

Castillo Grau & Asociados

ABOGADOS

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMECIO
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Bogotá, D.C.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-106866-00009-0000

Fecha: 2013-02-15 16:01:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 14 24

Re: Expediente No. 09 – 106.866
Solicitud de Patente de Invención
"COMPLEJO ASOCIADO DE UN DERIVADO
ORGANICO DEL SILICIO CON FRAGMENTOS
CALIBRADOS DE ACIDO HIALURONICO PARA
UNA ACCION PREVENTIVA PREPARADORA
DE LAS DEGRADACIONES CUTANEAS"
EXSYMOL S.A.M.
RECURSO DE REPOSICION

Actuando en mi calidad de apoderado de la sociedad **EXSYMOL S.A.M.**, domiciliada en 98000 Mónaco, Principado de Mónaco, por medio del presente escrito me permito manifestarle que, obrando dentro del término legal, interpongo RECURSO DE REPOSICION ante el Superintendente de Industria y Comercio, contra la Resolución No. **78979** del 20 de Diciembre de 2012 , proferida por esa Dependencia dentro del Expediente de la referencia y por medio de la cual, Negó la Patente de Invención denominada "COMPLEJO ASOCIADO DE UN DERIVADO ORGANICO DEL SILICIO CON FRAGMENTOS CALIBRADOS DE ACIDO HIALURONICO PARA UNA ACCION PREVENTIVA PREPARADORA DE LAS DEGRADACIONES CUTANEAS"

OBJETO DE ESTE RECURSO

- 1.- Que se REVOQUE el Artículo Primero de la Resolución No. **78979** del 20 de Diciembre de 2012, por medio del cual, se Niega la Patente de Invención denominada "COMPLEJO ASOCIADO DE UN DERIVADO ORGANICO DEL SILICIO CON FRAGMENTOS CALIBRADOS DE ACIDO HIALURONICO PARA UNA ACCION PREVENTIVA PREPARADORA DE LAS DEGRADACIONES CUTANEAS"
- 2.- Que en su reemplazo se dicte la Resolución que CONCEDA la Patente de Invención denominada "COMPLEJO ASOCIADO DE UN DERIVADO ORGANICO DEL SILICIO CON FRAGMENTOS CALIBRADOS DE ACIDO HIALURONICO PARA UNA ACCION PREVENTIVA PREPARADORA DE LAS DEGRADACIONES CUTANEAS" a favor de la sociedad **EXSYMOL S.A.M.**



Este recurso se fundamenta en los siguientes:

HECHOS

PRIMERO: El 30 de Septiembre de 2009, se presentó solicitud de Patente de Invención titulada "COMPLEJO ASOCIADO DE UN DERIVADO ORGANICO DEL SILICIO CON FRAGMENTOS CALIBRADOS DE ACIDO HIALURONICO PARA UNA ACCION PREVENTIVA PREPARADORA DE LAS DEGRADACIONES CUTANEAS" a nombre de la sociedad **EXSYMOL S.A.M.**, solicitud a la que se le asignó el número de expediente **09 – 106.866**.

SEGUNDO: El extracto de la solicitud fue publicado en la Gaceta de Propiedad Industrial No. 626 de 22 de Marzo de 2011, y no se presentaron oposiciones a la solicitud.

TERCERO: Mediante oficio No. 14688 del 16 de Agosto de 2012, se realizó un requerimiento a la solicitud en aplicación del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones.

CUARTO: El 13 de Noviembre de 2012, dentro del término legal, mi poderdante dio respuesta al requerimiento formulado y presentó nuevas reivindicaciones.

QUINTO: Que mediante Resolución No. **78979** de 20 de Diciembre de 2012 el Superintendente de Industria y Comercio Negó la Patente de Invención denominada "COMPLEJO ASOCIADO DE UN DERIVADO ORGANICO DEL SILICIO CON FRAGMENTOS CALIBRADOS DE ACIDO HIALURONICO PARA UNA ACCION PREVENTIVA PREPARADORA DE LAS DEGRADACIONES CUTANEAS"

Considera el Superintendente que la solicitud de patente de invención incumple con el requisito de nivel inventivo, por lo cual, no puede ser concedida. Adicionalmente, considera:

"(...) En el presente caso, los compuestos reclamados en la solicitud no tienen nivel inventivo, teniendo en cuenta que la reivindicación 1 refiere "un complejo a base de un derivado orgánico de silicio que se caracteriza en que dicho derivado se combina con uno o varios fragmentos calibrados de ácido hialurónico con un peso molecular comprendido entre los 150 y 600 kDa, teniendo dicho derivado una fórmula general (I)"
(...) El documento D1 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 11 porque divulga una serie de combinaciones de componentes que comprende derivado orgánico de silicio y ácido hialurónico (...)

(...) La interleuquina IL-1 y el TNF-alfa, mediadores inflamatorios, pueden inducir conjuntos de células articulares, tales como condrocitos y células sinoviales para producir citoquinas tales como IL-8 y IL-6, asimismo, estimula proteasas y prostaglandinas E2 (PGE²) que son capaces de generar una disminución notable de la síntesis proteica en hueso y piel. Por otra parte, se ha demostrado que la IL-1 y el TNF- α aumentan la resorción ósea osteoclastica in Vitro, de hecho, en el documento D2 se indica que el bloqueo de la IL-1 con un antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra) en fibroblastos sinoviales reduce los niveles de IL-6 y IL-8, pero no de TNF- α y que la adición de anticuerpos anti-TNF-alfa a células sinoviales reduce en gran medida la producción de otras citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, GM-CSF, IL-6 (Pág. 2, numeral 2.1, citoquinas proinflamatorias) causantes del envejecimiento de la piel, por lo anterior, para la persona del oficio normalmente versada en la materia es claro que el bloqueo de la actividad proinflamatoria de la IL-1 en fibroblastos sinoviales a través de fragmentos calibrados de HA asociados a derivados de silicio orgánico conduciría a la disminución de la secreción de otras citoquinas proinflamatorias como IL-6 y IL-8, por lo tanto este mecanismo resultaría efectivo para el control de la inflamación de esta línea celular.

En razón a lo expuesto, la persona del oficio normalmente versada en la materia tendría motivación o suficiente expectativa de éxito para seleccionar las combinaciones de componentes que comprende el ácido hialurónico de peso molecular entre 500-730kDa divulgadas en documento D1 de la manera como lo indica el documento D2 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Dado que las reivindicaciones 2 a 5 no presentan características técnicas esenciales que le confieran nivel inventivo frente a la reivindicación 1, también se considerará obvias (...)"

SEXTO: De acuerdo con lo anterior, considera el Despacho que la presente solicitud de Patente de Invención carece de nivel inventivo conforme lo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones el cual establece:

"Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica." (Subrayas fuera de texto).

Respetuosamente, los solicitantes no están de acuerdo, con esta afirmación del Examinador, conforme a las siguientes consideraciones:

1. El señor Examinador afirma que "Adicionalmente, el documento D2 refiere que las citoquinas proinflamatorias juegan un papel fundamental en la iniciación y desarrollo

del proceso de las enfermedades de la piel, en particular de la degradación cutánea y del envejecimiento (referencia 2)."

⇒ Aunque se hizo una lectura cuidadosa del Documento 2 (OsteoArthritis and Cartilage, 2005), previamente citado, no podemos leer las divulgaciones del Examinador que se citan arriba en el Documento 2 sobre el papel de las citoquinas en el desarrollo de enfermedades de la piel.

⇒ El señor Examinador también se refiere a una "(referencia 2)" pero cuando leemos dichas "(referencia 2)" en su encabezamiento ("*The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology*") y ante todo, su resumen (ver ANEXO A), parece obvio que esta (referencia 2) no trata ni con degradación cutánea ni con envejecimiento.

2. El señor Examinador también afirma: "La interleuquina IL-1 y el TNF-alfa, mediadores inflamatorios, pueden inducir conjuntos de células articulares, tales como condrocitos y células sinoviales para producir citoquinas tales como IL-8 y IL-6, asimismo, estimula.

..... de la síntesis proteica en hueso y piel. Por otra parte, se ha demostrado que la IL-1 y el TNF- α aumentan la resorción ósea osteoclástica in vitro, de hecho, en el DOCUMENTO D2 se indica que el bloqueo de la IL-1 con un antagonista del receptor IL-1 en fibroblastos sinoviales reduce los niveles de IL-6 y IL-8, pero no de TNF-alfa y , causantes del envejecimiento de la piel."

⇒ Nuevamente, luego de una cuidadosa lectura de este Documento 2, no podemos leer las divulgaciones que reporta el Examinador en el Documento 2 acerca del bloqueo de IL-1 con el antagonista del receptor IL-1 y las resultantes consecuencias en la piel.

⇒ Resulta muy difícil controvertir tal alegación cutánea sin respaldo bibliográfico reportado.

⇒ Por otra parte, el señor Examinador menciona correctamente al citar las expresiones "células articulares, tales como condrocitos y células sinoviales" y "resorción ósea", el Documento 2 se refiere claramente a cartilago óseo así

como a sus células constitutivas (condrocitos y células sinoviales). Sin embargo, consideramos que no es tan cierto que a partir del Documento 2, una persona versada en la técnica pueda hacer una extrapolación a la piel (como lo hace el señor Examinador) con los mismos eventos negativos, especialmente puesto que dicha persona versada en biología debe recordar que existen esenciales diferencias que distinguen un tejido conectivo (como el cartilago óseo objeto del Documento 2) de un tejido epitelial (como la epidermis cutánea objeto de la presente invención:

- El cartilago óseo está constituido de condorcitos en tanto que la epidermis cutánea está principalmente constituida de un tipo diferente de células (keratinocitos);
- El cartilago óseo es un tejido que no se regenera a sí mismo en tanto que la epidermis cutánea es un tejido dotado con un proceso de regeneración.

3. Estamos de acuerdo con el señor Examinador cuando considera la diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y la combinación de componentes revelados en D1 (GB 2159408A), sobre la "Característica C": peso molecular del ácido hialurónico.

Precisamente, con el fin de evitar una eventual ambigüedad), adjunto encontrará (ver ANEXO B) una respuesta del proveedor Japonés de ácido hialurónico (la compañía "Q.P. Co, Ltd. Japan", ver página 3, línea 21 de la patente GB 2159408A) que reporta que el ácido hialurónico que se menciona en dicha patente es verdadera y realmente un ácido hialurónico con un peso molecular alto (ver el reporte "1.0 million Da"), como el que se usa en el producto "D.S.H. CN® (1500-2200 kDa) objeto de la prueba comparativa 4 en la descripción de la presente solicitud.

4. Con respecto al problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención, mi representada considera pertinente presentar al señor Examinador un reformulación del mismo, en particular:

- **Mejorar ENORMEMENTE la eficacia de las actuales composiciones cosméticas basadas en ácido hialurónico (tales como las que se mencionan en el Documento 1).**

- Pero teniendo cuidado de evitar la acción INDESEABLE resultante de las reacciones típicas de daño enzimático (hialuronidasas) que:

- Ocurren naturalmente en la piel y degradan el ácido hialurónico ("HA"), y
- Resultan (por división) en la producción de pequeños fragmentos de HA para lo cual se reconoce un efecto adverso pro-inflamatorio.

5. El señor Examinador afirma que "En razón de lo expuesto, la persona del oficio normalmente versada en la materia, tendría motivación o suficiente expectativa de éxito para seleccionar las combinaciones de componentes que comprende el ácido hialurónico de peso molecular entre 500-730 kDa divulgadas en el documento D1 (D2) de la manera como lo indica el documento D2 (D1) para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia." (resaltado fuera de texto)

En primer lugar, tal combinación del Documento 2 con el Documento 1 sería más bien **DESFAVORABLE** con respecto al conocimiento general que dicha persona versada en la técnica tenga acerca de ácido hialurónico ("HA") en la fecha de solicitud de nuestra patente local (2009).

De hecho: las enseñanzas de la literatura reportan a la persona versada en la técnica, enfrentada al problema de **buscar** una composición cosmética mejorada basada en HA o en fragmentos de HA, que:

- Normalmente se observan efectos biológicos diferentes e incluso opuestos de acuerdo con la selección de fragmentos de HA con varios pesos moleculares.

- particularmente, que fragmentos de HA con peso molecular alto sí se comportan de manera diferente en comparación con fragmentos de HA con peso molecular bajo o medio.

- Como soporte de lo anterior reproducimos un párrafo del texto de la presente solicitud:

"Y la conclusión de todos estos trabajos es en general unánime, a saber: que el HA fragmentado posee un comportamiento diferente del HA nativo, y que según el tamaño de los fragmentos, es decir su peso molecular, se observan efectos biológicos diferentes, hasta incluso opuestos (Noble P.W., Matrix Biol. (2002), vol. 21, pp. 25-29; Asari A., GlycoForum/Hyaluronan Today (2005), capítulo 29 et referencias citadas)."

- Y anexamos la referencia bibliográfica citada en el mismo "(Noble P.W., Matrix Biol. (2002)" (ver ANEXO C)

♦ ✓ Como consecuencia, con este conocimiento sobre diferentes efectos biológicos de acuerdo con los fragmentos de HA de diferentes pesos moleculares:

- Consideramos que esta podría ser una primera señal para ilustrar que la persona versada en la técnica (en su búsqueda de una composición cosmética mejorada basada en HA) estaría bastante desmotivada para considerar sustituir el HA de peso molecular alto (tal como se menciona en el Documento 1) por los fragmentos de HA de 500-730 kDa (tal como se menciona en el Documento 2), debido a que el Documento D2 trata con fragmentos de HA cuyo peso molecular no cae con el tamaño del ácido hialurónico que se utiliza en el Documento 1.
- Consideramos éste como un argumento que permite descartar la asociación (fragmentos de HA de 500-730 kDa (según el Documento 2) asociados con los compuestos órgano-silicio (según el Documento 1)) que el señor Examinador intenta presentar como obvia cuando objeta la naturaleza inventiva del complejo, tal como se define en la reivindicación 1.

6. El señor Examinador rechaza nuestro argumento anterior sobre el efecto citoestimulante cuando cita y opone una nueva publicación de 1988 titulada "*Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture*", conforme con el siguiente párrafo de la Resolución:

"En referencia al argumento de la solicitante, según el cual el efecto técnico de la invención no solo se refiere a evitar el efecto adverso pro-inflamatorio de los pequeños fragmentos de ácido hialurónico (...) sino que también a potenciar el efecto citoestimulante de los fragmentos de ácido hialurónico de peso molecular débil o mediano. Es pertinente señalar que la persona del oficio normalmente versada en la

materia concluiría sin dificultad que la inclusión de ácido hialurónico en la composición farmacéutica, debido a su efecto citoestimulante, favorecería un efecto citoestimulante porque este efecto ya estaba divulgado y reconocido, como lo refiere por ejemplo el documento "Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture" en el que se menciona el efecto citoestimulante del HA sobre cultivos celulares epidermales en fase estacionaria (fibroblastos dermales de ratón) por lo tanto el efecto técnico atribuido a la invención no es sorprendente o inesperado". (subrayado fuera de texto)

6.1 Luego de analizar dicho (1988, autor: Yoneda y otros), lo que REALMENTE podemos leer (ver ANEXO D) es:

- Como "sustancias exógenas" (ver página 266, segunda línea, columna derecha), queremos llamar la atención del señor Examinador sobre que lo que realmente ha sido probado es un ácido hialurónico de peso molecular igual a $9.5 \cdot 10^5$ (o 950 kDa), el cual se debe considerar como un ácido hialurónico de peso molecular alto puesto que está muy cercano a 1000 kDa (como el que se utiliza en el Documento 1). Por lo tanto, estimamos que las conclusiones del señor Examinador sobre dicho ácido hialurónico alto no pueden aplicarse automáticamente a la reivindicación 1 de la presente solicitud con un complejo basado en fragmentos de ácido hialurónico comprendidos entre 150 y 600 kDa (y por ello, sin interferencia con el tamaño arriba mencionado de cerca de 1000 kDa), más aún teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto sobre que la literatura enseña que efectos biológicos diferentes y opuestos son observados usualmente de acuerdo con el HA o fragmentos de HA con pesos moleculares diferentes.

6.2 Adicionalmente, queremos resaltar que en el artículo de Yoneda solo se revela (ver ANEXO D) que:

- Ver resumen: "el ácido hialurónico promovió O inhibió el crecimiento celular" (y no exclusivamente para promover el crecimiento celular como señor el Examinador únicamente menciona en el párrafo transcrito: "este efecto (citoestimulante) ya estaba divulgado y reconocido en la técnica anterior");
- Ver resumen y páginas 266 + 271: "el ácido hialurónico puede actuar como un MODULADOR de proliferación de fibroblasto dermal en ratón";
- Aún en la misma página 271 se hace mención acerca del ácido hialurónico introducido de manera exógena que (contrario a la afirmación del

Examinador) "el ácido hialurónico exógeno más bien **INHIBE** la proliferación celular cuando se agrega a cultivos celulares";

- Además, esto estaría en concordancia con la referencia mencionada en la página 272 del artículo de Yoneda, donde podemos leer el título del artículo de Goldberg con "HYALURONATE INHIBITION OF CELL PROLIFERATION (1987") (ver mención subrayada en el ANEXO D).

7. Insistimos en que el señor Examinador mire con más detenimiento las pruebas 1 y 4 en el texto de la presente solicitud, debido a que:

- Por ejemplo, los resultados en la tabla 4 [ver prueba 4] claramente demuestran que:

- No hay proliferación celular de queratinocitos cuando el producto "D.S.H. CN®" (que corresponde a una asociación de un compuesto órgano-silicio (silanol) con un tamaño de ácido hialurónico de peso molecular ALTO (superior a 100 kDa) como el que se menciona en el Documento 1) fue probado en epidermis humana (reconstruida), con un % de citoestimulación igual al 0%

- Aquí hay una alta proliferación celular de queratinocitos cuando el "complejo MSH" (con un tamaño de ácido hialurónico comprendido entre 150 kDa y 600 kDa) fue probado en la misma epidermis humana, con un % de citoestimulación igual al 69,5%

- Por ejemplo, los resultados en la tabla 1 [ver prueba 1] claramente demuestran que:

- Existe una débil proliferación celular de queratinocitos cuando fragmentos de HA de 150-600 kDa fueron probados en epidermis humana (reconstruida) a la concentración de 5%, con solo un % de citoestimulación igual al 28%

- Existe una proliferación celular de queratinocitos mucho más mejorada cuando el "complejo MSH" (con los mismos fragmentos HA de 150-600 kDa pero asociados al monometilsilanetriol) fue probado a la misma concentración de 5%, con un % de citoestimulación aumentada hasta 63%

- Con tales sorprendentes resultados, consideramos que estos datos también constituyen otras señales de la naturaleza inventiva de las presentes reivindicaciones de complejo y composición.

8. Por último, consideramos que en la decisión impugnada el señor Examinador ignoró totalmente lo que originalmente mencionamos como una "PROPIEDAD INESPERADA" (ver prueba 3 acoplada a la Fig. 1 + parágrafo asociado en la descripción). Por lo tanto, como complemento de nuestros anteriores argumentos, deseamos insistir nuevamente en las ventajas peculiares que lleva el complejo de la presente invención, ventajas que se resumen y sustentan la naturaleza inventiva de las reivindicaciones pendientes:

- ✓ Una sorprendente capacidad de nuestro complejo y composiciones derivadas para RETARDAR y LIMITAR la negativa acción catabólica del tejido cutáneo, dicha acción negativa que causa daño en el ácido hialurónico (con enzimas de hialuronidasa) de la piel y que lleva a dividir el HA o fragmentos de HA en fragmentos más pequeños por lo que se sabe que una acumulación de formas de HA de peso molecular bajo induce de manera adversa a un estado inflamatorio;
- ✓ El papel protector (en nuestro complejo) de la entidad "derivado orgánico de silicio" en la entidad "fragmentos de HA", que la técnica anterior nunca antes sugirió.

De esta manera no se configura la falta de nivel inventivo argumentada por el examinador.

SEPTIMO: De acuerdo con lo anterior, y teniendo en cuenta que la solicitud de patente de Invención cumple con los requisitos legales, solicito la concesión de la patente titulada "COMPLEJO ASOCIADO DE UN DERIVADO ORGANICO DEL SILICIO CON FRAGMENTOS CALIBRADOS DE ACIDO HIALURONICO PARA UNA ACCION PREVENTIVA PREPARADORA DE LAS DEGRADACIONES CUTANEAS", a nombre de la sociedad **EXSYMOL S.A.M.**

FUNDAMENTOS DE DERECHO

- 1.- Código Contencioso Administrativo
- 2.- Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones.

3.- Las demás normas concordantes.

PRUEBAS

Para efectos de demostrar los hechos anteriormente expuestos solicito que se tengan en cuenta las siguientes pruebas:

- 1.- **ANEXO A** copia del resumen del artículo ("*The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology*")
- 2.- **ANEXO B** copia de una respuesta del proveedor Japonés de ácido hialurónico (la compañía "Q.P. Co, Ltd. Japan", ver página 3, línea 21 de la patente GB 2159408A)
- 3.- **ANEXO C** se anexa copia de la referencia bibliográfica citada en la resolución "Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair"(Noble P.W., Matrix Biol. (2002))
- 4.- **ANEXO D** copia del artículo "Hyaluronic acid modulates proliferation of Mouse termal fibroblasts in culture" (Masahiko Yoneda, Mashito Yamagata, Sakaru Suzuki y Koji Kimata).

ANEXOS

Con el recurso de adjunta la siguiente documentación:

1. Los documentos enunciados en el acápite de pruebas.

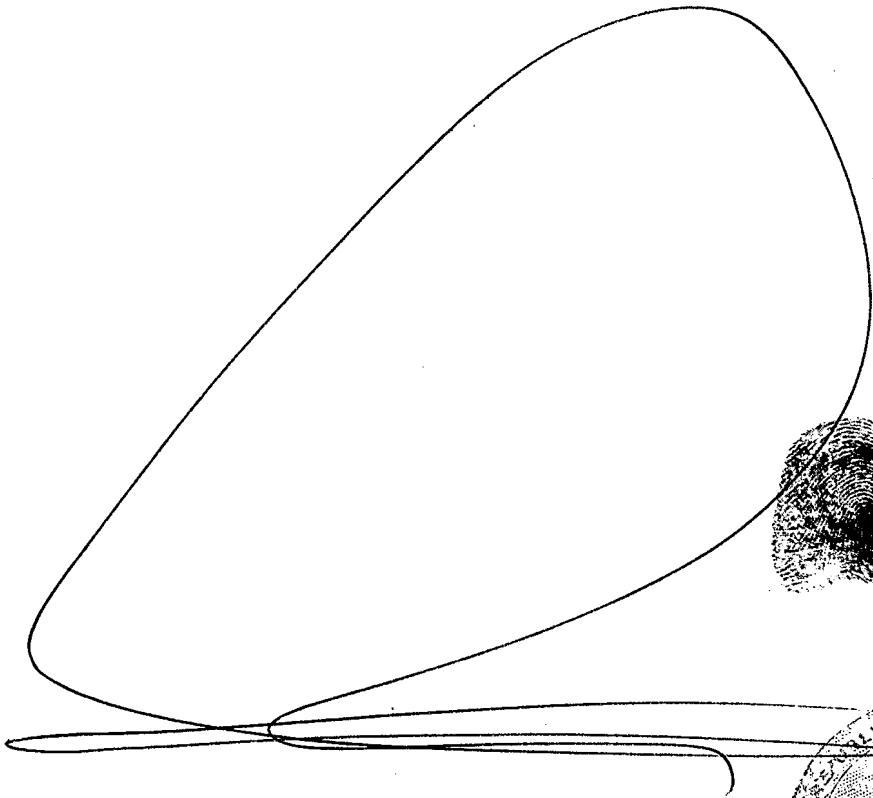
NOTIFICACIONES

Recibiré notificaciones en la Secretaría de su Despacho o en mi oficina de abogado ubicada en la Carrera 13 No. 37-43 Piso 12 en Santa Fe de Bogotá, D.C.

De Ustedes atentamente,

Germán Castillo Grau
C.C. No. 17.017.671 de Bogotá
T.P. No. 2.978 del C.S.J.





R
El N.
Bogo
pres
GAS
El ten
SE
NOTARIA
38
NOTARIO TREINTA Y OCHO DE BO
17nl

República de Colombia

Papel de seguridad para diligencias notariales



Ba004829042

**PRESENTACIÓN PERSONAL Y
RECONOCIMIENTO DE CONTENIDO Y
FIRMA**

Notario Treinta-y-Ocho (38) del Circulo de
Bogotá, D.C. da fe que el anterior escrito fue
presentado personalmente por:

TILLO GRAU GERMAN

Exhibió la: C.C. 1701767
Cédula Profesional No. 2978

Atestó que la firma que aparece en el presente documento es
la que acepta el contenido del mismo.

18 Dec. 960/70)

15/02/2013 15:45 DE C

17u7zhinyynh6

NOTARIA
38

REX 858 M... BERMUDEZ
NOTARIO 38 DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.
HO DE TREINTA Y OCHO DE BOGOTA D.C.

Papel de seguridad para uso exclusivo en trámite de diligencias notariales



109E29042KBBRHH

29/12/2012

Cadenas S.A. No. 89030549

ANNEX A

PubMed

Display Settings: Abstract

105 Full Text

Biorheology. 2002;39(1-2):237-46.

The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP.

Osteoarthritis Research Unit, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada. julio.fernandes@sympatico.ca

Abstract

Morphological changes observed in OA include cartilage erosion as well as a variable degree of synovial inflammation. Current research attributes these changes to a complex network of biochemical factors, including proteolytic enzymes, that lead to a breakdown of the cartilage macromolecules. Cytokines such as IL-1 and TNF-alpha produced by activated synoviocytes, mononuclear cells or by articular cartilage itself significantly up-regulate metalloproteinases (MMP) gene expression. Cytokines also blunt chondrocyte compensatory synthesis pathways required to restore the integrity of the degraded extracellular matrix (ECM). Moreover, in OA synovium, a relative deficit in the production of natural antagonists of the IL-1 receptor (IL-1Ra) has been demonstrated, and could possibly be related to an excess production of nitric oxide in OA tissues. This, coupled with an upregulation in the receptor level, has been shown to be an additional enhancer of the catabolic effect of IL-1 in this disease. IL-1 and TNF-alpha significantly up-regulate MMP-3 steady-state mRNA derived from human synovium and chondrocytes. The neutralization of IL-1 and/or TNF-alpha up-regulation of MMP gene expression appears to be a logical development in the potential medical therapy of OA. Indeed, recombinant IL-1 receptor antagonists (IL1Ra) and soluble IL-1 receptor proteins have been tested in both animal models of OA for modification of OA progression. Soluble IL-1Ra suppressed MMP-3 transcription in the rabbit synovial cell line HIG-82. Experimental evidence showing that neutralizing TNF-alpha suppressed cartilage degradation in arthritis also support such strategy. The important role of TNF-alpha in OA may emerge from the fact that human articular chondrocytes from OA cartilage expressed a significantly higher number of the p55 TNF-alpha receptor which could make OA cartilage particularly susceptible to TNF-alpha degradative stimuli. In addition, OA cartilage produces more TNF-alpha and TNF alpha convertase enzyme (TACE) mRNA than normal cartilage. By analogy, an inhibitor to the p55 TNF-alpha receptor may also provide a mechanism for abolishing TNF-alpha-induced degradation of cartilage ECM by MMPs. Since TACE is the regulator of TNF-alpha activity, limiting the activity of TACE might also prove efficacious in OA. IL-1 and TNF-alpha inhibition of chondrocyte compensatory biosynthesis pathways which further compromise cartilage repair must also be dealt with, perhaps by employing stimulatory agents such as transforming growth factor-beta or insulin-like growth factor-I. Certain cytokines have antiinflammatory properties. Three such cytokines - IL-4, IL-10, and IL-13 - have been identified as able to modulate various inflammatory processes. Their antiinflammatory potential, however, appears to depend greatly on the target cell. Interleukin-4 (IL-4) has been tested in vitro in OA tissue and has been shown to suppress the synthesis of both TNF-alpha and IL-1beta in the same manner as low-dose dexamethasone. Naturally occurring antiinflammatory cytokines such as IL-10 inhibit the synthesis of IL-1 and TNF-alpha and can be potential targets for therapy in OA. Augmenting inhibitor production in situ by gene therapy or supplementing it by injecting the recombinant protein is an attractive therapeutic target, although an in vivo assay in OA is not available, and its applicability has yet to be proven. Similarly, IL-13 significantly inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF-alpha production by mononuclear cells from peripheral blood, but not in cells from inflamed synovial fluid. IL-13 has important biological activities: inhibition of the production of a wide range of proinflammatory cytokines in monocytes/macrophages, B cells, natural killer cells and endothelial cells, while increasing IL-1Ra production. In OA synovial membranes treated with LPS, IL-13 inhibited the synthesis of IL-1beta, TNF-alpha and stromelysin, while increasing IL-1Ra production. In summary, modulation of cytokines that control MMP gene up-regulation would appear to be fertile targets for drug development in the treatment of OA. Several studies illustrate the potential importance of modulating IL-1 activity as a means to reduce the progression of the structural changes in OA. In the experimental dog and rabbit models of OA, we have demonstrated that in vivo intraarticular injections of the IL-1Ra gene can prevent the progression of structural changes in OA. Future directions in the research and treatment of osteoarthritis (OA) will be based on the emerging picture of pathophysiological events that modulate the initiation and progression of OA.

PMID: 12082286 [PubMed - Indexed for MEDLINE]

Publication Types, MeSH Terms, Substances

LinkOut - more resources

ANNEX B

16

Objet (Our HA of GB2159408A):high purified sodium hyaluronate and specifications

De Kunie_Nomura@kewpie.co.jp <Kunie_Nomura@kewpie.co.jp>

À jfvaldor@exsymol.mc <jfvaldor@exsymol.mc>

Cc Yuji_Okamoto@kewpie.co.jp <Yuji_Okamoto@kewpie.co.jp>, Kenjiro_Yasufuku@kewpie.co.jp <Kenjiro_Yasufuku@kewpie.co.jp>

Date 04.09.2012 08:23



- HA-Q powder series.pdf (95 Ko)

Dear Mr./Ms.Jean-Francois VALDOR

Good day.

Thank you for your sending the copy of UK patent no. GB2159408A.

Finally we found that Hyaluronic acid on it was "HA-S" whose molecular weight was about 1.0 million Da.

But We had already discontinued its production.

Renewal one is "HA-Q", which is also extracted by chicken comb with its molecular weight about 1.0 million Da.

We are currently producing HA-Q though price is much higher than HA-LQ.

We think "purified hyaluronic acid close to this latter" would be HA-LQ.

We would be very pleased if our HA-Q or HA-LQ could meet your demand.

Pamphlet of HA-Q and its price indication are exhibited below.

Looking at same functionality, purity, other quality aspects between HA-Q / HA-LQ, we recommend HA-LQ.

HA-Q : US\$ 5,000/kg

Best Regards.
K.NOMURA

Kunie Nomura (Ms.)

Fine Chemical Division

Overseas sales dept.

Kewpie Corporation

1-4-13, Shibuya, Shibuya-ku,

Tokyo 150-0002, Japan

1-4-13

(TEL):+81-3-3486-3338 (Ex.5597)

(FAX):+81-3-3486-4640

URL: <http://www.kewpie.co.jp>

e-mail:kunie_nomura@kewpie.co.jp

<jfvaldor@exsymol.mc>

<Kunie_Nomura@kewpie.co.jp>

2012/09/03 17:59

Re: Re: Re: (Technical data, etc) :high purified sodium hyaluronate and specifications

ANNEX C



Mini-review

Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair

Paul W. Noble*

Yale University School of Medicine, Section of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, VA Connecticut Healthcare System, LCI 105, 333 Cedar Street, 06520, New Haven, CT, USA

Accepted 29 October 2001

Abstract

Hyaluronan is an ubiquitous glycosaminoglycan present in most tissues. Under homeostatic conditions hyaluronan exists as a high molecular mass polymer that has important roles in tissue structural integrity. Under conditions of stress such as following tissue injury, hyaluronan becomes depolymerized and lower molecular mass polymers are generated. The biological properties of these hyaluronan fragments appear to be distinct from the larger precursor molecules. This review examines the biological role of hyaluronan fragments in tissue injury and repair. © 2002 Elsevier Science B.V./International Society of Matrix Biology. All rights reserved.

1. Introduction

Hyaluronan (HA) is an ubiquitous glycosaminoglycan found in almost all tissues. Hyaluronan was first characterized from the vitreous of the eye (Meyer and Palmer, 1934) and shown to contain a hexuronic acid, an amino sugar and acetyl groups with no sulfo-ester content. HA was subsequently isolated from umbilical cord tissue, and glucuronic acid and glucosamine sugar constituents were identified (Meyer and Palmer, 1936). The actual linkages of the repeating disaccharide motif ($-\beta$ -1,4-glucuronic acid- β 1,3-*N*-acetylglucosamine-), was described in 1954 (Weissman and Meyer, 1954). The number of repeat disaccharides can approach 30000 (a molecular mass of 10×10^6 Da) in tissues such as synovial fluid. In addition to regulating physiologic processes in normal tissues, HA under-

goes dynamic regulation under conditions of tissue injury and inflammation. The purpose of this review is to discuss the emerging roles of HA in tissue injury, inflammation and repair, with an emphasis on the lower MW forms of the molecule.

2. Hyaluronan as a signaling molecule: its potential role in initiating the host response to tissue injury

Hyaluronan is a remarkable polymer that appears to have distinct biological functions depending on the circumstances under which it is produced. Under physiologic conditions, HA exists as a high molecular weight polymer in excess of 10^6 Da. However, following tissue injury, HA fragments of lower molecular mass accumulate. The potential functional significance of the generation of HA fragments has been suggested by in vitro studies (Hodge-Dufour et al., 1997; Horton et al., 1999; McKee et al., 1996, 1997; Noble et al., 1993, 1996). The observation that HA may interact differently with various cells and produce distinct biological effects depending on the poly-

Abbreviations: ROI, Reactive Oxygen Inter Intermediates; ECM, Extracellular Matrix.

* Tel.: +1-203-932-5711 ext. 2208; fax: +1-203-937-4784.

E-mail address: paul.noble@yale.edu (P.W. Noble).

mer molecular mass was initially made with endothelial cells (West and Kumar, 1989). Oligomers of 8-16 disaccharides prepared by enzymatic digestion of native HA induce angiogenesis in a chick corneal assay, while the native high molecular weight polymer does not.

A number of other laboratories have since identified a similar phenomenon using different cell types, different polymer sizes and examining different biological effector functions (Rooney et al., 1995). In general, the ability of cells to respond to HA of differing sizes appears to vary with cell type. Generally, native high molecular mass polymers of $3-6 \times 10^6$ Da do not induce inflammatory or proliferative genes. However, high molecular weight HA can activate protein tyrosine cascades in endothelial cells (Lokeshwar and Selzer, 2000) although at low levels. Furthermore, although endothelial cells are able to activate protein tyrosine kinase cascades with high molecular weight HA, activation is several-fold greater in the presence of HA fragments (Lokeshwar and Selzer, 2000).

Studies with inflammatory macrophages have shown that fragmented HA with a molecular mass with a peak in the range of 2.5×10^5 Da, but not the high molecular mass precursor, can induce the expression of inflammatory genes (Hodge-Dufour et al., 1997; Horton et al., 1998, 1999; McKee et al., 1996, 1997; Noble et al., 1993, 1996). Similar results have been shown with renal tubular epithelial cells (Beck-Schimmer et al., 1998), T-24 carcinoma cells (Fitzgerald et al., 2000) and eosinophils (Ohkawara et al., 2000). The critical importance of excluding contaminating substances from HA preparations has recently been brought to light (Filion and Phillips, 2001). The biological relevance of these studies is supported by reports demonstrating that fragmented HA that induces inflammatory gene expression *in vitro* is in the same size range as HA that accumulates under inflammatory conditions *in vivo* (McKee et al., 1996). In contrast, a different size requirement is observed with dendritic cells where HA oligosaccharides in the 6-20 size range, but not the 2.5×10^5 Da or higher molecular weight, induce inflammatory gene expression (Termeer et al., 2000). The common theme appears to be that high MW HA does not initiate a program of gene expression geared toward cell proliferation, migration, or activation, whereas a variety of genes that regulate biological properties are expressed in response to fragmented lower molecular mass HA. Hyaluronan fragmentation *in vivo* may result from regulated expression of secreted hyaluronidases (Csoka et al., 1997) or from oxidation (Uchiyama et al., 1990), and this fragmentation is required for acquisition of a signaling function for HA. Generation of HA fragments under conditions of tissue injury may serve the function of signaling to the

host that normal homeostasis has been profoundly disturbed.

3. Hyaluronan depolymerization in tissue injury

Hyaluronan is a normal constituent of basement membrane, and in its native form, HA exists as a high molecular weight polymer, typically in excess of 10^6 Da. Hyaluronan plays a role in maintaining the structural integrity of tissues such as the joint where it is responsible for maintaining the viscosity of joint fluid. In addition to existing as a soluble polymer, HA is bound to large proteoglycans such as aggrecan and versican. Hyaluronan side chains of aggrecan are important in cartilage organization and recent data have suggested that HA is essential for maintaining cartilage integrity (Knudson, 1993; Nishida et al., 1999). At sites of inflammation, such as during inflammatory arthritis or in wound healing, HA becomes depolymerized into lower molecular weight forms.

There appear to be two mechanisms for depolymerizing HA, enzymatic and non-enzymatic (Laurent and Fraser, 1992). The enzymes that degrade HA are hyaluronidases, chondroitinases and hexosaminidases (Laurent and Fraser, 1992). Most hyaluronidases are lysosomal enzymes and require an acid pH for maximal activity (Kreil, 1995). However, the hyaluronidase PH-20, found in sperm, is active at pH 7 (see article by Cherr et al. in this mini-review series). Recently, a soluble form of PH-20 has been identified (Gmachl and Kreil, 1993; Gmachl et al., 1993; Li et al., 1997; Meyer et al., 1997).

In addition, a novel hyaluronidase (Hyal-2) that generates HA fragments of $10-20 \times 10^3$ Da has been described (see article by Lepperdinger et al. in this mini-review series). Hyal-2 is expressed in fibrotic lung injury (Lepperdinger et al., 1998; Li et al., 2000).

Hyaluronan can also be degraded into smaller fragments by exposure to ROI (Deguine et al., 1998). This is an important mechanism for generating HA fragments at sites of inflammation (Saari, 1991). Interestingly, hyaluronidases are endoglucosaminidases whereas ROIs fragment HA randomly at internal glycoside linkages.

Hyaluronan degradation products appear to have biological functions distinct from the native high molecular weight polymer. Oligosaccharides of less than 20 disaccharides have been shown to be angiogenic (West et al., 1985). Low and intermediate molecular weight HA ($2 \times 10^4-4.5 \times 10^5$ Da) stimulate gene expression in macrophages, endothelial cells, eosinophils and certain epithelial cells (McKee et al., 1996, 1997; Oertli et al., 1998; Slevin et al., 1998). Hyaluronan degradation products are purported to contribute to scar formation (West et al., 1997). Fetal

20

ANNEX D

Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture

MASAHIKO YONEDA¹, MASAHITO YAMAGATA¹, SAKARU SUZUKI¹ and KOJI KIMATA^{1,2,*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Nagoya University, Nagoya 464, Japan

²Aichi Medical University, Yazako, Nagakute, Aichi 480-11, Japan

* Author for correspondence

Summary

When the concentration of hyaluronic acid was monitored in primary cultures of mouse skin dermal fibroblasts, there was an increase in hyaluronic acid proportional to the increase in cell number during the logarithmic growth phase. The concentration reached the maximum value 2 days before the cells became confluent, and then decreased gradually. Hyaluronic acid added at 1 mg ml^{-1} during the logarithmic phase either promoted or inhibited cell growth, depending on the density of cells at the time when hyaluronic acid was added. Hyaluronic acid (1 mg ml^{-1}) added to subconfluent or postconfluent cultures induced a transient DNA synthesis with a consequent increase ($>20\%$) in cell number. The effects appeared to be specific, since neither hyaluronic acid oligosaccharides nor some other types of glycosaminoglycan (chondroitin, chondroitin sulphates, heparan sulphates and

heparin) had any similar effects. Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (dbcAMP), at 1 mM , added to subconfluent or postconfluent cultures had promoting effects successively on hyaluronic acid synthesis and on cell growth. An increase in hyaluronic acid synthesis also occurred when dbcAMP was added to day 1 cultures in the logarithmic growth phase, but the effect on cell growth was reversed; there was an inhibition rather than a promotion. The pattern of cell density-dependent variation of the dbcAMP effect is quite similar to that observed with exogenously added hyaluronic acid. Therefore, we propose that hyaluronic acid added exogenously or supplied endogenously by increased synthesis may act as a modulator of mouse dermal fibroblast proliferation.

Key words: hyaluronic acid, skin fibroblasts, cyclic AMP, cell growth.

Introduction

A series of types of cell behaviour during culture, such as cell attachment to the substratum, cell proliferation and arrest of cell growth at confluent cell density, are regulated by the extracellular matrix surrounding cells (Toole, 1981). Hyaluronic acid is a major component of the extracellular matrices and its synthesis and degradation are significantly related to these cellular functions. Many reports in recent years have suggested a close relationship between the activity of hyaluronic acid synthesis and cell proliferation (Morris, 1960; Daniel *et al.* 1961; Davidson *et al.* 1963; Davidson, 1963; Nameroff & Holtzer, 1967; Koyama & Ono, 1970; Bishoff, 1971; Toole, 1972; Moscatelli & Rubin, 1975; Lembach, 1976; Angello & Hosick, 1982; Matuoka *et al.* 1985, 1987; Brecht *et al.* 1986; Gold-

berg & Toole, 1987). Thus, viral transformation of fibroblasts has been shown to cause an enormous increase in the rate of hyaluronic acid synthesis as well as an abnormal acceleration of cell growth (Takagaki & Toole, 1979; Okayama *et al.* 1977). An increase in hyaluronic acid synthesis preceding cell proliferation has been observed in wound healing of various tissues (Toole & Gross, 1971). Further, Tomida *et al.* (1974) have shown that hyaluronic acid synthetase activity in cultured rat fibroblasts was enhanced under conditions that permit cell proliferation and decreased with a decline in cell replication in a confluent phase. However, Koyama *et al.* (1975) have also made apparently divergent observations that the enhanced production of hyaluronic acid in rat fibroblast cultures caused by treatment with adenosine 3',5'-cyclic monophosphate

or its dibutyl derivative (dbcAMP) resulted in an inhibition rather than a promotion of cell growth, and that a macromolecular factor in foetal calf serum could induce hyaluronic acid synthetase activity without accompanying cell proliferation (Tomida *et al.* 1975).

In the present study we treated mouse dermal fibroblasts at different growth stages with hyaluronic acid and dbcAMP in order to investigate the effects of exogenously added and endogenously synthesized hyaluronic acid on cell proliferation. We report that hyaluronic acid can modulate cell proliferation and that the effect varies depending on cell density and hyaluronic acid concentration.

Materials and methods

Preparation of cells

Mouse skin dermal fibroblasts were prepared from 3- or 5-day-old neonates of DDY mice by the method of Yuspa & Harris (1974). The head, limbs and tail of a neonate were removed. Whole skin was floated on cold Hanks' balanced salt solution (Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free) containing 0.25% (w/v) trypsin (1:250, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY), keeping the dermis downward. After incubation overnight at 4°C, the dermis was scraped away from epidermis, cut into small pieces and then incubated in Hanks' balanced salt solution containing 0.35% (w/v) collagenase (Grand Island Biological Co., Grand Island, NY) at 37°C for 45 min. Dissociated cells were collected by centrifugation at 300g for 5 min, and suspended in Dubbecco's modified Eagle's medium (Grand Island Biological Co., Grand Island, NY) supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum, 0.01 M-N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid, and ascorbic acid ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$). The cells were passed through a Nitex filter mesh (60 mesh cm^{-1}) and stored in liquid nitrogen until used.

Cell cultures

The cells (3×10^5 cells, unless otherwise indicated) were seeded into 60-mm tissue culture dishes (Becton Dickinson & Co., Los Angeles, CA) containing 3 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum, penicillin (50 units ml^{-1}), streptomycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), 0.01 M-N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid, and ascorbic acid ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) (DMEM), and cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% (v/v) CO_2 in air. The medium was changed 1 day after plating (day 1), and then changed every other day.

The cells grew more slowly at a lower plating efficiency in the primary culture than in a secondary culture, regardless of whether or not the cells had been stored as above. Since our preliminary studies showed that addition of 1 mM-dbcAMP to day 5 cultures caused an approximately threefold stimulation of hyaluronic acid synthesis in the primary culture, compared to an approximately twofold stimulation in the secondary culture, we chose the primary culture system in which to study the regulation of cell growth in response to alterations of hyaluronic acid level.

Treatment of cells with exogenous substances

The effects of exogenous hyaluronic acid (M_r 9.5×10^5 ; protein content, 0.04% (w/w); Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan) or dbcAMP (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) on cell growth were examined at three different stages; logarithmic phase (day 1), subconfluent phase (day 5; 2 days before reaching confluence), and postconfluent phase (day 11; 4 days after reaching confluence). On the indicated day, the growth medium was replaced by a medium containing the drug. Incubation continued for the periods indicated in individual experiments and the medium containing the drug was changed every other day during that time. Other compounds examined for their effects on cell growth were: chondroitin, chondroitin 4/6-sulphate, heparan sulphate, dermatan sulphate and heparin (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan), hyaluronidase-digested hyaluronic acid and butyrate. For digestion with hyaluronidase, 20 mg of hyaluronic acid (M_r 9.5×10^5) was incubated at 37°C for 20 h with 1 mg of testicular hyaluronidase ($430 \text{ units mg}^{-1}$, type V, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) in 1 ml of 0.1 M-phosphate buffer, pH 5.3, containing 0.15 M-NaCl. Degradation reached a plateau after 10 h, as assessed by determination of released reducing groups (Park & Johnson, 1949).

Determination of cell number

Cells were washed twice with warm Hanks' balanced salt solution (Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free) and then treated with 0.12% (w/v) trypsin in the same medium at 37°C for 30 min with gentle shaking. The cells were dissociated by pipetting. In some cases when cells were cultured for a long time or treated with exogenous hyaluronic acid, further treatment with 0.1% (w/v) collagenase type I (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) in Hanks' balanced salt solution at 37°C for 30 min was needed before pipetting to ensure complete dissociation. Digestion with trypsin or collagenase was sometimes carried out in the presence of hyaluronic acid in order to study the effect of hyaluronic acid on the dissociation. Cell numbers were counted in a Coulter counter (model Zp, Coulter Electronics, Inc.) or with a haemocytometer. Each value, with attained deviation, given in figures or tables was calculated from triplicate or duplicate determinations.

Measurement of hyaluronic acid content

The medium was collected, and the cell layer was washed twice with Hanks' balanced salt solution. To the combined solution of medium and washing solution were added 3 vol. of cold 95% (v/v) ethanol containing 1.3% (w/v) potassium acetate (Kimata *et al.* 1982). After standing at 0°C for 30 min, the precipitate containing hyaluronic acid was collected by centrifugation at $12\,500g$ for 30 min. The precipitation was repeated twice. A cell layer, on the other hand, was suspended in 1 ml of cold Hanks' balanced salt solution by scraping with a policeman, and then centrifuged at $12\,000g$ for 5 min. The pellet was suspended in 1 ml of water and then treated with ethanol as described above. The precipitation was repeated twice. Hyaluronic acid in the precipitates, obtained as above from the medium and cell layer, was measured essentially as described (George *et al.* 1978). Briefly, the precipitates were subjected 0.2 M-alkali, followed by Pronase digestion. The digest was heated at 100°C for 5 min and clarified by centrifugation. From the supernatant

postconfluent cultures, caused transient DNA synthesis followed by cell proliferation (Fig. 6B). The effect was maximal at a hyaluronic acid concentration of 1 mg ml^{-1} and appeared relatively slowly with a lag period of about 24 h. The effect was specific in that neither hyaluronidase-digested hyaluronic acid nor other types of glycosaminoglycan could substitute for the high molecular weight hyaluronic acid (Fig. 7; Table 1). It should be stressed that exogenous hyaluronic acid rather inhibits cell proliferation when added to cell cultures in the logarithmic growth phase. The

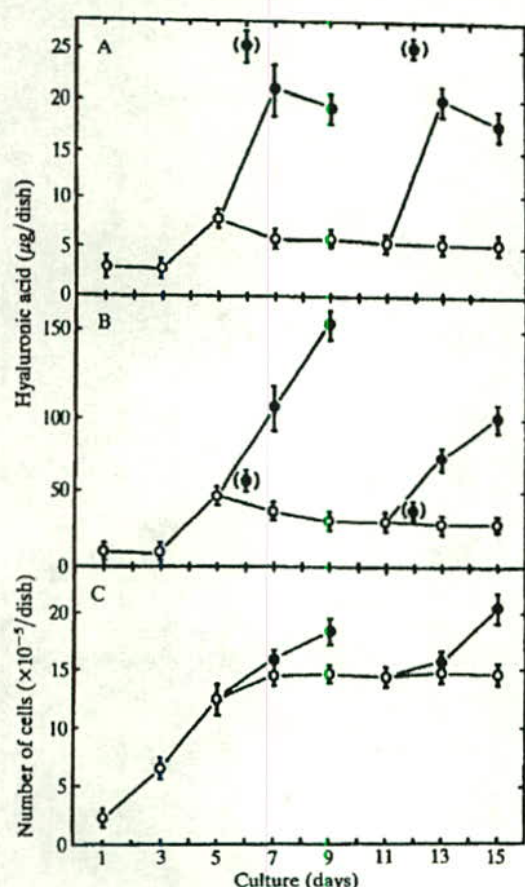


Fig. 9. Effect of dbcAMP on cell number and hyaluronic acid synthesis in cells in subconfluent and postconfluent phases (day 5 and day 11 cultures, respectively). dbcAMP (1 mM) was added to cultures on either day 5 or day 11, and the drug was present in the media used thereafter. Hyaluronic acid in the cell layer (A), hyaluronic acid in the medium (B), the total cell number (C) were determined 2 and 4 days after the treatment. (○—○) No addition (control); (●—●) 1 mM -dbcAMP added. The amounts of hyaluronic acid produced are expressed as the amounts of hyaluronic acid secreted into the medium during the 2-day culture after each medium change. Points in parentheses in A and B indicate the amounts of hyaluronic acid in the cell layer and those in the medium, respectively, 1 day after the treatment.

inhibitory effect of hyaluronic acid is in keeping with the observation by Goldberg & Toole (1987); using rabbit synovial cells, 3T3 cells, or simian virus-transformed 3T3 cells cultured in media supplemented with various concentrations of hyaluronic acid, these authors observed a dramatic decrease in both cell number and $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation rate, compared to controls cultured without added hyaluronic acid. Thus, the effect of hyaluronic acid on cell proliferation appears to vary depending on the cell density.

A wide range of hyaluronic acid concentration (0.1 – 3.0 mg ml^{-1} of culture medium) was used in the present studies. Since this glycosaminoglycan is generally found in tissue in a concentration range from 0.05 to 3.0 mg ml^{-1} (Comper & Laurent, 1978), the concentrations used here are physiological and the observed effects could reflect a physiological function of hyaluronic acid *in vivo*.

It is well known that treatment with dbcAMP causes many cellular changes including an increase in hyaluronic acid synthetase activity (Friedman, 1976; Tomida *et al.* 1977). Tomida *et al.* (1977) showed that addition of actinomycin D or cycloheximide following exposure of cells to dbcAMP blocked the increase in hyaluronic acid synthetase activity, suggesting the involvement of synthesis of enzymes in the dbcAMP-induced synthetase activation. In the present study, dbcAMP was shown to have a growth-promoting effect very similar to that of exogenously added hyaluronic acid. Although there is no direct evidence to show a causal relationship between the two, modulation of the cell's ability to synthesize hyaluronic acid could be a cause of the observed effects of dbcAMP on cell proliferation. Taken together, the conclusion of this study is that exogenous as well as endogenous hyaluronic acid may act as a modulator of mouse dermal fibroblast proliferation.

The interstitial matrix surrounding fibroblasts has been shown to contain, in addition to hyaluronic acid, type I and III collagen, a large chondroitin sulphate proteoglycan, a small dermatan sulphate proteoglycan, heparan sulphate proteoglycan, fibronectin, and many other unidentified macromolecules (Toole, 1981). There are many indications that hyaluronic acid interacts with other matrix components. For instance, we have found that hyaluronic acid interacts with a large chondroitin sulphate proteoglycan, which also has the ability to interact with fibronectin and type I and III collagen (Yamagata *et al.* 1986). In relation to this finding, Jilek & Hörmann (1979) showed that hyaluronic acid could increase or decrease the extent of binding of fibronectin to collagen. Although the mechanism by which hyaluronic acid exerts the growth-promoting action is not known, one possibility is that exogenous hyaluronic acid, by binding to other matrix

components, causes a modulation of the interstitial matrix into a hyaluronic acid-enriched matrix, which is conducive to cell proliferation. If so, the hyaluronic acid-treated matrix could be distinguished either biochemically or morphologically from the untreated matrix. That this is indeed the case is shown in the accompanying paper (Yoneda *et al.* 1988).

We are very grateful to Dr H. L. Hosick, Washington State University for improvement of this manuscript. We are also grateful to Dr M. Okayama of Clinical Research Institute, National Nagoya Hospital, for many helpful discussions and suggestions. This work was supported by grants-in-aid for Cancer Research, Scientific Research, and Special Project Research from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan.

References

- ANGELLO, J. C. & HOSICK, H. L. (1982). Glycosaminoglycan synthesis by mammary tumor spheroids. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **107**, 1130–1137.
- BERMS, K. I. & THOMAS, C. A. JR (1965). Isolation of high molecular weight DNA from *Hemophilus influenzae*. *J. molec. Biol.* **11**, 476–490.
- BISHOFF, R. (1971). Acid mucopolysaccharide synthesis by chick amnion cell cultures. *Expl Cell Res.* **66**, 224–236.
- BRECHT, M., MAYER, U., SCHLOSSER, E. & PREHM, P. (1986). Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem. J.* **239**, 445–450.
- BURTON, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **62**, 315–323.
- COMPER, W. D. & LAURENT, T. C. (1978). Physiological function of connective polysaccharides. *Physiol. Rev.* **58**, 255–315.
- DANIEL, M. R., DINGLE, J. T. & LUCY, J. A. (1961). Cobalt-tolerance and mucopolysaccharide production in rat dermal fibroblast in culture. *Expl Cell Res.* **24**, 88–105.
- DAVIDSON, E. H. (1963). Heritability and control of differentiated function in cultured cells. *J. cell. Physiol.* **46**, 983–998.
- DAVIDSON, E. H., ALLFRIY, V. G. & MIRSKY, A. E. (1963). Gene expression in differentiated cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **49**, 53–60.
- FRIEDMAN, D. L. (1976). Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. *Physiol. Rev.* **56**, 652–708.
- GEORGE, W., WOLFMAN, J. M., SARBER, R. & DISTLER, J. (1978). A specific, sensitive method for the determination of hyaluronate. *Analyt. Biochem.* **96**, 474–480.
- GOLDBERG, R. & TOOLE, B. P. (1987). Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis Rheum.* **30**, 769–778.
- JILEK, F. & HÖRMANN, H. (1979). Influence of heparin and hyaluronic acid on the binding of native collagen. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **360**, 597–603.
- KIMATA, K., HASCALL, V. C. & KIMURA, J. H. (1982). Mechanisms for dissociating proteoglycan aggregates. *J. biol. Chem.* **257**, 3827–3832.
- KOYAMA, H. & ONO, T. (1970). Initiation of a differentiated function (hyaluronic acid synthesis) by hybrid formation in culture. *Biochim. biophys. Acta* **217**, 477–487.
- KOYAMA, H., TOMIDA, M. & ONO, T. (1975). The enhanced production of hyaluronic acid by cultured rat fibroblast cells treated with cyclic AMP and its dibutyl derivative. *J. cell. Physiol.* **87**, 189–198.
- LEMBACH, K. (1976). Enhanced synthesis and extra-cellular accumulation of hyaluronic acid during stimulation of quiescent human fibroblasts by mouse epidermal growth factor. *J. cell. Physiol.* **89**, 277–288.
- MATUOKA, K., MITSUI, Y. & MUROTA, S. (1985). Growth-coupled changes in glucosaminoglycans (heparan sulfate and hyaluronic acid) in normal and transformed human fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.* **9**, 577–586.
- MATUOKA, K., NAMBA, M. & MITSUI, Y. (1987). Hyaluronate synthetase inhibition by normal and transformed human fibroblasts during growth reduction. *J. Cell Biol.* **104**, 1105–1115.
- MORRIS, C. C. (1960). Quantitative studies on the production of acid mucopolysaccharides by replicate cell cultures of rat fibroblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **86**, 878–915.
- MOSCATELLI, D. & RUBIN, H. (1975). Increased hyaluronic acid production on stimulation of DNA synthesis in chick embryo fibroblasts. *Nature, Lond.* **254**, 65–66.
- NAMEROFF, M. & HOLTZER, H. (1967). The loss of phenotypic traits by differentiated cells. IV. Change in polysaccharides produced by dividing chondrocytes. *Dev. Biol.* **16**, 250–281.
- OKAYAMA, M., YOSHIMURA, M., MUTO, M., CHI, J., ROTH, S. & KAJI, A. (1977). Transformation of chicken chondrocytes by Rous sarcoma virus. *Cancer Res.* **37**, 712–717.
- PARK, J. T. & JOHNSON, M. J. (1949). A submicrodetermination of glucose. *J. biol. Chem.* **181**, 149–151.
- SCHUMACHER, G. F. B. & SCHILL, W. B. (1972). Radical diffusion in gel for micro determination of enzymes. II. Plasminogen activator, elastase, and nonspecific proteases. *Analyt. Biochem.* **48**, 9–26.
- TAKAGAKI, Y. M. & TOOLE, B. P. (1979). Shedding of hyaluronate from the cell surface of Rous sarcoma virus-transformed chondrocytes. *J. biol. Chem.* **254**, 8409–8415.
- TOMIDA, M., KOYAMA, H. & ONO, T. (1974). Hyaluronic acid synthetase in cultured mammalian cells producing hyaluronic acid. Oscillatory change during the growth phase and suppression by 5-bromodeoxyuridine. *Biochim. biophys. Acta* **338**, 352–363.
- TOMIDA, M., KOYAMA, H. & ONO, T. (1975). Induction of hyaluronic acid synthetase activity in rat fibroblasts by medium change of confluent cultures. *J. cell. Physiol.* **86**, 121–130.
- TOMIDA, M., KOYAMA, H. & ONO, T. (1977). Effect of