

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 942**

51 Int. Cl.:

C08L 5/08 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2005 E 05744576 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1753810**

54 Título: **Producto de ácido hialurónico seco y aglomerado**

30 Prioridad:

27.05.2004 DK 200400833

25.06.2004 DK 200401003

15.02.2005 DK 200500223

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

18.12.2013

73 Titular/es:

NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S (100.0%)

KROGSHOEJVEJ 36

2880 BAGSVAERD, DK

72 Inventor/es:

**BACH, POUL y
THWAITES, ERIC**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 434 942 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

Producto de ácido hialurónico seco y aglomerado.

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente invención se refiere a un producto seco y aglomerado que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, al igual que a varias composiciones y artículos comprendiendo el producto o composiciones de la invención, métodos de producción del producto de la invención, y usos del mismo.

10

ANTECEDENTES

[0002] Los heteropolisacáridos más abundantes del cuerpo son los glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos son polímeros de carbohidratos de cadena recta que consisten en la repetición de unidades de disacárido (sólo el queratán sulfato está ramificado en la región del núcleo del carbohidrato). Las unidades de disacárido generalmente comprenden, como una primera unidad sacárida, uno de dos azúcares modificados N-acetilgalactosamina (GalNAc) o N-acetilglucosamina (GlcNAc). La segunda unidad es normalmente un ácido urónico, tal como ácido glucurónico (GlcUA) o iduronato.

15

20

[0003] Los glicosaminoglicanos son moléculas cargadas negativamente, y tienen una conformación extendida que confiere alta viscosidad cuando está en solución. Los glicosaminoglicanos se localizan principalmente en la superficie de las células o en la matriz extracelular. Los glicosaminoglicanos tienen una baja compresibilidad en solución y, como resultado, son ideales como fluido de lubricación fisiológica, por ejemplo, articulaciones. La rigidez de los glicosaminoglicanos proporciona integridad estructural a las células y proporciona vías de paso entre células, permitiendo la migración celular. Los glicosaminoglicanos de mayor importancia fisiológica son hialuronano, sulfato de condroitina, heparina, sulfato de heparano, dermatán sulfato, y queratán sulfato. La mayoría de los glicosaminoglicanos se enlazan covalentemente a una proteína de núcleo proteoglicano a través de estructuras de oligosacárido específicas. El hialuronano forma agregados grandes con ciertos proteoglicanos, pero es una excepción ya que las cadenas de carbohidratos libres forman complejos no covalentes con proteoglicanos.

25

30

[0004] Se han identificado numerosos papeles del hialuronano en el cuerpo (véase, Laurent T.C. y Fraser J. R. E., 1992, FASEB J. 6: 2397-2404; y Toole B.P., 1991, "Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation." en: Cell Biology of the Extracellular Matrix, pp. 305-341, Hay E. D., ed., Plenum, New York). El hialuronano está presente en el cartílago hialino, líquido sinovial de las articulaciones, y tejido de la piel, tanto dermis como epidermis. Se sospecha también que el hialuronano juega un papel en numerosas funciones fisiológicas, tales como adhesión, desarrollo, motilidad celular, cáncer, angiogénesis, y cicatrización de una herida. Debido a las propiedades biológicas y físicas únicas del hialuronano, se emplea en la cirugía ocular y de articulaciones y se está evaluando en otros procedimientos médicos.

35

40

[0005] Los términos "hialuronano" o "ácido hialurónico" se usan en la bibliografía para significar polisacáridos ácidos con pesos moleculares diferentes constituidos por residuos de los ácidos D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, que existen de forma natural en las superficies celulares, en las sustancias extracelulares básicas del tejido conjuntivo de vertebrados, en el líquido sinovial de las articulaciones, en el fluido endobulbar del ojo, en el tejido de cordón umbilical humano y en las crestas de gallo.

45

[0006] El término "ácido hialurónico" de hecho se utiliza normalmente para representar una serie entera de polisacáridos con residuos alternantes de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina con pesos moleculares variables, o incluso las fracciones degradadas del mismo, y éste por lo tanto asemejaría más correcto a usar el término plural de "ácidos hialurónicos". El término singular será utilizado, no obstante, de todas formas en esta descripción; además, la abreviatura "HA" será utilizada frecuentemente en lugar de este término colectivo.

50

[0007] HA juega un papel importante en el organismo biológico, como soporte mecánico para las células de muchos tejidos, como la piel, tendones, músculos y cartílago, es un componente principal de la matriz intercelular. HA tiene también otros papeles importantes en los procesos biológicos, tales como el humedecimiento de tejidos, y lubricación.

55

[0008] HA se puede extraer de los tejidos naturales anteriormente mencionados, aunque actualmente se prefiere prepararlo por métodos microbiológicos para minimizar el riesgo potencial de transferir agentes infecciosos, y para aumentar la uniformidad del producto, la calidad y la disponibilidad.

60

[0009] HA y sus fracciones de diferentes tamaños moleculares y las respectivas sales derivadas se han utilizado como medicamentos, especialmente en el tratamiento de artropatías, como agente auxiliar y/o sustituto para órganos naturales y tejidos, especialmente en oftalmología y cirugía cosmética, y como agentes en preparaciones cosméticas. Los productos de hialuronano también han sido desarrollados para el uso en el ortopedia, reumatología, y dermatología.

65

[0010] HA también se puede usar como aditivo para varios materiales poliméricos usados para artículos quirúrgicos y sanitarios, tales como poliuretanos, poliésteres etc. haciendo que estos materiales sean biocompatibles.

5 [0011] Los materiales que comprenden ácido hialurónico o sales derivadas se conocen en la técnica y son ampliamente utilizados en el sector del cuidado de salud, por ejemplo, en oftalmología, en el tratamiento de la osteoartritis, al igual que en las industrias farmacéuticas y de cosméticos. Estos materiales idealmente se venden, se transportan, y se almacenan en forma seca. No obstante, productos secos que comprenden ácido hialurónico o sales derivadas se disuelven notoriamente lentamente. El tiempo que tarda un producto de HA seco en disolverse completamente es un parámetro importante, especialmente en la industria del cuidado de la salud, por lo tanto es de un interés considerable minimizar el tiempo de disolución total, es decir, el tiempo que se tarda en dispersar y solubilizar un producto de HA seco. Esta invención es útil para la fabricación de productos de disolución rápida de ácido hialurónico o sales derivadas, y materiales solubles en agua formadores de geles similares.

15 [0012] El documento GB 2 218 429 divulga un proceso para producir ácido hialurónico en forma de polvo fino o hialuronato de sodio que comprende la suspensión del ácido hialurónico o hialuronato de sodio en un solvente orgánico, la trituración de la suspensión con un molino en húmedo, la eliminación del solvente orgánico, y el secado del ácido hialurónico molido o hialuronato de sodio.

[0013] El documento US 4,754,027 divulga un proceso para preparar un producto particulado de goma guar aglomerada con un tamaño de partícula en el rango de 0,5 a 3 milímetros.

20 [0014] El documento WO 02/09787 divulga un proceso para la fabricación de microesferas de ácido hialurónico donde una dispersión o solución coloidal de ácido hialurónico se pulveriza para formar físicamente microesferas de un tamaño deseado.

25 **RESUMEN DE LA INVENCION**

[0015] Un problema a resolver por la presente invención es cómo proporcionar un producto de HA seco altamente hidrosoluble.

30 [0016] La presente invención muestra que la aglomeración de un producto de HA seco mejora enormemente la solubilidad del producto, consiguiendo así una disolución muy rápida en un solvente acuoso, que es preferiblemente agua o agua salina.

35 [0017] Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un producto que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, el cual se seca y se aglomera, preferiblemente se seca y se aglomera como se describe aquí.

[0018] En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un producto tal y como se define en el primer aspecto, y una sustancia activa, preferiblemente la sustancia activa es un agente farmacológicamente activo.

40 [0019] Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en el primer aspecto, junto con un portador, excipiente o eluyente farmacéuticamente aceptable.

45 [0020] Un cuarto aspecto se refiere a una composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en el primer aspecto como vehículo, junto con un agente farmacológicamente activo.

50 [0021] Un quinto aspecto se refiere a un artículo cosmético que comprende como sustancia activa una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en cualquiera de los aspectos segundo, tercero, o cuarto.

55 [0022] En un sexto aspecto, la invención se refiere a un artículo quirúrgico o sanitario médico que comprende un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en cualquiera de los aspectos segundo, tercero, o cuarto, preferiblemente el artículo es un pañal, una compresa, una esponja quirúrgica, una esponja de cicatrización de una herida, o una parte comprendida en un apósito u otro material de vendaje de heridas.

[0023] Un aspecto importante concierne a una cápsula de medicamento o microcápsula que comprende un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en cualquiera de los aspectos segundo, tercero, o cuarto.

60 [0024] Otro aspecto importante de la invención se refiere a un método para producir un producto aglomerado y seco que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, el método que incluye las etapas de:

a) secado un producto que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo; y

65 b) aglomeración del producto seco.

[0025] Los aspectos finales de la invención se refieren a métodos de realizar procedimientos en oftalmología, en el tratamiento de osteoartritis o cáncer, pérdida capilar o calvicie, del tratamiento de una herida, de realizar una administración dermal o transdérmica de un agente farmacológicamente activo, o la administración dermal de un cosmético, la mejora que comprende el uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto, o una composición tal y como se define en cualquiera de los aspectos segundo, tercero, o cuarto.

[0026] Varios aspectos se refieren a usos de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 13 - 16, para la producción de un medicamento para el tratamiento de osteoartritis, cáncer, la producción de un medicamento para un tratamiento oftalmológico, la producción de un medicamento para el tratamiento de una herida, la producción de un medicamento para la angiogénesis, la producción de un medicamento para el tratamiento de la pérdida capilar o calvicie o la producción de un hidratante.

FIGURAS

[0027]

Figura 1: La permeabilidad de la piel a cuatro fracciones de diferente peso molecular promedio de ácido hialurónico radiomarcado fue investigada como se describe en el ejemplo 7. Los resultados se muestran en la tabla 5, y se visualizan en la Figura 1. Estos indican que hay una dependencia aparente del transporte percutáneo (flujo) respecto al peso molecular de HA, con una mejor permeabilidad aparente para las especies de peso molecular inferior. No hubo ninguna diferencia significativa entre los flujos aparentes medidos a 5 y 22 horas para cualquiera de las fracciones de tamaños de HA estudiadas.

Figura 2: La absorción por la piel y la distribución de dos fracciones de diferente peso molecular promedio de ácido hialurónico marcado fluorescentemente se investigó en el ejemplo 8, utilizando microscopía confocal de escaneado de láser. Los pesos moleculares medios de las fracciones de HA fueron 300 000 y 50 000 Da. El HA de 50 000 Da fluorescentemente marcado (F-HA 0,05) sólo fue visible escasa y superficialmente en la superficie de la capa córnea, pero la fracción de HA marcado fue claramente visible alrededor de y/o en los folículos pilosos. La Figura 2, panel A, muestra la superficie de la piel (capa córnea), el folículo capilar y el eje capilar; el panel B muestra claramente que la fluorescencia verde de HA es visible principalmente alrededor de y/o en el folículo.

Figura 3: la escasa fluorescencia en la superficie de la capa córnea vista en la Figura 2 se confirmó en otra muestra de piel, que no presentaba un folículo. La Figura 3, panel A, muestra una superficie de piel; la Figura 3 panel B muestra que sólo es visible una fluorescencia limitada del HA marcado en esa superficie.

Figura 4: se hizo una observación similar con el HA marcado fluorescentemente de 300 000 Da (F-HA 0,30), que también fue claramente visible alrededor de los folículos pilosos. La Figura 4, panel A, muestra una superficie de piel (capa córnea), folículo capilar y eje capilar; el panel B muestra la fluorescencia verde del HA marcado alrededor del folículo.

Figura 5: no obstante, mientras la fracción de HA marcado de 300 000 Da fue también sólo escasa y superficialmente visible en la superficie de la piel, mostró claramente una acumulación preferencial entre los queratinocitos en la superficie de piel. La Figura 5, panel A, muestra una superficie de la piel; el panel B muestra que mientras que una fluorescencia limitada del HA marcado es visible en esa superficie, se acumula entre los queratinocitos.

DEFINICIONES

Constructos de Ácidos Nucleicos

[0028] "Constructo de ácido nucleico" se define aquí como una molécula de ácido nucleico, tanto mono- como bicatenario, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácido nucleico que se combinan y se yuxtaponen de una manera que, de otro modo, no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos puede ser sinónimo del término casete de expresión cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante. El término "secuencia codificante" se define aquí como una secuencia que se transcribe en el ARNm y se traduce en una enzima de interés cuando se coloca bajo el control de las secuencias de control posteriormente mencionadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un sitio de unión al ribosoma localizado justo secuencia arriba del marco abierto de lectura al extremo 5' del ARNm y una secuencia terminadora de transcripción localizada justo secuencia abajo del marco abierto de lectura al extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, ADN, ADNc, y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

[0029] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, el aislamiento a partir de ADN genómico, preparación a partir de ADNc, o una combinación de estos. La clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de tal ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando una selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de

ADN clonado con características estructurales compartidas o la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la ligasa, la transcripción activada ligada, y la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico puede ser utilizada. Los procedimientos de clonación pueden implicar la escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula vector, y la incorporación del vector recombinante en una célula de *Bacillus* donde los clones de la secuencia de ácidos nucleicos se replicarán. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semi-sintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0030] Una secuencia aislada de ácido nucleico que codifica una enzima se puede manipular en una variedad de vías para proveer la expresión de la enzima. La manipulación de la secuencia de ácidos nucleicos antes de su inserción en un constructo o vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión o célula huésped de *Bacillus*. Las técnicas para la modificación de secuencias de ácido nucleico utilizando métodos de clonación se conocen en la técnica. Se entenderá que la secuencia de ácidos nucleicos también se puede manipular in vivo en la célula huésped utilizando los métodos bien conocidos en la técnica.

[0031] Varias enzimas están implicadas en la biosíntesis de ácido hialurónico. Estas enzimas incluyen hialuronano sintasa, UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UDP-glucosa pirofosforilasa, UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, hexoquinasa, fosfoglucomutasa, amidotransferasa, mutasa, y acetiltransferasa. La hialuronano sintasa es la enzima clave en la producción de ácido hialurónico.

[0032] "Hialuronano sintasa" se define aquí como una sintasa que cataliza el alargamiento de una cadena de hialuronano por la adición de los precursores de azúcar GlcUA y GlcNAc. Las secuencias de aminoácidos de hialuronano sintasas estreptococales, hialuronano sintasas de vertebrados y la hialuronano sintasa vírica son diferentes de la hialuronano sintasa de *Pasteurella* y han sido propuestas para la clasificación como hialuronano sintasas de grupo I y Grupo II, las hialuronano sintasas del grupo I incluyendo las hialuronano sintasas estreptococales (DeAngelis, 1999). Para la producción de hialuronano en células huésped *Bacillus*, se prefieren hialuronano sintasas de un origen eucariota, tal como hialuronano sintasas de mamíferos.

[0033] La secuencia codificante de hialuronano sintasa puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos capaz de ser expresada en una célula huésped de *Bacillus*. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de cualquier origen. Los genes de hialuronano sintasa preferidos incluyen cualquiera de bien el grupo I o bien el grupo II, tal como los genes de la hialuronano sintasa grupo I de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus Pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subesp. *zooepidemicus*, o los genes de la hialuronano sintasa grupo II de *Pasteurella multocida*.

[0034] Constructos por medio de los cuales se suministran azúcares precursores de hialuronano a la célula huésped se encuentran preferiblemente en la producción del HA de la invención, bien al medio de cultivo, o siendo codificado por genes endógenos, por genes no endógenos, o por una combinación de genes no endógenos y endógenos en la célula huésped de *Bacillus*. El azúcar precursor puede ser ácido D-glucurónico o N-acetilglucosamina.

[0035] En los métodos de la presente invención, el constructo de ácidos nucleicos puede comprender además una o más enzimas de genes que codifican en la biosíntesis de un azúcar precursor de un hialuronano. Alternativamente, la célula huésped de *Bacillus* puede comprender además unos o varios segundos constructos de ácidos nucleicos que comprenden uno o más genes que codifican enzimas en la biosíntesis del azúcar precursor. La producción de hialuronano se mejora por el uso de constructos con una secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican un gen o genes que dirigen un paso en la ruta de síntesis del azúcar precursor de hialuronano. Por "dirigen un paso en la ruta de síntesis del azúcar precursor de hialuronano" se entiende que la proteína expresada del gen está activa en la formación de N-acetilglucosamina o ácido D-glucurónico, o un azúcar que es un precursor de N-acetilglucosamina o ácido D-glucurónico.

[0036] En un método preferido para suministrar azúcares precursores, se proveen constructos para mejorar la producción de hialuronano en una célula huésped con una hialuronano sintasa, por cultivo de una célula huésped con un constructo recombinante con una región de promotor heterólogo operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen que dirige un paso en la ruta de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano. En un método preferido la célula huésped también comprende un constructo recombinante con una región promotora operativamente enlazada a una hialuronano sintasa, que puede usar la misma región del promotor o una región diferente que la secuencia de ácidos nucleicos a una sintasa implicada en la biosíntesis de N-acetilglucosamina. En otra forma de realización preferida, la célula huésped puede tener un constructo recombinante con una región promotora operativamente enlazada a secuencias de ácidos nucleicos diferentes que codifican un segundo gen implicado en la síntesis de un azúcar precursor de hialuronano.

[0037] Así, la presente invención también se refiere a constructos para mejorar la producción de hialuronano por el uso de constructos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen que dirige un paso en la ruta de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano. La secuencia de ácidos nucleicos para el azúcar precursor se puede expresar del mismo promotor o uno diferente como la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hialuronano sintasa.

5 [0038] Los genes implicados en la biosíntesis de azúcares precursores para la producción de ácido hialurónico incluyen un gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, un gen de UDP-glucosa pirofosforilasa, un gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, gen de glucosa-6-fosfato isomerasa, gen de hexoquinasa, gen de fosfoglucomutasa, gen de amidotransferasa, gen de mutasa, y gen de acetiltransferasa.

10 [0039] En una célula que contiene una hialuronano sintasa, cualquiera o una combinación de dos o más de hasB, hasC y hasD o los homólogos de los mismos, tales como los tuaD, gtaB, y gcaD de *Bacillus subtilis*, respectivamente, al igual que hasE se puede expresar para aumentar los depósitos de azúcares precursores disponibles para la hialuronano sintasa. El genoma de *Bacillus subtilis* está descrito en Kunst, et al., Nature 390, 249-256, "The complete genome sequence of the Gram positive bacterium Bacillus subtilis" (20 November 1997). En algunos casos, tales como donde la célula huésped no tiene una actividad de hialuronano sintasa nativa, el constructo puede incluir el gen hasA.

15 [0040] La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las enzimas biosintéticas puede ser nativa de la célula huésped, mientras que en otros casos se puede utilizar una secuencia heteróloga. Si se expresan dos o más genes estos pueden ser genes que se asocian el uno al otro en un operón nativo, tal como los genes del operón HAS de *Streptococcus equisimilis*, que comprenden hasA, hasB, hasC y hasD. En otros casos, el uso de alguna combinación de las secuencias del gen precursor puede ser deseado, sin cada elemento del operón incluido. El uso de algunos genes nativos de la célula huésped, y otros que son exógenos también se puede preferir en otros casos. La elección dependerá de los depósitos disponibles de azúcares en una célula huésped, la capacidad de la célula para alojar sobreproducción sin interferir con otras funciones de la célula huésped, y si la célula regula la expresión de sus genes nativos de forma diferente que los genes exógenos.

25 [0041] Como un ejemplo, dependiendo de los requisitos metabólicos y condiciones de crecimiento de la célula, y los depósitos de azúcar precursor disponible, puede ser deseable aumentar la producción de N-acetilglucosamina por expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, tal como el gen hasD, el gen gcaD de *Bacillus*, y homólogos de los mismos. Alternativamente, el azúcar precursor puede ser ácido D-glucurónico. En una forma de realización tal, la secuencia de ácidos nucleicos codifica UDP-glucosa 6-deshidrogenasa. Tales secuencias de ácidos nucleicos incluyen el gen tuaD de *Bacillus*, el gen hasB de *Streptococcus*, y homólogos de los mismos. La secuencia de ácidos nucleicos también puede codificar UDP-glucosa pirofosforilasa, tal como en el gen gtaB de *Bacillus*, el gen hasC de *Streptococcus*, y homólogos de los mismos. En los métodos de la presente invención, el Gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa puede ser un gen hasB o un gen tuaD; u homólogos de los mismos.

35 [0042] En la presente invención se concibe que el gen de hialuronano sintasa y uno o más genes que codifican un azúcar precursor estén bajo el control del mismo promotor. Alternativamente, uno o más genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo promotor pero un promotor diferente que dirige el gen de hialuronano sintasa. Otra alternativa es que el gen de hialuronano sintasa y cada uno de los genes que codifican un azúcar precursor estén bajo el control de diferentes promotores. En una forma de realización preferida, el gen de hialuronano sintasa y uno o más genes que codifican un azúcar precursor están bajo el control del mismo promotor.

40 [0043] La presente invención también se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que incluye una secuencia aislada de ácidos nucleicos que codifica un operón de hialuronano sintasa que comprende un gen de hialuronano sintasa y un gen de UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, y opcionalmente uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en un gen de UDP-glucosa pirofosforilasa, un gen de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, y un gen de glucosa-6-fosfato isomerasa.

45 [0044] En algunos casos la célula huésped tendrá un constructo recombinante con una región de promotor heterólogo operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen que dirige un paso en la ruta de síntesis de un azúcar precursor de hialuronano, que puede estar coordinado con la expresión de la hialuronano sintasa de un constructo recombinante. La hialuronano sintasa se puede expresar a partir de la misma región o de una diferente del promotor que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima implicada en la biosíntesis del precursor. En otra forma de realización preferida, la célula huésped puede tener un constructo recombinante con una región promotora operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos diferente que codifica un segundo gen implicado en la síntesis de un azúcar precursor de hialuronano.

55 [0045] La secuencia de ácidos nucleicos que codifica las enzimas implicadas en la biosíntesis del(de los) azúcar(es) precursor(es) se pueden expresar a partir del mismo promotor o uno diferente como la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hialuronano sintasa. En el sentido anterior, se construyen "operones artificiales", que pueden imitar el operón de *Streptococcus equisimilis* en tener cada uno de hasA, hasB, hasC y hasD, u homólogos de los mismos, o, alternativamente, puede utilizar menos que el complemento completo presente en el operón *Streptococcus equisimilis*. Los "operones artificiales" también pueden comprender un gen de glucosa-6-fosfato isomerasa (hasE) al igual que uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en un gen de hexoquinasa, gen de fosfoglucomutasa, gen de amidotransferasa, gen de mutasa, y gen de acetiltransferasa. En el operón artificial, al menos uno de los elementos es heterólogo a otro de los elementos, como la región promotora siendo heteróloga a las secuencias codificantes.

60 [0046] En una forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, tuaD, y gtaB. En otra

forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, tuaD, gtaB, y gcaD. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA y tuaD. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, tuaD, gtaB, gcaD, y hasE. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, hasB, hasC, y hasD. En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende hasA, hasB, hasC, hasD, y hasE. Basado en las formas de realización anteriores preferidas, los genes indicados se pueden sustituir con homólogos de los mismos.

[0047] En los métodos de la presente invención, los constructos de ácidos nucleicos comprenden una secuencia codificante de hialuronano sintasa operativamente enlazada a una secuencia promotora extraña a la secuencia codificante de hialuronano sintasa. La secuencia promotora puede ser, por ejemplo, un único promotor o un promotor tándem.

[0048] "Promotor" se define aquí como una secuencia de ácidos nucleicos implicada en la unión de ARN polimerasa dirigida por ADN para iniciar la transcripción de un gen. "Promotor tándem" se define aquí como dos o más secuencias promotoras cada una de las cuales está operativamente enlazada a una secuencia codificante y median la transcripción de la secuencia codificante en el ARNm. "Operativamente enlazada" se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control, por ejemplo, una secuencia promotora, está colocada apropiadamente en una posición con respecto a una secuencia codificante de manera que la secuencia de control dirige la producción de un polipéptido codificado por la secuencia codificante. Como se ha indicado anteriormente, una "secuencia codificante" se define aquí como una secuencia de ácidos nucleicos que se transcribe en el ARNm y se traduce en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de las secuencias de control apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un sitio de unión al ribosoma localizado justo secuencia arriba del marco abierto de lectura abierto en el extremo 5' del ARNm y una secuencia terminadora de transcripción localizada justo secuencia abajo del marco abierto de lectura en el extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, ADN genómico, ADNc, semisintético, sintético, y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

[0049] En una forma de realización preferida, las secuencias promotoras se pueden obtener de una fuente bacteriana. En una forma de realización más preferida, las secuencias promotoras se pueden obtener de una bacteria Gram positiva tal como una cepa *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus agaradherens*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus, lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*; o cepa de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o de una bacteria Gram negativa, por ejemplo, *E. coli* o *Pseudomonas sp.*

[0050] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos en los métodos de la presente invención son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa (dagA) de *Streptomyces coelicolor*, gen de proteasa alcalina (aprH) de *Bacillus lentus* o *Bacillus clausii*, gen de proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (gen de subtilisina Carlsberg), gen de levansucrasa (sacB) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (amyE) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (amyL) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (amyM) de *Bacillus stearothermophilus*, gen de alfa-amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gen de penicilinas (penP) de *Bacillus licheniformis*, genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, gen CryIIIA (cryIIIA) o partes del mismo de *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis*, gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731). Otros ejemplos son el promotor del fago bacteriano spo1 y el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242:74-94 ; y en Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York.

[0051] El promotor también puede ser un promotor "consenso" que contiene la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". El promotor de consenso se puede obtener de cualquier promotor que pueda funcionar en la célula huésped *Bacillus*. La construcción de un promotor "consenso" se puede realizar por mutagénesis dirigida al sitio para crear un promotor que se ajusta más perfectamente a las secuencias de consenso establecidas para las regiones " -10" y "-35" de los promotores vegetativos "tipo sigma A" para *Bacillus subtilis* (Voskuil et al., 1995, Molecular Microbiology 17: 271-279).

[0052] En una forma de realización preferida, el promotor "consenso" se obtiene de un promotor obtenido del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa (dagA) de *Streptomyces coelicolor*, gen de proteasa alcalina (aprH) de *Bacillus clausii* o *Bacillus lentus*, gen de proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (gen de subtilisina Carlsberg), gen de levansucrasa (sacB) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (amyE) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (amyL) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (amyM) de *Bacillus stearothermophilus*, gen de alfa-amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), genes xylA y xylB de *Bacillus, Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis* CrIIIA gen (cryIIIA) o partes de las mismas, o gen promotor del fago bacteriano de beta-lactamasa procariótica spo1. En una forma de realización más preferida, el promotor "consenso" se obtiene del gen de alfa-amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[0053] Widner, et al., Patente Estadounidense n.º 6,255,076 y 5,955,310, describen promotores tándem y constructos y métodos para el uso en la expresión en las células de *Bacillus*, incluyendo el promotor de consenso corto amyQ (también llamado scBAN). El uso de la secuencia estabilizadora cryIIIA y constructos que utilizan la secuencia para la producción mejorada en *Bacillus* están también descritos aquí.

[0054] Cada secuencia promotora del promotor tándem puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestre actividad transcripcional en la célula de *Bacillus* de elección que incluye un promotor mutante, truncado e híbrido y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares tanto heterólogos como homólogos a la célula de *Bacillus*. Cada secuencia promotora puede ser nativa o extraña a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido y extraña o nativa de la célula de *Bacillus*. Las secuencias promotoras pueden ser secuencias promotoras iguales o secuencias de promotores diferentes.

[0055] Las dos o más secuencias promotoras del promotor tándem pueden promover simultáneamente la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos. Alternativamente, unas o varias de las secuencias promotoras del promotor tándem pueden promover la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos a estadios diferentes de crecimiento de la célula de *Bacillus*.

[0056] En una forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor amyQ del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otra forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos un promotor "consenso" con la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". En otra forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor amyL del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*. En otra forma de realización preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor de cryIIIA o partes del mismo (Agaisse y Lereclus, 1994, *Molecular Microbiology* 13: 97-107).

[0057] En una forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor de amyL y el promotor de cryIIIA. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos el promotor amyQ y el promotor de cryIIIA. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos un promotor "consenso" con la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10" y el promotor de cryIIIA. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias del promotor amyL. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias del promotor amyQ. En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias de un promotor "consenso" con la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". En otra forma de realización más preferida, el promotor tándem contiene al menos dos copias del promotor cryIIIA.

[0058] "Una secuencia procesadora/estabilizadora" se define aquí como una secuencia localizada secuencia abajo de una o más secuencias promotoras y secuencia arriba de una secuencia codificante a la que cada una de una o más secuencias promotoras están operativamente enlazadas de manera que todos ARNm sintetizados de cada secuencia promotora se pueden procesar para generar transcritos de ARNm con una secuencia estabilizadora en el extremo 5' de los transcritos. La presencia de tal secuencia estabilizadora en el extremo 5' de los transcritos de ARNm aumenta su vida media (Agaisse and Lereclus, 1994, *supra*, Hue et al., 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471). La secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm es complementaria a la extremidad 3' de un ARN ribosómico bacteriano 16S. En una forma de realización preferida, la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm genera transcritos esencialmente de tamaño individual con una secuencia estabilizante en el extremo 5' de los transcritos. La secuencia de procesadora/estabilizadora de ARNm es preferiblemente una, que es complementaria a la extremidad 3' de un ARN ribosómico bacteriano 16S. Véase Patente EE.UU. n.º 6,255,076 y 5,955,310.

[0059] En una forma de realización más preferida, la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm es la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm de cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* descrita en el documento WO 94/25612 y Agaisse and Lereclus, 1994, *supra*, o partes de la misma que retienen la función procesadora/estabilizadora de ARNm. En otra forma de realización más preferida, la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm es la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm SP82 de *Bacillus subtilis* descrita en Hue et al., 1995, *supra*, o partes de la misma que mantienen la función procesadora/estabilizadora de ARNm.

[0060] Cuando se emplea el promotor de cryIIIA y su secuencia procesadora/estabilizante de ARNm en los métodos de la presente invención, un fragmento de ADN con la secuencia descrita en el documento WO 94/25612 y Agaisse and Lereclus, 1994, *supra*, o partes de la misma que retienen el promotor y las funciones de procesadoras/estabilizadoras de ARNm puede ser utilizado. Además, fragmentos de ADN que contienen sólo el promotor cryIIIA o sólo la secuencia procesadora/estabilizadora de ARNm de cryIIIA se pueden preparar utilizando métodos bien conocidos en la técnica para construir varios promotores tandem y combinaciones de secuencias procesadoras/estabilizadoras de ARNm. En esta forma de realización, el promotor de cryIIIA y su secuencia promotora/estabilizadora de ARNm se colocan preferiblemente secuencia abajo de la(s) otra(s) secuencia(s) promotora(s) que constituye(n) el promotor tándem y secuencia arriba de la secuencia codificante del gen de interés.

[0061] La secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica la(s) enzima(s) deseada(s) implicada(s) en la producción de ácido hialurónico puede manipularse luego para mejorar la expresión de la secuencia de los ácidos nucleicos. La expresión se entenderá que incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no

limitando a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción. Las técnicas para modificar secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de clonación se conocen bien en la técnica.

5 [0062] Un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima puede estar operativamente enlazado a una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de la secuencia codificante en una célula de *Bacillus* bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

10 [0063] El término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes necesarios o ventajosos para la expresión de la secuencia codificante de una secuencia de ácidos nucleicos. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima. Además de las secuencias promotoras anteriormente descritas, tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia líder, una secuencia de señal, y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada traduccional y transcripcional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlazadores con el objetivo de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la
15 región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima.

[0064] La secuencia de control también puede ser una secuencia del terminador de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula de *Bacillus* para terminar la transcripción. La secuencia del terminador está operativamente enlazada al extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima o la última enzima de un operón. Cualquier terminador que sea funcional en la célula de *Bacillus* de elección se puede utilizar en la presente invención.
20

[0065] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula de *Bacillus*. La secuencia líder está operativamente enlazada al extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima. Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula de *Bacillus* de elección se puede utilizar en la presente invención.
25

[0066] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal, que codifica una secuencia de aminoácidos enlazados al extremo amino-terminal de un polipéptido que pueden dirigir el polipéptido expresado en la vía secretora de la célula. La región codificante del péptido señal puede ser nativa al polipéptido o se puede obtener de fuentes extrañas. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos puede contener intrínsecamente una región codificante del péptido señal naturalmente enlazado, en el marco de lectura de traducción, con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que es extraña a esa parte de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. La región codificante del péptido señal extraña puede ser requerida donde la secuencia codificante normalmente no contiene una región codificante del péptido señal. Alternativamente, la región codificante del péptido señal extraña puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para obtener una secreción mejorada del polipéptido en relación a la región codificante del péptido señal natural normalmente asociada a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal se puede obtener de una amilasa o un gen de proteasa de una especie de *Bacillus*. No obstante, cualquier región codificante del péptido señal capaz de dirigir el polipéptido expresado la vía secretora de una célula de *Bacillus* de elección se puede utilizar en la presente invención.
30
35
40

[0067] Una región codificante del péptido señal eficaz para células de *Bacillus* es la región codificante del péptido señal obtenida del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, el gen de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de subtilisina de *Bacillus licheniformis*, el gen de beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, los genes de proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), y el gen prsA de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal se han descrito por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57:109-137.
45

[0068] La secuencia de control también puede ser una región codificante del propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el extremo amino-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir a un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina (aprE) de *Bacillus subtilis* y proteasa neutra (nprT) de *Bacillus subtilis*.
50
55

[0069] Donde tanto las regiones del péptido señal como las del propéptido están presentes en el extremo amino-terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al amino-terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al extremo amino-terminal de la región del propéptido.
60

[0070] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que provocan la activación o desactivación de la expresión del gen respuesta a una sustancia química o estímulo físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Entre los sistemas reguladores en sistemas procarióticos se incluyen los sistemas operadores lac, tac, y trp.
65

Producción

[0071] En los métodos de la presente invención, las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de ácido hialurónico utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar en un cultivo en matraz de agitación, fermentación a gran escala o a pequeña escala (incluyendo en continuo, en discontinuo, en discontinuo alimentado, o fermentaciones en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de ácido hialurónico y el aislamiento del ácido hialurónico. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y de carbono y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de the American Type Culture Collection). El ácido hialurónico segregado se puede recuperar directamente del medio.

[0072] El ácido hialurónico resultante se puede aislar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido hialurónico se puede aislar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitando a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. El ácido hialurónico aislado puede luego ser más purificado por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitando a, cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatofoco, y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

DESCRIPCIÓN DETALLADAÁcido Hialurónico

[0073] "Ácido hialurónico" se define aquí como un glicosaminoglicano no sulfatado compuesto por la repetición de unidades de disacárido de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido glucurónico (GlcUA) enlazadas por enlaces glicosídicos beta-1,4 y beta-1,3. El ácido hialurónico también se conoce como hialuronano, hialuronato, o HA. Los términos hialuronano y ácido hialurónico se utilizan aquí de forma intercambiable.

[0074] Crestas de gallo son una fuente comercial significativa de hialuronano. Los microorganismos son una fuente alternativa. La Patente EE. UU. n.º 4,801,539 divulga un método de fermentación para preparar ácido hialurónico que implica una cepa de *Streptococcus zooepidemicus* con rendimientos publicados de aproximadamente 3,6 g de ácido hialurónico por litro. La Patente Europea n.º EP0694616 divulga procesos de fermentación que utilizan una cepa mejorada de *Streptococcus zooepidemicus* con rendimientos publicados de aproximadamente 3,5 g de ácido hialurónico por litro. Como se describe en WO 03/054163 (Novozymes), que se incorpora aquí en su totalidad, el ácido hialurónico o sales derivadas se pueden producir por recombinación, por ejemplo, en un huésped *Bacillus* Gram positivo.

[0075] Las hialuronano sintasas se han descrito a partir de vertebrados, patógenos bacterianos, y virus algales (DeAngelis, P. L., 1999, Cell. Mol. Life Sci. 56: 670-682). El documento WO 99/23227 divulga una hialuronato sintasa de grupo I de *Streptococcus equisimilis*. Los documentos WO 99/51265 y WO 00/27437 describen una hialuronato sintasa de grupo II de *Pasturella multocida*. Ferretti et al. divulgan el operón de la hialuronato sintasa de *Streptococcus pyogenes*, que se compone de tres genes, hasA, hasB, y hasC, que codifican hialuronato sintasa, UDP-glucosa deshidrogenasa, y UDP-glucosa pirofosforilasa, respectivamente (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98,4658-4663,2001). El documento WO 99/51265 describe un segmento de ácido nucleico con una región codificante para una hialuronano sintasa de *Streptococcus equisimilis*.

[0076] Dado que el hialuronano de una célula de *Bacillus* recombinante se expresa directamente al medio de cultivo, un simple proceso se puede utilizar para aislar el hialuronano del medio de cultivo. Primero, las células de *Bacillus* y los restos celulares se eliminan físicamente del medio de cultivo. El medio de cultivo se puede diluir primero, si se desea, para reducir la viscosidad del medio. Muchos métodos se conocen por los expertos en la técnica para la eliminación de células del medio de cultivo, tales como centrifugado o microfiltración. Si se desea, el sobrenadante restante se puede filtrar luego, tal como por ultrafiltración, para concentrarlo y eliminar pequeñas moléculas contaminantes del hialuronano. Siguiendo a la eliminación de las células y el desecho celular, una simple precipitación del hialuronano del medio se realiza por mecanismos conocidos. Sal, alcohol, o combinaciones de sal y alcohol se pueden utilizar para precipitar el hialuronano del filtrado. Una vez reducido a un precipitado, el hialuronano puede ser fácilmente aislado de la solución por medios físicos. El hialuronano se puede secar o concentrar de la solución filtrada usando técnicas de evaporación conocidas en la técnica, tal como secado por atomización.

[0077] El primer aspecto de la invención se refiere a un producto que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, este producto se seca y se aglomera tal y como se define aquí.

Células Huésped

[0078] Una forma de realización preferida se refiere al producto del primer aspecto, donde el ácido hialurónico o

derivado de sal se produce por recombinación, preferiblemente por una bacteria Gram positiva o célula huésped, más preferiblemente por una bacteria del género *Bacillus*.

5 [0079] La célula huésped puede ser cualquier célula de *Bacillus* adecuada para la producción recombinante de ácido hialurónico. La célula huésped de *Bacillus* puede ser una célula de *Bacillus* tipo salvaje o un mutante de la misma. Entre las células de *Bacillus* útiles en la práctica de la presente invención se incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus agaraderhens*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y células de *Bacillus thuringiensis*. Células de *Bacillus subtilis* mutante particularmente adaptadas para la expresión recombinante se describen en el documento WO 98/22598. Células de *Bacillus* no encapsulantes son particularmente útiles en la presente invención.

15 [0080] En una forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* es un *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o célula de *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula *Bacillus clausii*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus lentus*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus licheniformis*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la Célula huésped de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* A164Δ5 (véase patente EE. UU. n.º 5,891,701) o *Bacillus subtilis* 168Δ4.

25 [0081] La transformación de la Célula huésped de *Bacillus* con un constructo de ácidos nucleicos de la presente invención puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (ver, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5271-5278).

Peso Molecular

30 [0082] El nivel de ácido hialurónico se puede determinar según el método de carbazol modificado (Bitter and Muir, 1962, Anal Biochem. 4: 330-334). Por otra parte, el peso molecular medio del ácido hialurónico se puede determinar utilizando métodos estándar de la técnica, tales como los descritos por Ueno et al., 1988, Chem. Pharm. Bull. 36,4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; y Wyatt Technologies, 1999, "Light Scattering University DAWN Course Manual" y "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California.

40 [0083] En una forma de realización preferida, el ácido hialurónico obtenido por los métodos de la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 10 000 000 Da. En una forma de realización más preferida, el ácido hialurónico obtenido por los métodos de la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 25 000 a aproximadamente 5 000 000 Da. En una forma de realización más preferida, el ácido hialurónico obtenido por los métodos de la presente invención tiene un peso molecular de aproximadamente 50 000 a aproximadamente 3 000 000 Da.

45 [0084] Una forma de realización preferida se refiere al producto del primer aspecto, donde el ácido hialurónico o sal del mismo tiene un peso molecular situado en el rango entre 300 000 y 3 000 000 preferiblemente en el rango entre 400 000 y 2 500 000 más preferiblemente en el rango entre 500 000 y 2 000 000 y de la forma más preferible en el rango entre 600 000 y 1 800 000 Da.

50 [0085] Donde el ácido hialurónico producido por recombinación o la sal del mismo se usa en los métodos de la invención para producir los productos o composiciones de la invención, puede ser ventajoso para algunas aplicaciones reducir primero el peso molecular medio del ácido hialurónico o derivado de sal. Por ejemplo, ha sido declarado por diferentes fabricantes de las llamadas fracciones de bajo peso molecular de ácido hialurónico que son capaces de penetrar en la barrera de piel para restablecer el contenido natural de ácido hialurónico en la piel, por lo tanto tales fracciones son especialmente adecuadas para composiciones cosméticas vendidas como antienviejimiento de la piel y agentes antiarrugas. Para aplicaciones alimenticias, se ha demostrado que el ácido hialurónico de bajo PM penetra la barrera gastrointestinal, aumentando así su biodisponibilidad. Finalmente, el ácido hialurónico de bajo PM muestra efecto anti-inflamatorio y tiene aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Una reducción del peso molecular medio de un ácido hialurónico o una sal del mismo se puede conseguir por métodos estándar en la técnica, tales como, tratamiento térmico simple, degradación enzimática, sonicación de ultrasonidos, o hidrólisis ácida. Véase, por ejemplo, la patente EE. UU. 6,020,484 que describe una técnica de ultrasonificación de HA incluyendo NaOCl como aditivo, y T. Miyazaki et al. (2001) Polymer Degradation and Stability, 74: 77-85.

65 [0086] Por consiguiente, una forma de realización preferida se refiere al producto del primer aspecto, donde el ácido hialurónico o derivado de sal tiene un peso molecular medio bajo, situado en el rango entre 10 000 y 800 000 Da; preferiblemente en el rango entre 20 000 y 600 000 Da; más preferiblemente en el rango entre 30 000 y 500 000 Da; incluso más preferiblemente en el rango entre 40 000 y 400 000 Da; y de la forma más preferible en el rango entre 50

000 y 300 000 Da.

Sales y HA entrecruzados

5 [0087] Una forma de realización preferida se refiere a un producto del primer aspecto, que comprende una sal inorgánica de ácido hialurónico, preferiblemente hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de amonio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de zinc, o hialuronato de cobalto.

10 [0088] La preparación de un HA entrecruzado o sal del mismo, que se prepara por reticulación de HA con un compuesto epóxico polifuncional está descrita en el documento EP 0 161 887 B1. Ésteres total o parcialmente entrecruzados con un alcohol alifático, y sales de tales ésteres parciales con bases orgánicas o inorgánicas se describen en el documento US 4,957,744. Otras vías de reticulación HA se describen en las patentes EE. UU. n.º 5,616,568, 5,652,347, y 5,874,417. El HA entrecruzado también se puede preparar por tratamiento de HA con ácido bórico, de la siguiente manera:

15 Hialuronato de sodio seco (Na-HA, 203 mg), producido por recombinación en un *Bacillus subtilis* por fermentación (documento WO 03/054163; Novozymes), se disolvió en NaOH 0,2 M para dar una solución al 4%. Se añadió ácido bórico (35 mg (aprox. 1 equivalente de disacárido de HA) y la muestra se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, y luego se almacenó a 5°C durante aproximadamente 2,5 días. Una muestra de control fue preparada en paralelo exactamente como se ha descrito anteriormente, pero sin ácido bórico.

25 [0089] La viscosidad del hidrogel de borato-HA resultante fue medida a 25°C utilizando un reómetro de tensión controlada Carrimed CSL (geometría de cono: 6 cm, 2°). La viscosidad depende de la velocidad de cizalladura y aumentó al menos 4 veces (de 4,2- a 8,4 veces) en el hidrogel de borato-HA en comparación con la muestra de control, indicando la formación de una red reticulada.

30 Picos nuevos a 1200 y 945 cm⁻¹ fueron observados en el espectro FT-IR del hidrogel de borato-HA, en comparación con un espectro estándar de Na-HA correspondiente a la presencia de ésteres de borato recién formados en el hidrogel de borato-HA entrecruzado.

[0090] Por consiguiente, una forma de realización preferida se refiere al producto del primer aspecto, que comprende ácido hialurónico entrecruzado o una sal del mismo, preferiblemente el ácido hialurónico se entrecruza con ácido bórico, y más preferiblemente el ácido hialurónico entrecruzado comprende ésteres de borato.

Determinación de humedad

40 [0091] El contenido de humedad de un producto seco según la invención es la pérdida de peso, expresada como porcentaje, después de secar el polvo a 102 °C ± 2 °C a un peso constante. Un plato de pesado de cristal vacío con una tapa se seca en el horno, luego se enfría y se pesa en una balanza analítica con una sensibilidad de, al menos, 0,1 mg. Aproximadamente 3 g de polvo de producto seco se coloca en el plato y se pesa. El plato con el polvo se coloca sin la tapa en el horno y se seca durante 2 horas a una temperatura de 102 °C ± 2 °C, después se coloca en un desecador y se enfría a temperatura ambiente antes de pesarlo de nuevo. El plato con el polvo se coloca sin la tapa en el horno para secarlo durante una hora más y después se enfría y se pesa como ya se ha descrito, esto se repite hasta que el peso permanece constante, por ejemplo, hasta que dos pesadas sucesivas no difieren más de 0,5 mg.

45 [0092] El porcentaje de humedad se calcula luego como: $(W2-W3)/(W2-W1) \times 100$ donde W1 es el peso del plato de vacío, W2 es el peso del plato con polvo, y W3 es el peso del plato con polvo secado. El resultado se calcula a 2 cifras decimales, y la reproducibilidad de este método es de acerca ±0,1%.

50 [0093] Preferiblemente, el producto seco y aglomerado del primer aspecto, comprende menos del 5% de humedad, preferiblemente menos del 2%, y de la forma más preferible menos del 1% de humedad, como se determina aquí.

Tamaño de partícula

55 [0094] Un producto preferido del primer aspecto tiene un tamaño de partícula cuyo percentil 50, D₅₀, está entre 10 y 1000 micras, preferiblemente entre 100 y 1000 micras, más preferiblemente entre 150 y 900 micras, e incluso más preferiblemente entre 200 y 800 micras, determinado por medición de difracción láser de las partículas suspendidas en isopropanol, como se muestra en los ejemplos a continuación.

60 [0095] En una forma de realización preferida, la polidispersidad de un producto del primer aspecto se mide como el valor SPAN, que se calcula según la siguiente fórmula: $SPAN = (D_{90} - D_{10}) / D_{50}$, y el valor SPAN está entre 1,0 y 2,5, preferiblemente el valor SPAN está entre 1,2 y 2,2, más preferiblemente el valor SPAN está entre 1,5 y 1,9 y más preferiblemente el valor de extensión está entre 1,6 y 1,8.

Dispersabilidad

[0096] La dispersabilidad del producto de la invención se determina de la siguiente manera: 0,1 g del producto seco y aglomerado se adicionan a una botella de vidrio de 100 ml. Se adicionan 50 ml de una solución de cloruro de sodio al 0,9% (p/v) y la botella se sella y se invierte 180 grados manualmente reiteradamente hasta que todas las partículas adicionadas están dispersas como partículas únicas, es decir, hasta que no hay restos aglomerados, determinado por inspección visual, y se registra el tiempo tardado en ejecutar las inversiones en una o más hojas de datos. El tiempo así registrado es la dispersabilidad del producto.

[0097] Un producto preferido del primer aspecto tiene una dispersabilidad inferior a 30 minutos en un solvente acuoso, que es preferiblemente agua, preferiblemente menos de 20 minutos, más preferiblemente menos de 15 minutos, más preferiblemente menos de 10 minutos, más preferiblemente menos de 5 minutos, más preferiblemente menos de 3 minutos, más preferiblemente menos de 2 minutos, y de la forma más preferible menos de 1 minuto, como se determina aquí.

Solubilidad

[0098] La solubilidad en varios solventes de un producto o composición secos, o secos y agregados que comprenden ácido hialurónico según la invención se puede determinar de la siguiente manera:

Añadir 0,1 g del polvo del hialuronano a evaluar a un balón de vidrio hermético de 100ml. Se añaden entonces 50 ml de cloruro sódico 0,9% (p/v), agua de calidad de inyección, etanol absoluto, acetona o éter al matraz con la muestra de HA a evaluar. Sellar el matraz y llevar a cabo inversiones de 180 grados a mano hasta que el HA pasa a la solución, determinado por inspección visual, y se registra el tiempo tardado en ejecutar las inversiones en una o más hojas de datos. El tiempo registrado es la solubilidad de la muestra.

[0099] Un producto preferido según el primer aspecto tiene una solubilidad inferior a 60 minutos en un solvente acuoso, preferiblemente menos de 45 minutos, más preferiblemente menos de 40 minutos, incluso más preferiblemente menos de 35 minutos, 30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, y de la forma más preferible menos de 5 minutos, como se determina aquí.

Otros ingredientes

[0100] En una forma de realización preferida, el producto seco y aglomerado de la invención también puede comprender otros ingredientes, preferiblemente una o más sustancias activas, preferiblemente una o más sustancias farmacológicamente activas, y también preferiblemente un excipiente hidrosoluble, tal como lactosa.

[0101] Entre los ejemplos no limitativos de una sustancia activa o sustancia farmacológicamente activa que se pueden usar en la presente invención se incluyen fármacos de proteína y/o peptídicos, tales como, hormona de crecimiento humana, hormona del crecimiento bovina, hormona del crecimiento porcina, péptido/hormona liberador de la hormona del crecimiento, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, factor estimulante de colonias de macrófagos, eritropoyetina, proteína morfogénica de hueso, interferón o derivado del mismo, insulina o derivado de la misma, atriopeptina-III, anticuerpo monoclonal, factor de necrosis tumoral, factor activante macrófago, interleucina, factor de degeneración tumoral, factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento epidérmico, activador tisular del pasminógeno, factor IIV, factor IIIIV, y uroquinasa.

[0102] Se puede incluir un excipiente hidrosoluble con el objetivo de estabilizar el(los) elemento(s) activo(s), tal excipiente puede incluir una proteína, por ejemplo, albúmina o gelatina; un aminoácido, tal como glicina, alanina, ácido glutámico, arginina, lisina y una sal de los mismos; un carbohidrato tal como glucosa, lactosa, xilosa, galactosa, fructosa, maltosa, sacarosa, dextrano, manitol, sorbitol, trehalosa y sulfato de condroitina; una sal inorgánica tal como fosfato; un surfactante tal como TWEEN® (ICI), polietilenglicol, y una mezcla de los mismos. El excipiente o estabilizador se puede usar en una cantidad que varía de 0,001 a 99% en peso del producto.

[0103] Diferentes aspectos de la invención se refieren a varias composiciones y medicamentos comprendiendo, entre otros constituyentes, una cantidad eficaz del producto tal y como se define en el primer aspecto, y una sustancia activa, preferiblemente la sustancia activa es un agente farmacológicamente activo; un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente, preferiblemente un excipiente hidrosoluble, y de la forma más preferible lactosa.

[0104] Una forma de realización preferida de la invención se refiere a productos o composiciones de la invención comprendidos en una pastilla efervescente, que de otra forma se pueden formular como se describe en la técnica. Por ejemplo, una pastilla efervescente puede comprender ácido cítrico, bicarbonato sódico, y un oligosacárido u otro azúcar. Las pastillas efervescentes son fáciles de almacenar, y con el producto de rápida disolución de la presente invención, se disuelven rápidamente y así proporcionan un medio ideal de administración oral.

[0105] Además, aspectos de la invención se refieren a artículos que comprenden un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en los aspectos y formas de realización anteriores, por ejemplo, un artículo cosmético, un artículo sanitario, un artículo quirúrgico o médico. En un aspecto final, la invención se refiere a

una cápsula de medicamento o microcápsula que comprende un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en otros aspectos y formas de realización de la invención.

Método de producción

5

[0106] La presente invención, en otro aspecto, proporciona un método para producir un producto tal y como se define en el primer aspecto de la invención y/o formas de realización preferidas de las mismas, incluyendo el método las etapas de:

10

- a) secado de un producto que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo; y
- b) aglomerado el producto seco.

Secado por atomización y aglomeración

15

[0107] En una forma de realización preferida del método, el paso de secado se realiza utilizando un secador de pulverización, preferiblemente un atomizador con boquillas de dos fluidos (TFN) o un atomizador giratorio, y preferiblemente el secado por pulverización se realizó utilizando un TFN y los siguientes rangos de condición:

20

| | |
|--|--------------|
| Temperatura de entrada: | 100 - 200 °C |
| Temperatura de salida: | 40 - 90 °C |
| Presión de la boquilla de atomización: | 2 - 10 bar |
| Temperatura del aire de boquilla: | 40 - 100 °C |
| Temperatura de alimentación: | 40 - 100 °C |

25

[0108] Otra forma de realización preferida se refiere al método anterior, donde el paso de aglomeración se realiza utilizando un lecho fluidizado; preferiblemente donde la temperatura de entrada del lecho fluidizado se encuentra en el rango de 30 - 80 °C, y donde la solución acuosa del polvo se pulveriza en el polvo seco a un índice correspondiente a una temperatura de salida de 25 - 50 °C.

30

[0109] Otra forma de realización preferida se refiere al método anterior, donde el paso de aglomeración se realiza utilizando una mezcla de agua-solvente, preferiblemente con una proporción de agua-solvente de entre 0:100 y 50:50, y más preferiblemente con una proporción agua:solvente entre 0:100 y 20:80 preferiblemente el solvente es un alcohol, y más preferiblemente el solvente es isopropanol.

[0110] Se prefiere que el secado y aglomeración se realice en un paso, preferiblemente utilizando un secador de pulverización fluidizado.

35

Métodos para el uso del producto o composición

[0111] Varios aspectos de la invención se refieren a métodos de realizar procedimientos de tratamiento, por ejemplo, en el campo médico, utilizando un producto del primer aspecto, o utilizando composiciones de la invención.

40

[0112] Un aspecto se refiere a un método de realizar procedimientos en oftalmología, que comprende el uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición de la invención.

45

[0113] Otro aspecto se refiere a un método de realizar procedimientos en el tratamiento de osteoartritis, que comprende el uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto o de una composición de la invención.

[0114] Otro aspecto se refiere a un método de realizar procedimientos en el tratamiento contra el cáncer, que comprende el uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto o de una composición de la invención.

50

[0115] Otro aspecto todavía se refiere a un método de realizar procedimientos en el tratamiento de pérdida capilar o calvicie, la mejora que comprende el uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto o de una composición de la invención.

55

[0116] Un aspecto se refiere a un método de realizar la administración transdérmica o dermal de un agente farmacológicamente activo, que comprende el uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto o de una composición de la invención.

[0117] Otro aspecto se refiere a un método de realizar la administración dermal de un cosmético, que comprende el uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto o de una composición de la invención.

60

[0118] Un aspecto se refiere a un método oftalmológico para usar un producto tal y como se define en el primer aspecto

o una composición de la invención.

5 [0119] Otro aspecto se refiere a un método para tratar la osteoartritis, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en el primer aspecto o de una composición de la invención a un mamífero, preferiblemente la administración es dermal, transdérmica, oral o por inyección.

[0120] Un aspecto se refiere a un método de tratar una herida, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en el primer aspecto o de una composición de la invención a un mamífero.

10 [0121] Otro aspecto se refiere todavía a un método de tratamiento de la pérdida de cabello o calvicie, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en el primer aspecto o de una composición de la invención a un mamífero, preferiblemente la administración es dermal, transdérmica, oral o por inyección.

15 [0122] Otros aspectos se refieren al uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición de la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento de osteoartritis, un medicamento para un tratamiento oftalmológico, un medicamento para el tratamiento contra el cáncer, un medicamento para el tratamiento de una herida, un medicamento para angiogénesis, o un medicamento para el tratamiento de la pérdida capilar o calvicie.

20 [0123] Un aspecto final se refiere al uso de un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición de la invención para la producción de un hidratante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

25 [0124] Una alimentación líquida que consiste en una solución de hialuronato de sodio que contiene aproximadamente 8 g/litro se secó por atomización utilizando dos tipos de técnicas de atomización diferentes: A) Boquillas de Dos Fluidos (TFN) y B) Atomizador Giratorio. Los tipos de técnicas de secado por pulverización y de equipamiento disponibles comercialmente se prevén también como adecuados para los fines de esta invención (Véase por ejemplo Niro Atomizers Inc).

30 [0125] Los polvos secos resultantes fueron notablemente diferentes. El polvo producido por el TFN tiene una densidad aparente significativamente más pequeña. La razón para esta diferencia se reveló tras posteriores análisis mostrados a continuación.

| Atomizador (lote n.º) | Densidad de partícula (g/ml) | Tiempo de solubilidad (min) | Tamaño de partícula (D ₅₀) |
|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|
| A) TFN (04PBAC0016) | 0,210 | 15 | 95 |
| B) Atomizador Giratorio (MAG30012) | 0,430 | 31 | 45 |

40 [0126] Se observó que el tiempo de solubilidad disminuyó significativamente utilizando el principio de atomización TFN, en comparación con el atomizador giratorio. A pesar del hecho de que el tamaño de partícula fue mucho mayor, que normalmente llevaría a un aumento del tiempo de solubilidad. Se encontró que la disminución del tiempo de solubilidad, no obstante, era debida al aire incluido en las partículas secadas por pulverización con TFN. Esto podría verse a partir de la densidad de partícula del producto TFN, que fue menos de la mitad de la del producto seco producido por el atomizador giratorio.

Ejemplo 2

45 [0127] Una preparación de alimentación líquida consistiendo en 75 000 g solución de hialuronato de sodio, con aproximadamente 8 g/litro de hialuronato de sodio y 2400 g de cloruro sódico se añadió a un secador de pulverización a un ritmo constante. El hialuronato tiene un peso molecular de aproximadamente 690,000 Da. El secador de pulverización tiene un diámetro de aproximadamente 1,8 m y una altura de aproximadamente 5 m. Se seleccionó un atomizador con boquillas de dos fluidos (TFN) para la atomización de la alimentación. Las condiciones de secado se ajustaron para dar un lote de polvo seco (lote n.º 03PBAC0035-1) con el tamaño de partícula deseado:

Temperatura de entrada: 160 °C
 Temperatura de salida: 75 °C
 Presión de atomización de boquilla: 4 bar
 Temperatura del aire de boquilla: 70 °C
 Temperatura de alimentación: 60 °C

55 [0128] La distribución del tamaño de las partículas resultante fue medida utilizando difracción láser en una suspensión del polvo en isopropanol:

| | |
|-------------------|------------|
| D ₁₀ : | 12 micras |
| D ₅₀ : | 39 micras |
| D ₉₀ : | 84 micras |
| Peso molecular: | 631,000 Da |
| SPAN: | 1,77 |

[0129] Una medida de la polidispersidad es el valor 'SPAN', que se puede calcular según la siguiente fórmula:

$$\text{SPAN} = (D_{90} - D_{10}) / D_{50}$$

[0130] El peso molecular se mantuvo casi invariable durante la operación de secado, demostrando así que el proceso de secado por atomización es muy suave a pesar de las altas temperaturas aplicadas.

Ejemplo 3

[0131] Muestras de 5 g del polvo secado por atomización fabricadas en el ejemplo 2 se aglomeraron por medio de la suspensión de las muestras de polvo en 20 ml de cada una de las siguientes mezclas solvente-agua:

100 % de isopropanol (IPA)

90 % de isopropanol

87 % de isopropanol

[0132] Las suspensiones se filtraron posteriormente y se secaron a vacío. Los sólidos secos retenidos en los filtros se molieron y se seleccionaron a través de tamices para eliminar todas las partículas menores de 150 micras y mayores de 600 micras.

[0133] Se encontró sorprendentemente que las partículas aglomeradas así fabricadas se dispersaban y se disolvían muy rápido en la solución salina. Para investigar este fenómeno, se midió el tamaño de partícula con más precisión utilizando difracción láser en una suspensión del producto en puro IPA. Los tamaños de partícula así determinados (percentiles 10, 50, y 90) se muestran en la tabla 1 a continuación. Se observó un aumento significativo en el tamaño medio de partícula aglomerada conforme el contenido de agua en la mezcla de solvente-agua usada para la aglomeración se aumentó de 0 a 13%.

Tabla 1

| Tamaño de partícula | D(v,0,1) micra | D(v,0,5) micra | D (v,0,9) micra |
|---------------------|----------------|----------------|-----------------|
| 100% IPA | 14 | 60 | 242 |
| 90% IPA | 20 | 71 | 505 |
| 87% IPA | 21 | 179 | 538 |

[0134] Para conseguir una dispersión suficientemente rápida se descubrió que el tamaño de partícula debería ser mayor de aproximadamente 180 micras. Consecuentemente, se preparó una fracción de criba de 180 - 355 micras del lote que se aglomeró utilizando un 87 % de IPA. Esta fracción se comparó posteriormente con el producto no aglomerado pero de otra manera idéntico del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación. Claramente, el tiempo de solubilidad se mejora significativamente mediante el proceso de aglomeración.

Tabla 2

| Lote (tratamiento) | Tiempo de dispersión seg | Tiempo de solubilidad min |
|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 03PBAC0035 (No aglomerado) | > 1 minuto | 14,0 |
| 03PBAC0035 (Aglomerado, 87 % de IPA) | < 1 seg | 2,5 |

Ejemplo 4

[0135] El método descrito en el ejemplo 3 se utilizó para tratar los dos lotes descritos en el ejemplo 1 para ver si sería posible modificar el tiempo de solubilidad de un producto de hialuronato puro. En la tabla 3 a continuación se muestran los resultados para una fracción de criba de 250-500 micras para los productos aglomerados. Se ve claramente que el tiempo de solubilidad se puede reducir significativamente por combinación de los métodos del ejemplo 1 y 3.

Tabla 3

| Atomizador (lote n.º) | Tiempo de Solubilidad, No aglomerado (min) | Tiempo de Solubilidad aglomerado (min) |
|------------------------------------|--|--|
| A) TFN (04PBAC0016) | 15 | 9 |
| B) atomizador giratorio (MAG30012) | 31 | 17 |

Ejemplo 5

5 [0136] El polvo fabricado en el ejemplo 1 se trató de la siguiente manera: aproximadamente 100 g de polvo seco se añadieron a un lecho fluido de laboratorio STREA. La temperatura de entrada fue 55 °C. Una solución acuosa al 1 % del polvo fabricado en el ejemplo 1 se pulverizó luego en el polvo seco a un ritmo correspondiente a una temperatura de salida de 35 °C. Los aglomerados formados resultantes se evaluaron en cuanto a solubilidad, y mostraron una solubilidad mejorada notablemente en comparación con el polvo no tratado.

10 **Ejemplo 6**

15 [0137] Una preparación de alimentación líquida, consistiendo en 75 000 g de solución de hialuronato de sodio y 2400 g de cloruro sódico, se adicionó a un secador de pulverización fluidificada (FSD) a ritmo constante. El secador por pulverización FSD se equipó con un lecho fluido integrado colocado bajo la torre de secado por atomización. El aire de secado con finos arrastrados se eliminó a través del techo del secador de pulverización y posteriormente se pasó por un ciclón que eliminó las partículas. Las partículas eliminadas se transportaron neumáticamente de nuevo al secador de pulverización donde fueron inyectadas en la nube de boquilla.

20 [0138] El hialuronato tiene un peso molecular de 800 kDa y una concentración de aproximadamente 8 g/litro. El secador de pulverización tiene un diámetro de aproximadamente 1,8 m y una altura de aproximadamente 5 m. Las condiciones de secado se ajustaron para dar un lote de polvo seco (lote n.º 04PBAC0014) con el tamaño de partícula deseado:

| | |
|-------------------------------------|---------|
| Temperatura de entrada: | 160 °C |
| Temperatura de salida: | 68 °C |
| Presión de atomización de boquilla: | 3,5 bar |
| Temperatura del aire de boquilla: | 50 °C |
| Temperatura de alimentación: | 60 °C |

25 [0139] Posteriormente, la distribución del tamaño de las partículas se midió utilizando difracción láser en una suspensión del polvo en isopropanol:

| | |
|-------------------------------|------------|
| D ₁₀ : | 89 micras |
| D ₅₀ : | 220 micras |
| D ₉₀ : | 466 micras |
| Peso molecular: | 796 KDa |
| Concentración de hialuronato: | 493 mg/g |

30 [0140] Se puede observar, que el peso molecular se mantuvo casi invariable por la operación de secado, demostrando así que el proceso de secado por pulverización es muy suave a pesar de las altas temperaturas aplicadas.

35 [0141] La fracción del producto entre 250 y 500 micras se evaluó en cuanto a su dispersabilidad/solubilidad, como se muestra en la tabla 4, y se descubrió que se dispersaba y disolvía en aproximadamente 2 minutos, que fue mucho más rápido que los 15 minutos observados con el producto secado atomizado no aglomerado. La absorbancia de la solución resultante se midió también a 600 nm para asegurar que no quedaran en la solución partículas diminutas (tabla 4).

Tabla 4

| Atomizador (lote n.º) | Tiempo de Solubilidad (min) | Absorbancia A _{600nm} |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| TFN (04PBAC0014) | 2 | 0,005 |

Ejemplo 7. Peso molecular y penetración en la piel

40 [0142] Se estudió la permeabilidad de la piel de cuatro fracciones de peso molecular medio diferente de ácido hialurónico radiomarcado utilizando celdas de difusión contigua con un diámetro de 2 cm (área de piel eficaz de 3,14 cm²). El volumen de la fase receptora fue entre 8 y 8,5 ml, y el volumen del compartimento donante fue entre 1 y 1,5 ml.

45 [0143] Se descongeló piel de dermatoma (750 micrometros) de la oreja porcina y se colocó en un lado de la celda de difusión. Cualquier pelo notable se recortó cuidadosamente con tijeras. El otro lado de la célula de difusión se cerró con un disco de silicona. El receptor se llenó con solución salina de tampón fosfato (PBS) a pH 7,4. Se introdujo una barra de agitación magnética.

50 [0144] Tres muestras de 10 microlitros de la fase donante (provistas de una proporción frío/caliente de 5,64 mg/ml frío a 22,56 microgramo/ml caliente) se tomaron para determinar la actividad específica. Las fases donantes se llenaron luego de la solución proporcionada: durante 5 ml (el volumen recibido), sólo 3 o 4 celdas podrían ser ajustadas.

[0145] Las celdas se colocaron en una placa agitadora y el experimento se realizó a temperatura ambiente. Después de 5 horas, la fase receptora entera se retiró y la radioactividad allí se determinó por recuento de escintilación de líquidos.

La cámara receptora se llenó luego con PBS y se permitió la difusión durante toda la noche.

5 [0146] Después de 22 horas (es decir, 5 h + 17 h), la solución de receptor fue otra vez retirada y analizada en cuanto a radioactividad. Las celdas se desmontaron y la piel se incubó con 5 ml de SOLUENE® (PerkinElmer) durante 48 horas, o hasta la disolución completa, antes de añadir el fluido luminiscente y recontar la radioactividad. Los resultados experimentales se resumen para las cuatro fracciones de diferente peso molecular de HA en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de resultados de los experimentos que examinan la permeabilidad del HA radiomarcado a través de piel de oreja porcina cortada *in vitro* después de 5 horas (5h) y 22 horas (22h).

| | HA 1500 KDa (ng/cm ²) | HA 800 KDa (ng/cm ²) | HA 300 KDa (ng/cm ²) | HA 50 KDa (ng/cm ²) |
|---|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| R1,5h | 14,1 | 38,7 | 168,7 | 524,2 |
| R2,5h | 10,4 | 20,8 | 62,9 | 171,1 |
| R3,5h | 18,8 | 50,3 | 101,0 | |
| R4,5h | | | 63,4 | |
| Promedio | 14,4 | 36,6 | 99,0 | 347,6 |
| Variación | 4,2 | 14,9 | 49,8 | 249,7 |
| Flujo medio en (ng/cm²/h) | 2,9 0,8 | 7,3 3,0 | 19,8 10,0 | 69,5 49,9 |
| R1,22h | 77,4 | 233,2 | 733,3 | 2669,4 |
| R2,22h | 50,9 | 95,6 | 368,1 | 1007,8 |
| R3,22h | 93,4 | 273,6 | 544,1 | |
| R4,22h | | | 360,4 | |
| Promedio | 73,9 | 200,81 | 501,5 | 1838,6 |
| Variación | 21,5 | 93,3 | 176,3 | 1174,9 |
| Flujo medio en (ng/cm²/h) | 3,4 1,0 | 9,1 4,2 | 22,8 8,0 | 83,6 53,4 |
| piel 1 | 14307,3 | | 3806,2 | 1212,2 |
| piel 2 | 14744,5 | | 3337,5 | 1062,9 |
| piel 3 | 18049,1 | | 5780,4 | 1840,9 |
| piel 4 | | | 4055,4 | |
| Promedio | 15700,3 | | 4244,89 | 1372,0 |
| Variación | 2045,8 | | 1066,07 | 412,9 |

10

[0147] Típicamente, se obtuvieron 3 o 4 réplicas (Tabla 5: R1, R2, R3; R4). En ocasiones, no obstante, un problema experimental era evidente (p. ej., una perforación de piel obvia, o una filtración de la celda de difusión), en cuyo caso sólo dos réplicas fueron posibles.

15

[0148] Las recuperaciones totales de radioactividad ('balance de masa') fueron menos del 100%, principalmente debido a que la naturaleza viscosa de las fases donantes evitó su eliminación completa del compartimento de celda de difusión. El problema aumentó con el peso molecular creciente de HA.

20

[0149] Estos resultados se visualizan en la Figura 1, e indican que existe una dependencia aparente del transporte percutáneo respecto al peso molecular de HA, con una mejor permeabilidad aparente para las especies de peso molecular inferior. No hubo ninguna diferencia significativa entre los flujos aparentes medidos a 5 y 22 horas para cualquiera de las fracciones de tamaño HA estudiadas.

25

[0150] Globalmente, por lo tanto, la penetración del HA depende de peso molecular de HA. Cuanto inferior es el peso molecular mejor es la penetración en la piel.

[0151] No obstante la cantidad que penetra la piel corresponde a una fracción pequeña de la radioactividad aplicada.

30

Ejemplo 8. Distribución tópica de diferentes fracciones de peso molecular de HA

[0152] La absorción de la piel y la distribución de dos fracciones de peso molecular medio diferentes de ácido hialurónico marcado fluorescentemente fue investigada utilizando microscopía confocal de barrido láser, los pesos moleculares medios de las fracciones de HA fueron 300 000 y 50 000 Da.

35

[0153] Las muestras fluorescentes de HA fueron soluciones acuosas a una concentración de 1 mg/mL; las soluciones fluorescentes de HA se diluyeron en 10 veces con HA no marcado de peso molecular idéntico en agua destilada antes

de la aplicación.

- 5 [0154] La piel usada para la aplicación de HA fue de oreja porcina. Cada fracción de HA se aplicó y se evaluó en al menos tres muestras separadas de piel de origen de animales diferentes. Las muestras de piel fueron obtenidas frescas y se mantuvieron almacenadas congeladas durante no más de 2 semanas antes del uso.
- 10 [0155] Antes del experimento, una muestra de piel descongelada (aprox. $0,8 \text{ cm}^2$) se emparedó entre las fases donante y receptoras de las celdas de difusión de vidrio simple y se mantuvo a 32°C . La fase donante fue 0,1 ml de solución de HA marcado, y la fase receptora fue tampón pH 7,4.
- 15 [0156] Las soluciones fluorescentes de HA se mantuvieron en contacto con las muestras de piel durante 3 horas, luego se retiró la solución de donante en exceso, la piel se lavó 3 veces con tampón pH 7,4 y se secó suavemente con tejido.
- [0157] La piel se montó inmediatamente sobre una lámina de vidrio, con el lado de capa córnea arriba, y se examinó microscópicamente sin tratamiento posterior utilizando un microscopio de barrido láser LSM 410 invert (Carl Zeiss, Alemania). El sistema se equipa con un láser de argón-kriptón con longitudes de onda de excitación de 568 y 488nm, que se usaron separadamente para ver la piel y el HA marcado, respectivamente.
- 20 [0158] Las imágenes se obtuvieron utilizando objetivos Plan-neofluar 10x/0,3 y 40x/0,6 y luego posteriormente se codificó el color digitalmente de modo que la fluorescencia de la piel fue roja, y la fluorescencia del HA marcado fue verde. Las imágenes se codificaron por color y fueron cubiertas (o superpuestas) utilizando software confocal Zeiss LSM.
- 25 [0159] En experimentos separados, se examinaron muestras de piel en ausencia de las sondas fluorescentes. La autofluorescencia de la piel porcina permitió la identificación de características estructurales. Para visualizar la distribución del HA fluorescente, se obtuvieron imágenes confocales en el plano XY (es decir, paralelo a la superficie de la piel). La superficie de la piel ($z = 0 \text{ }\mu\text{m}$) se definió como el plano de formación de imágenes de fluorescencia más brillante con una característica de morfología de capa córnea. Diferentes réplicas de las imágenes, usando al menos tres piezas separadas de piel, se adquirieron para cada tratamiento.
- 30 [0160] El HA marcado fluorescentemente de 50 000 Da (F-HA 0,05) fue sólo escasamente y superficialmente visible en la superficie de la capa córnea, pero la fracción de HA marcado fue claramente visible alrededor de y/o en folículos pilosos. La Figura 2, panel A, muestra la superficie de la piel (capa córnea), folículo capilar y eje capilar; el panel B claramente muestra que la fluorescencia verde de HA es principalmente visible alrededor de y/o en el folículo.
- 35 [0161] La escasa fluorescencia en la superficie de la capa córnea fue confirmada en otra muestra de piel, que no tenía un folículo presente. La Figura 3, panel A, muestra una superficie de piel; el panel B muestra que sólo una fluorescencia limitada de HA marcado es visible en esa superficie.
- 40 [0162] Se hizo una observación similar con el HA marcado fluorescentemente de 300 000 Da (F-HA 0,30), que también fue claramente visible alrededor de los folículos pilosos. La Figura 4, panel A, muestra una superficie de piel (capa córnea), folículo capilar y eje capilar; el panel B muestra la fluorescencia verde del HA marcado alrededor del folículo.
- 45 [0163] No obstante, mientras la fracción de HA marcado de 300 000 Da fue también sólo escasamente y superficialmente visible en la superficie de la piel, mostró claramente una acumulación preferencial entre los queratinocitos en la superficie de la piel. La Figura 5, panel A, muestra una superficie de piel; el panel B muestra que mientras una fluorescencia limitada de HA marcado es visible en esa superficie, se acumula entre los queratinocitos.
- 50 [0164] Las conclusiones son que las muestras de HA de bajo peso molecular muestran alguna acumulación preferencial en y alrededor de estructuras foliculares en la piel. Esto podría ser una ruta de permeabilidad posible para productos de HA de bajo PM de composiciones de la invención, que tendrían interés particular respecto al tratamiento de pérdida capilar o calvicie.
- 55 [0165] No hubo ninguna evidencia de transporte a través de la capa córnea intacta de HA de bajo PM de 0,05 MDa ya que después de la eliminación de HA sólo pocas especies fluorescentes fueron encontradas escasamente y superficialmente en los estratos de superficie. Finalmente, el HA de 0,30 MDa muestra una acumulación preferencial entre los queratinocitos en la superficie de piel.
Esto puede contribuir en la mejora de la hidratación de la piel mejorada ya que la barrera de HA podría restringir la pérdida pasiva transepidermal de agua de la piel.
- 60

REIVINDICACIONES

1. Producto que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, el cual producto se seca y se aglomera.
- 5 2. Producto según la reivindicación 1, donde el ácido hialurónico o sal del mismo se produce por recombinación, preferiblemente por una bacteria Gram positiva, más preferiblemente por una bacteria del género *Bacillus*.
- 10 3. Producto según la reivindicación 1 o 2, donde el ácido hialurónico o sal del mismo tiene un peso molecular situado en el rango entre 300 000 y 3 000 000, preferiblemente en el rango entre 400 000 y 2 500 000, más preferiblemente en el rango entre 500 000 y 2 000 000 y de la forma más preferible en el rango entre 600 000 y 1 800 000.
- 15 4. Producto según la reivindicación 1 o 2, donde el ácido hialurónico o sal del mismo tiene un peso molecular medio bajo en el rango entre 10 000 y 800 000 Da; preferiblemente en el rango entre 20 000 y 600 000 Da; más preferiblemente en el rango entre 30 000 y 500 000 Da; incluso más preferiblemente en el rango entre 40 000 y 400 000 Da; y de la forma más preferible en el rango entre 50 000 y 300 000 Da.
- 20 5. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, que comprende una sal inorgánica de ácido hialurónico, preferiblemente hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de amonio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de zinc, o hialuronato de cobalto.
- 25 6. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que comprende ácido hialurónico entrecruzado o sal del mismo, preferiblemente el ácido hialurónico se entrecruza con ácido bórico, y más preferiblemente el ácido hialurónico entrecruzado comprende ésteres de borato.
- 30 7. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, que comprende menos de un 5% de humedad, preferiblemente menos de un 2%, y de la forma más preferible menos de un 1% de humedad, como se determina aquí.
- 35 8. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, que tiene un tamaño de partícula cuyo percentil 50, D₅₀, está situado entre 10 y 1000 micras, preferiblemente entre 100 y 1000 micras, más preferiblemente entre 150 y 900 micras, e incluso más preferiblemente entre 200 y 800 micras, determinado por medición de difracción láser de las partículas suspendidas en isopropanol.
- 40 9. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, que tiene una dispersabilidad inferior a 30 minutos en un solvente acuoso, preferiblemente menos de 20 minutos, más preferiblemente menos de 15 minutos, más preferiblemente menos de 10 minutos, más preferiblemente menos de 5 minutos, más preferiblemente menos de 3 minutos, más preferiblemente menos de 2 minutos, y de la forma más preferible menos de 1 minuto, como se determina aquí.
- 45 10. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, que tiene una solubilidad inferior a 60 minutos en un solvente acuoso, preferiblemente menos de 45 minutos, más preferiblemente menos de 40 minutos, incluso más preferiblemente menos de 35 minutos, 30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, y de la forma más preferible menos de 5 minutos, como se determina aquí.
- 50 11. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, que también comprende una sustancia activa.
- 55 12. Producto según la reivindicación 11, donde la sustancia activa es una sustancia farmacológicamente activa.
13. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, que también comprende un excipiente hidrosoluble, preferiblemente lactosa.
14. Composición que comprende un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 y una sustancia activa, preferiblemente la sustancia activa es un agente farmacológicamente activo.
15. Composición según la reivindicación 14, que también comprende un excipiente hidrosoluble, preferiblemente lactosa.
- 60 16. Composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, junto con un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 65 17. Composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 como vehículo, junto con un agente farmacológicamente activo.
18. Artículo cosmético que comprende como sustancia activa una cantidad eficaz de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17.

19. Artículo sanitario, médico o quirúrgico que comprende un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17 preferiblemente el artículo es un pañal, una compresa, una esponja quirúrgica, una esponja de cicatrización de una herida, o una parte comprendida en un apósito u otro material de vendaje de heridas.
20. Cápsula de medicamento o microcápsula que comprende un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17.
21. Método para producir un producto seco y aglomerado que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, el método incluye las etapas de:
- secado de un producto que comprende ácido hialurónico o una sal del mismo; y
 - aglomeración del producto seco,
- donde el paso de aglomeración se realiza utilizando un lecho fluidizado o una mezcla agua-solvente.
22. Método según la reivindicación 21, donde el ácido hialurónico o sal del mismo se produce por recombinación, preferiblemente por una bacteria Gram positiva, más preferiblemente por una bacteria del género *Bacillus*.
23. Método según la reivindicación 21 o 22, donde el ácido hialurónico o derivado de sal tiene un peso molecular situado en el rango entre 300 000 y 3 000 000 preferiblemente en el rango entre 400 000 y 2 500 000, más preferiblemente en el rango entre 500 000 y 2 000 000 y de la forma más preferible en el rango entre 600 000 y 1 800 000.
24. Método según la reivindicación 21 o 22, donde el ácido hialurónico o sal del mismo tiene un peso molecular medio bajo en el rango entre 10 000 y 800 000 Da; preferiblemente en el rango entre 20 000 y 600 000 Da; más preferiblemente en el rango entre 30 000 y 500 000 Da; incluso más preferiblemente en el rango entre 40 000 y 400 000 Da; y de la forma más preferible en el rango entre 50 000 y 300 000 Da.
25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 - 24, donde el producto comprende una sal inorgánica de ácido hialurónico, preferiblemente hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de amonio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de zinc, o hialuronato de cobalto.
26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 - 25, donde el producto comprende ácido hialurónico entrecruzado o una sal del mismo, preferiblemente el ácido hialurónico se entrecruza con ácido bórico, y más preferiblemente el ácido hialurónico entrecruzado comprende ésteres de borato.
27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 - 26, donde el paso de secado se realiza utilizando un secador de pulverización o un atomizador giratorio, preferiblemente un secador de pulverización de boquilla de dos fluidos (Two-Fluid-Nozzle, TFN).
28. Método según la reivindicación 27, donde el secado por pulverización se realizó utilizando un secador de pulverización TFN y los siguientes rangos de condiciones:
- | | |
|-------------------------------------|--------------|
| Temperatura de entrada: | 100 - 200 °C |
| Temperatura de salida: | 40 - 90 °C |
| Presión de atomización de boquilla: | 2 - 10 bar |
| Temperatura del aire de boquilla: | 40 - 100 °C |
| Temperatura de alimentación: | 40 - 100 °C |
29. Método según la reivindicación 21, donde la temperatura de entrada del lecho fluidizado se encuentra en el rango de 30 - 80 °C, y donde la solución acuosa del polvo se pulveriza en el polvo seco a un ritmo correspondiente a una temperatura de salida de 25 - 50 °C.
30. Método según la reivindicación 21, donde el paso de aglomeración se realiza utilizando una mezcla agua-solvente con una proporción de agua-solvente comprendida entre 0:100 y 50:50, y más preferiblemente con una proporción de agua-solvente entre 0:100 y 20:80.
31. Método según la reivindicación 30, donde el solvente es un alcohol, preferiblemente isopropanol.
32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 - 29, donde el secado y aglomeración se realiza en un paso, preferiblemente utilizando un secador de pulverización fluidizado.
33. Uso de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 -17 para la producción de un medicamento para el tratamiento de la osteoartritis.

- 5 34. Uso de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17 para la producción de un medicamento para un tratamiento oftalmológico.
35. Uso de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17 para la producción de un medicamento para el tratamiento contra el cáncer.
- 10 36. Uso de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17 para la producción de un medicamento para el tratamiento de una herida.
- 15 37. Uso de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17 para la producción de un medicamento para la angiogénesis.
38. Uso de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17 para la producción de un hidratante.
- 20 39. Uso de un producto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17 para la producción de un medicamento para el tratamiento de la pérdida capilar o calvicie.

Figura 1

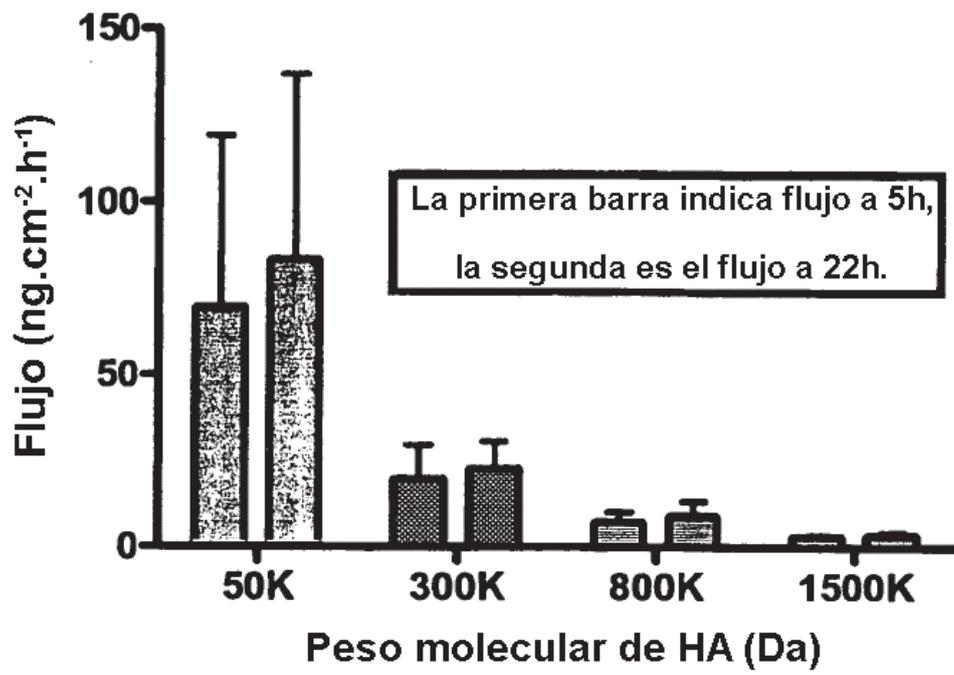


Fig. 2 - Panel A

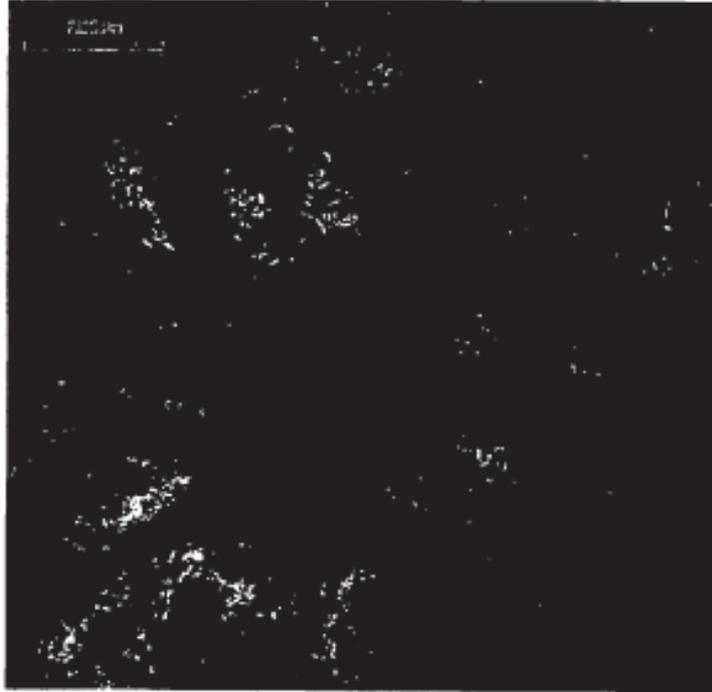


Fig. 2 - Panel B

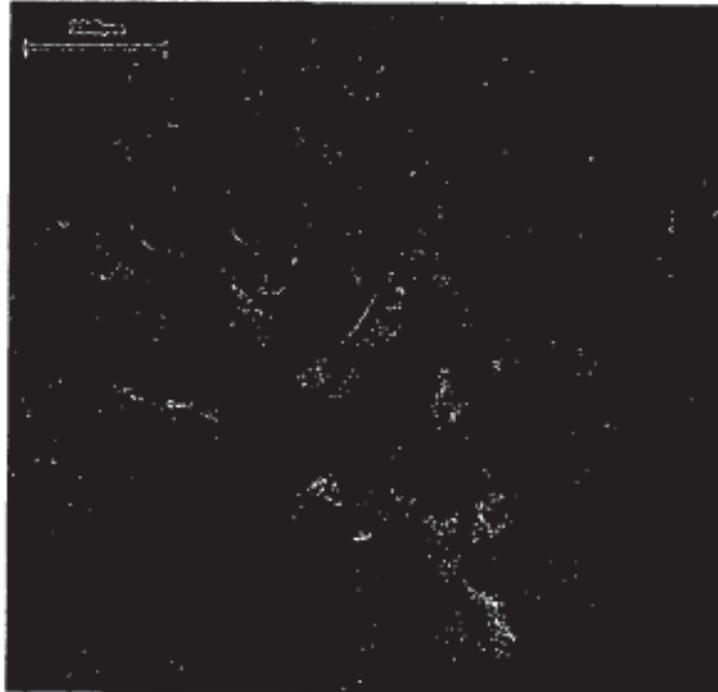


Fig. 3 - Panel A

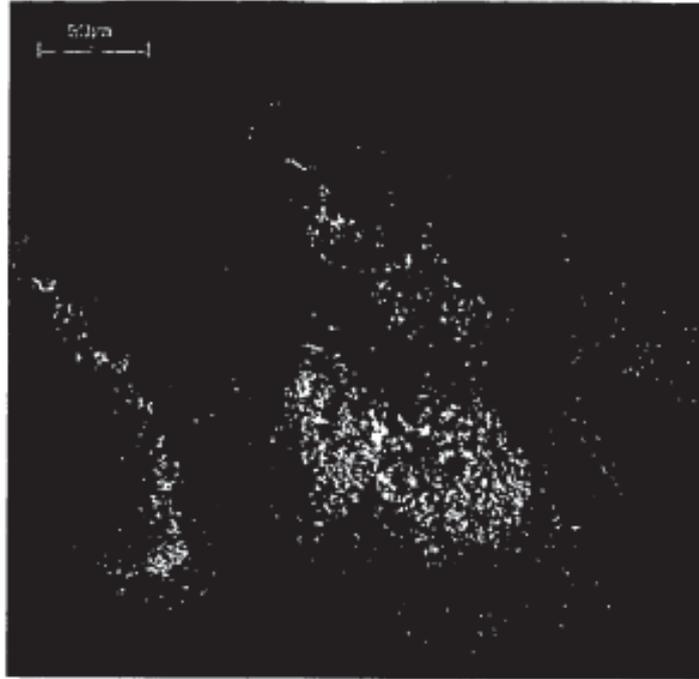


Fig. 3 - Panel B

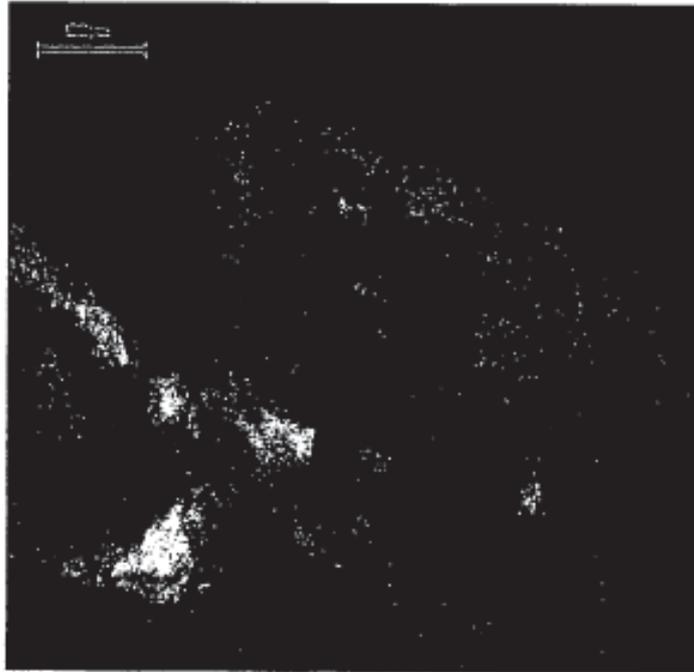


Fig. 4 - Panel A

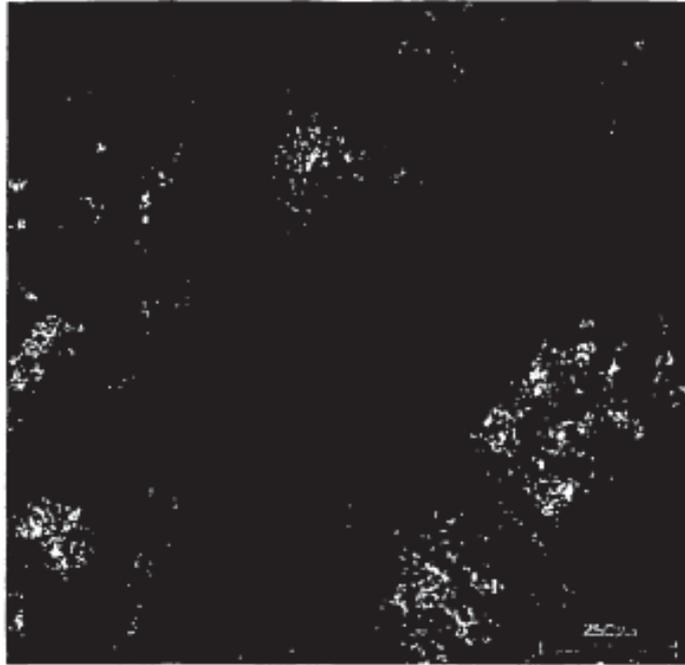


Fig. 4 - Panel B

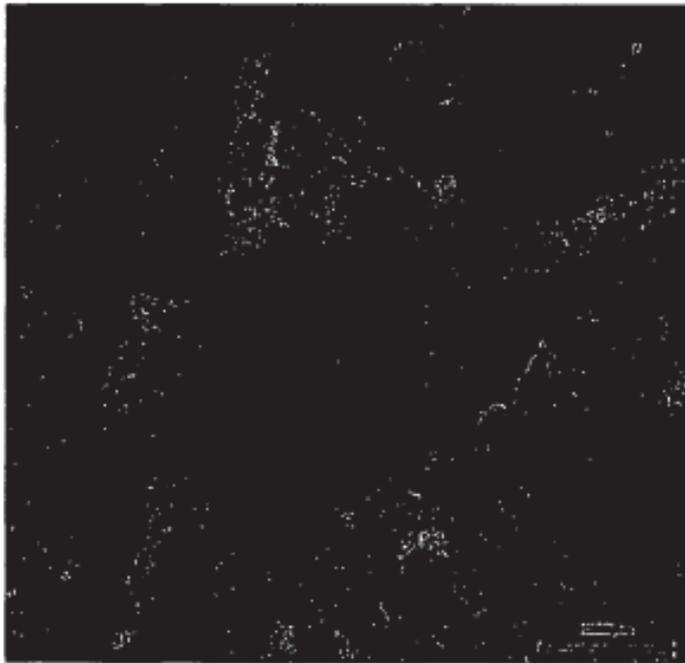


Fig. 5 - Panel A

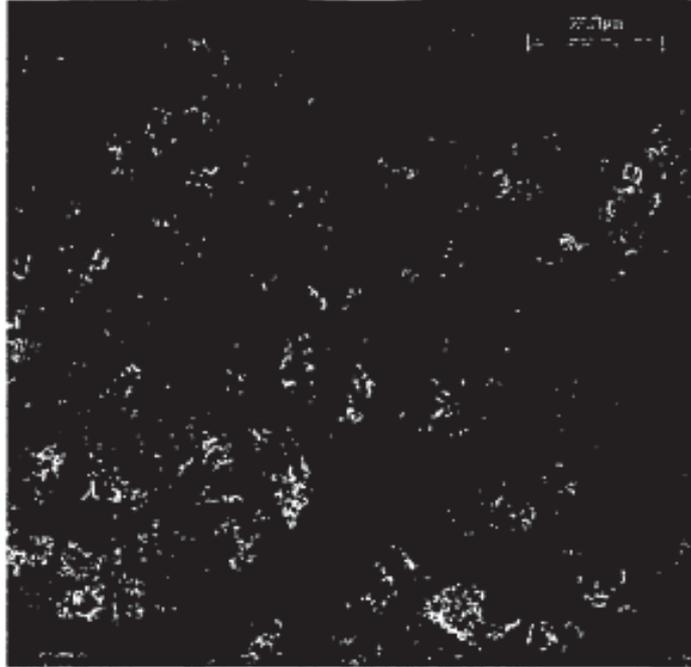


Fig. 5 - Panel B

