peso molecular de 350.000 - 2.000.000 Daltons, lo que indica el peso molecular promedio del glicosaminoglicano sin considerar la contribución del residuo apocarotenoide.

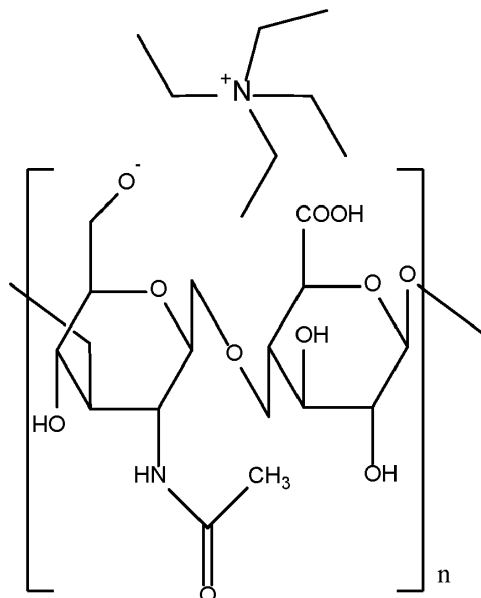
Los compuestos según la presente invención pueden formularse en las formas conocidas en la farmacopea como adecuadas para la administración ocular.

Por ejemplo, pueden formularse como una solución al 0,1-1% de compuesto en agua purificada, con la posible adición de polietilenglicoles para aumentar la viscosidad y cloruro de benzalconio o clorhexidina como conservantes (alternativamente, puede considerarse el envasado de dosis única).

Los ejemplos siguientes ilustran lo que se reivindica con mayor detalle.

Ejemplo 1

Preparación de la sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HA-TBA)



5 donde n está entre 250 y 5000.

Se utiliza una resina de intercambio iónico (Amberlite® en forma ácida), que tiene una capacidad de 1,9 eq/l.

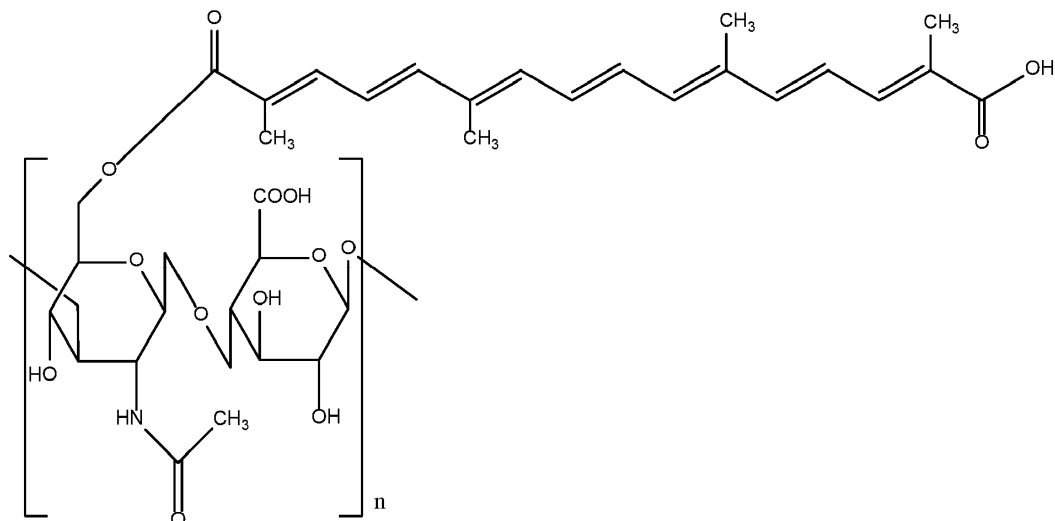
Se carga 1 l de resina en una columna cromatográfica y luego se lava con agua desmineralizada y luego se percola una solución acuosa de hidróxido de tetrabutilamonio (TBAI) al 40% sobre la resina desde arriba por medio de una bomba peristáltica.

10 Una vez que ha pasado toda la solución, la resina se lava con agua desmineralizada hasta que el eluido tenga un pH constante de 9,5-10.

Un litro de resina así salificada permite salificar aproximadamente 75-80 g de hialuronato de sodio. El hialuronato de sodio se disuelve en agua (concentración de aproximadamente 3 g/l) y el gel resultante se pasa a una columna que contiene la resina previamente preparada. El eluido se recoge y se liofiliza.

15 Ejemplo 2

Preparación de un éster de ácido hialurónico con crocetina



donde n está entre 250 y 5000

Se disuelven 1,5 g de HA-TBA en 500 ml de DMF en un reactor con termostato y se agita a 30°C.

Se disuelven 0,8 g de crocetina en 400 ml de DMF en un reactor protegido frente a la humedad y se añade 1 eq de N,N-carbonildiimidazol a la mezcla.

5 Después de 1 h, la solución se añade lentamente al gel de HA-TBA y la mezcla así obtenida se deja agitar a 30°C durante 16 h.

La reacción se detiene mediante la adición de 90 ml de solución saturada de cloruro de sodio. El producto se precipita mediante la adición de un volumen de etanol al 96%; se descarta el sobrenadante y el residuo filtrado se lava varias veces con etanol a diferentes concentraciones y luego se seca a vacío.

El producto resultante tiene un grado de sustitución del 0,5%.

10 Ejemplo 3

Preparación de un éster de ácido hialurónico con crocetina

Se disuelven 1,5 g de HA-TBA en 500 ml de DMF en un reactor con termostato y se agita a 30°C.

Se disuelven 0,4 g de crocetina en 200 ml de DMF en un reactor protegido frente a la humedad y se añade 1 eq de N,N-carbonildiimidazol a la mezcla.

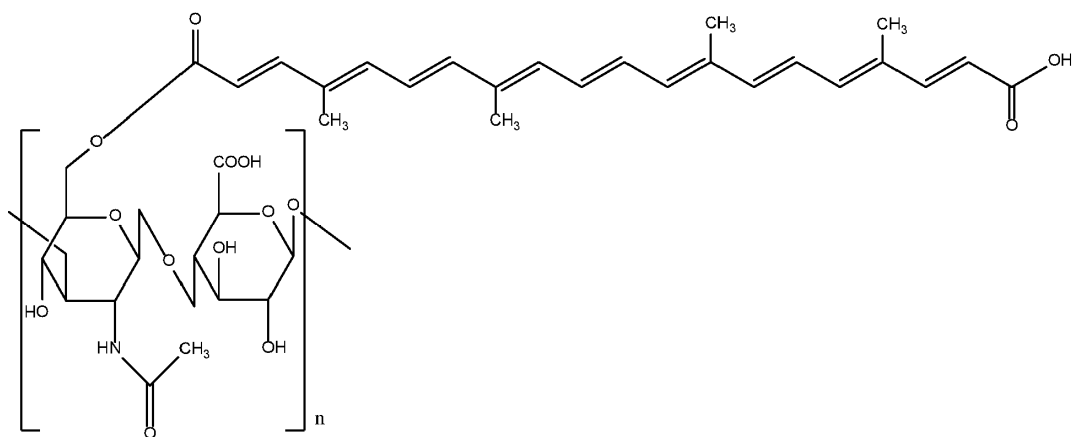
15 Después de 1 h, la solución se añade lentamente al gel de HA-TBA y la mezcla así obtenida se deja agitar a 30°C durante 16 h.

La reacción se detiene mediante la adición de 70 ml de solución saturada de cloruro de sodio. El producto se precipita mediante la adición de un volumen de etanol al 96%; se descarta el sobrenadante y el residuo filtrado se lava varias veces con etanol a diferentes concentraciones y luego se seca a vacío.

20 El producto resultante tiene un grado de sustitución del 0,25%.

Ejemplo 4

Preparación de un éster de ácido hialurónico con bixina



donde n está entre 250 y 5000

25 Se disuelven 1,5 g de HA-TBA en 500 ml de DMF en un reactor con termostato y se agita a 30°C.

Se disuelven 0,95 g de bixina en 450 ml de DMF en un reactor protegido frente a la humedad y se añade 1 eq de N,N-carbonildiimidazol a la mezcla.

Después de 1 h, la solución se añade lentamente al gel de HA-TBA y la mezcla así obtenida se deja agitar a 30°C durante 16 h.

30 La reacción se detiene mediante la adición de 90 ml de solución saturada de cloruro de sodio. El producto se precipita mediante la adición de un volumen de etanol al 96%; se descarta el sobrenadante y el residuo filtrado se lava varias veces con etanol a diferentes concentraciones y luego se seca a vacío.

El producto resultante tiene un grado de sustitución del 0,4%.

Ejemplo 5

Preparación de un éster de ácido hialurónico con bixina

Se disuelven 1,5 g de HA-TBA en 500 ml de DMF en un reactor con termostato y se agita a 30°C.

Se disuelven 0,5 g de bixina en 250 ml de DMF en un reactor protegido frente a la humedad y se añade 1 eq de N,N-carbonildiimidazol a la mezcla.

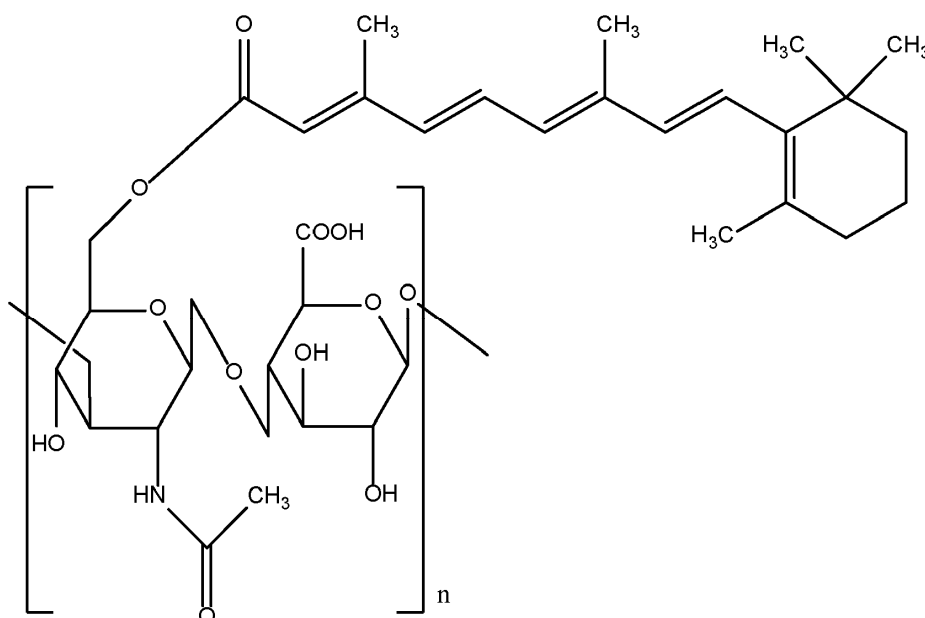
- 5 Después de 1 h, la solución se añade lentamente al gel HA-TBA y la mezcla así obtenida se deja agitar a 30°C durante 16 h.

La reacción se detiene mediante la adición de 80 ml de solución saturada de cloruro de sodio. El producto se precipita mediante la adición de un volumen de etanol al 96%; se descarta el sobrenadante y el residuo filtrado se lava varias veces con etanol a diferentes concentraciones y luego se seca a vacío.

- 10 El producto resultante tiene un grado de sustitución del 0,15%.

Ejemplo 6

Preparación de un éster de ácido hialurónico con ácido retinoico, no según la invención



donde n está entre 250 y 5000.

- 15 Se disuelven 1,5 g de HA-TBA en 500 ml de DMF en un reactor con termostato y se agita a 30°C.
- Se disuelven 0,7 g de ácido retinoico en 350 ml de DMF en un reactor protegido frente a la humedad y se añade 1 eq de N,N-carbonildiimidazol a la mezcla.
- Después de 1 hora, la solución se añade lentamente al gel HA-TBA y la mezcla así obtenida se deja agitar a 30°C durante 16 h.
- 20 La reacción se detiene mediante la adición de 90 ml de solución saturada de cloruro de sodio. El producto se precipita mediante la adición de un volumen de etanol al 96%; se descarta el sobrenadante y el residuo filtrado se lava varias veces con etanol a diferentes concentraciones y luego se seca a vacío.
- El producto resultante tiene un grado de sustitución del 0,2%.

REIVINDICACIONES

1. Ésteres de glicosaminoglicanos, en donde al menos parte de los grupos hidroxilo presentes en el residuo de N-acetilglucosamina están esterificados con un apocarotenoide, en donde dicho glicosaminoglicano es: ácido hialurónico y dicho apocarotenoide se selecciona de: crocetina y bixina.
- 5 2. Ésteres de glicosaminoglicanos según la reivindicación 1, en donde el apocarotenoide es bixina.
3. Ésteres según la reivindicación 1, en donde el grado de sustitución del apocarotenoide en los ésteres es de desde el 0,1 hasta el 5% y el peso molecular de dichos ésteres es de desde 350.000 hasta 2.000.000 Daltons.
4. Ésteres de glicosaminoglicanos según las reivindicaciones 1 y 2, para su uso en la protección de los ojos de la luz azul.
- 10 5. Formulaciones para proteger los ojos de la luz azul, que comprenden al menos un éster según las reivindicaciones 1 y 2.
6. Formulaciones según la reivindicación 5, en donde dichas formulaciones están en forma de una solución de compuesto al 0,1-1% en agua purificada, posiblemente en presencia de polietilenglicoles, cloruro de benzalconio o clorhexidina.
- 15 7. Formulaciones según las reivindicaciones 5 o 6 en forma de gotas oculares.