

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 067**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08	(2006.01)
C08L 5/08	(2006.01)
A61K 31/728	(2006.01)
C08B 31/00	(2006.01)
C08B 37/00	(2006.01)
C08J 3/28	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2011 PCT/EP2011/065633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12032151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011 E 11769800 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2614090**

54 Título: **Complejos híbridos cooperativos de ácido hialurónico**

30 Prioridad:

09.09.2010 IT MI20101635

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

22.05.2017

73 Titular/es:

**ALTERGON S.A. (100.0%)
Via Dogana Vecchia 2
6900 Lugano, CH**

72 Inventor/es:

**DE ROSA, MARIO;
D'AGOSTINO, ANTONELLA;
LA GATTA, ANNALISA y
SCHIRALDI, CHIARA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 613 067 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

Complejos híbridos cooperativos de ácido hialurónico

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los productos a base de ácido hialurónico.

5 Técnica anterior

El ácido hialurónico, indicado en general en lo sucesivo como AH, junto con sus sales, denominadas hialuronanos, es un polisacárido de cadena lineal con carga negativa, compuesto por una repetición de n unidades de disacárido (-4GlcUA β 1-3GlcNAc β 1-), en el que el ácido D-glucurónico (GlcUA) y la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) se unen con enlaces glicosídicos β -1,3 y β -1,4 alternos.

10 El AH es un polisacárido muy soluble en agua y las soluciones de AH muestran un comportamiento viscoelástico de tipo no newtoniano. Estas propiedades dependen del peso molecular (y por lo tanto, como el AH es un polímero lineal, de la longitud de la cadena), la concentración, el pH y la fuerza iónica.

15 Debido a sus propiedades y funciones biológicas, el AH tiene un alto valor añadido (su valor comercial es muy superior al de los otros polisacáridos naturales), con aplicaciones que van desde el sector médico a los cosmeceúticos y nutracéuticos. Sus propiedades viscoelásticas, junto con la completa ausencia de toxicidad o inmunogenicidad (la estructura del AH es siempre la misma en todos los organismos vivos en los que está presente), han dado lugar a aplicaciones variadas y extensas.

20 En muchas de estas aplicaciones, el rendimiento depende del peso molecular del AH. Para ello, el peso medio molecular del AH y el índice de polidispersidad Mw/Mn (que mide la anchura de la curva de distribución de peso molecular, en la que Mn es el peso molecular promedio en número, que se define como el peso total de todas las moléculas de polímero en una muestra dividido por el número total de moléculas, y Mw es el peso molecular promedio en peso, que tiene en cuenta la masa variable de las moléculas presentes) deben ser los estándares de oro a considerar en el desarrollo de procedimientos de producción del AH y en las estrategias para su aplicación.

25 En particular, la amplia variedad de respuestas biológicas del AH relacionadas con su peso molecular ahora supone que el AH de bajo peso molecular (L-AH) y el AH de alto peso molecular (H-AH) se deben utilizar en contexto.

Descripción de la invención

30 La presente invención describe complejos híbridos cooperativos entre el L-AH y el H-AH, designados con las siglas L/H-AH, sus características, su procedimiento de producción y el uso de los mismos en el ámbito de la medicina, los cosméticos y los productos alimentarios. Las fuerzas débiles, tales como los enlaces de hidrógeno o las interacciones hidrofóbicas, pueden dar lugar a interacciones muy estables entre las moléculas, si estas son de tipo cooperativo. La cooperatividad se desarrolla cuando es posible formar enlaces múltiples entre las moléculas, y al ser débiles, se rompen aleatoriamente, pero se pueden volver a formar inmediatamente debido a la existencia de enlaces vecinos intactos, que mantienen los componentes estructurales del enlace a una distancia útil para volver a formarse.

35 Las moléculas de AH en solución se caracterizan por fenómenos de interacción cooperativa basados en la formación de enlaces hidrófobos y enlaces de hidrógeno entre las cadenas, y la cooperatividad de estas interacciones depende de la duración y por lo tanto del peso molecular de las cadenas. Las largas cadenas de H-AH producen interacciones estables entre ellas, que implican a todas las moléculas presentes en la solución, dando lugar a una red tridimensional, mientras que las moléculas de L-AH producen interacciones que son menos estables, lo que da lugar a agregación de los sistemas que no implican simultáneamente todas las moléculas presentes, que en su lugar interactúan en grupos. Este modo de agregación diferente del H-AH y el L-AH en solución es responsable de las grandes diferencias en el comportamiento reológico, tales como por ejemplo la viscosidad de soluciones de AH, que es una propiedad muy importante para numerosas aplicaciones, especialmente en el campo médico.

45 La rápida caída de la viscosidad de las soluciones de AH en función del peso molecular, de hecho, en realidad depende de esta capacidad variable para la interacción intermolecular, de modo que, a igualdad de concentración, las soluciones de H-AH con un peso molecular superior a $1 \cdot 10^6$ Da tienen viscosidades de órdenes de magnitud superiores a las de las soluciones de L-AH con un peso molecular de entre $5 \cdot 10^3$ y $5 \cdot 10^5$ Da. Debido a la fuerte cooperatividad de las interacciones entre las cadenas largas de H-AH, cuando el L-AH se disuelve en una solución viscosa de H-AH, a corto plazo no se observan diferencias significativas en la viscosidad de la solución resultante, lo que indica que las dos poblaciones moleculares se comportan de forma independiente y que la formación de agregados híbridos cooperativos de L/H-AH es un proceso termodinámicamente desfavorable. Solo con el paso del tiempo (días - semanas), se observa una disminución lenta pero constante en la viscosidad que no se puede atribuir a los procesos hidrolíticos, y este efecto es más evidente si el peso molecular del L-AH es inferior a 10^5 Da. La variación continua de las propiedades fisicoquímicas, en particular de la viscosidad, de estas soluciones las hace inadecuadas para aplicaciones prácticas, que en su lugar requieren características reológicas constantes.

Por tanto, es claro, a la vista de lo anterior, que actualmente no hay disponibles complejos híbridos cooperativos entre el ácido hialurónico de bajo peso molecular y el ácido hialurónico de alto peso molecular, que tienen propiedades que permiten su uso para los fines deseados.

5 Ahora, sorprendentemente, se ha descubierto que es posible crear híbridos cooperativos estables de L/H-AH al someter soluciones acuosas que contienen juntos H-AH y L-AH a un ciclo térmico configurado adecuadamente.

Las soluciones de híbridos cooperativos estables de L/H-AH de acuerdo con la invención se caracterizan por viscosidades que no cambian con el tiempo y que son notablemente más bajas que antes del ciclo térmico.

Dicho comportamiento no se puede atribuir simplemente a un proceso de despolimerización térmica del AH.

10 Hay cuatro parámetros que determinan de manera crítica la formación de los complejos de L/H-AH y sus propiedades reológicas:

- a) la presencia simultánea de los dos tipos de AH (L-AH y H-AH) en la misma solución;
- b) el peso molecular de las dos especies de AH utilizadas en el procedimiento de formación del sistema híbrido de L/H-AH;
- c) las proporciones relativas de las dos especies de AH utilizadas;
- 15 d) el perfil del ciclo térmico al que se expone la solución.

La presencia simultánea de los dos tipos de AH (L-AH y H-AH) en la misma solución es una condición necesaria puesto que, cuando está en solución, sometida al ciclo térmico alcanza una temperatura suficientemente alta, se crean condiciones de energía que al mismo tiempo son capaces de romper todas las interacciones entre las cadenas de H-AH y las que existen entre las cadenas de L-AH, y en estas condiciones ya no existen las condiciones previas debido a que las interacciones débiles que se desarrollan entre las moléculas en solución son de tipo cooperativo y las cadenas de polímero se comportan como entidades independientes. A continuación, cuando la solución se enfría dentro del ámbito del ciclo de tratamiento térmico, las interacciones entre cadenas comienzan a volver a formarse de manera creciente, que en este caso se desarrolla al azar entre todas las moléculas de AH presentes en solución, tanto de alto como de bajo peso molecular, dando lugar a sistemas híbridos, que se estabilizan cuando, al aumentar el número de enlaces intermoleculares débiles, su cooperatividad significa que el modo de interacción que se ha desarrollado entre las cadenas de polímero de diferente peso molecular no cambia con el tiempo. La confirmación de la validez de este mecanismo es el hecho de que, al someter por separado al ciclo térmico a dos soluciones, una de L-AH y otra de H-AH, y a continuación proceder a su mezcla después de enfriar, a igualdad de concentración de las especies en solución, no se observa una disminución drástica e inmediata en la viscosidad atribuida a la formación del sistema híbrido, que solo se puede formar si las dos especies moleculares están presentes simultáneamente durante el ciclo térmico.

El peso molecular del AH utilizado en la construcción de sistemas híbridos de L/H-AH determina de manera crítica sus características reológicas; cuanto mayor es la diferencia de peso molecular entre el L-AH y el H-AH utilizados, a igualdad de concentración, mayor es la disminución de la viscosidad del sistema híbrido en relación con la del H-AH. Los complejos híbridos cooperativos de L/H-AH, que se caracteriza por una disminución de la viscosidad, se puede obtener si el peso molecular del L-AH se encuentra entre $1 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^6$ Da y el del H-AH viene dado por la fórmula $MW_{H-AH} \geq MW_{L-AH}/0,9$.

Las proporciones relativas de L-AH y H-AH, que determinan la estequiometría del híbrido, contribuyen a la modificación de sus propiedades reológicas con respecto a las especies hibridadas entre ellos; la disminución de la viscosidad debido a la formación de los complejos aumenta con el aumento de la relación estequiométrica de L-AH/H-AH utilizada. Normalmente dicha relación se encuentra entre 0,1 y 10, preferentemente entre 0,5 y 2.

Los complejos de acuerdo con la invención normalmente tienen una viscosidad de 1,1 a 200 veces inferior que la de una solución que contiene el ácido hialurónico H-AH solo utilizado para formar el complejo.

45 El perfil térmico que da lugar a la formación de sistemas híbridos cooperativos de L/H-AH a partir de soluciones que contienen L-AH y H-AH contempla que la solución se caliente primero a temperaturas de entre 80 y 160 °C, preferentemente entre 100 y 120 °C y después se enfríe rápidamente a temperatura ambiente. Los sistemas híbridos de L/H-AH obtenidos de este modo son estables en el tiempo, lo que demuestra el mantenimiento de sus características reológicas.

50 Como ya se ha mencionado, las soluciones de complejos híbridos de L/H-AH de acuerdo con la presente invención se pueden obtener fácilmente mezclando soluciones acuosas de H-AH y L-AH del peso molecular deseado y sometiendo a la solución resultante al ciclo térmico indicado anteriormente; Preferentemente, la concentración de la solución de L-AH se encuentra entre el 0,01 y el 50 % en p/p, mientras que la de la solución de H-AH se encuentra entre el 0,01 y el 10 % en p/p.

55 Los complejos híbridos cooperativos de L/H-AH en estado sólido se pueden obtener a partir de soluciones que los contienen de varias maneras:

- a) por precipitación de las soluciones que los contienen, por adición de disolventes orgánicos miscibles con agua, tales como alcoholes de bajo peso molecular, acetona, etc.;
 b) por evaporación del disolvente;
 c) mediante secado por pulverización;
 d) por liofilización.

5 Por otra parte se pueden obtener complejos híbridos cooperativos similares a los descritos anteriormente, caracterizados por bajos valores de viscosidad dinámica, por tratamiento térmico a alta temperatura de las soluciones acuosas de H-AH con polisacáridos de bajo peso molecular, tales como condroitina o sulfato de condroitina.

10 Los complejos híbridos cooperativos de L/H-AH, debido a sus características reológicas, tienen un interés considerable en algunas aplicaciones biomédicas, por ejemplo: bio-revitalización de la piel mediante inyecciones intradérmicas de AH; técnicas de viscosuplementación para resolver situaciones patológicas relacionadas con trastornos inflamatorios de las articulaciones; tratamiento de la cistitis dentro de la vejiga; tratamiento de enfermedades inflamatorias de la vagina; tratamiento de enfermedades alveolares; tratamiento de enfermedades orales.

15 La ventaja más importante relacionada con el uso de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH es su baja viscosidad, que en la práctica médica permite el uso de soluciones de mayor concentración, pero todavía son suficientemente fluidos para poderse inyectar con agujas y catéteres de pequeño calibre o poderse nebulizar.

20 Una vez en contacto con el entorno biológico, los complejos híbridos cooperativos de L/H-AH se comportan como sistemas para la liberación lenta de L-AH y H-AH, porque la complejidad química del microambiente, caracterizado por la presencia de otras especies en solución y las enormes superficies de las estructuras celulares, permiten la resolución gradual de las interacciones moleculares que caracterizan el complejo, haciendo que tanto el L-AH como el H-AH están disponibles en contexto *ab initio*, especies moleculares que *in vivo* tienen papeles diferenciados, L-AH como señalización por la interacción con receptores presentes en las superficies celulares y H-AH como constituyente fundamental de la matriz extracelular.

25 A continuación se dan ejemplos no limitantes, la descripción de la producción, las características y la utilización de los complejos híbridos cooperativos de L/H-AH.

Ejemplo 1 - Producción de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH a diferentes temperaturas.

30 Dos soluciones acuosas de H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5) y L-AH (PM $3,3 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,8) se prepararon al 2 % en p/v en agua destilada, que se utilizan para la preparación de las diversas soluciones dadas en la Tabla 1.

Estas soluciones, que contienen L-AH y H-AH al mismo tiempo, se someten a un ciclo térmico en autoclave que contempla: a) una fase de calentamiento desde 25 °C hasta una temperatura máxima en 10 min; b) mantener esta temperatura durante un período determinado de tiempo (10 min o 40 min); c) enfriar la solución a 25 °C en 10 min.

35 El PM y el índice de polidispersidad Mw/Mn se determinan mediante un sistema de cromatografía de exclusión por tamaños equipado con un multidetector, que consiste en un viscosímetro de cuatro puentes, un refractómetro, un detector de dispersión de la luz en ángulo recto (RALS) y un detector de dispersión de luz de bajo ángulo (LALS), patentados por el grupo estadounidense Viscotek (www.viscotek.com). La señal medida con el LALS es proporcional al peso molecular y la concentración, que medidas con el detector viscosimétrico es proporcional a la concentración de la muestra y la viscosidad intrínseca, mientras que el refractómetro proporciona una medición de la concentración. El aparato Viscotek no solo hace que sea posible determinar el peso molecular del AH, sino también evaluar el grado de no uniformidad del peso molecular en la población de moléculas presentes, descrito por el índice de polidispersidad Mw/Mn, calculado automáticamente por el aparato de Viscotek, y que se define como la relación del peso molecular promedio

45
$$\text{Peso molecular promedio (Mw)} = \frac{\sum_i m_i M_i}{\sum_i m_i}$$

en la que

50 m_i es la masa de polímero con un peso molecular M_i y $\sum_i m_i$ es la masa total de polímero, una expresión que, al establecer $m_i = n_i M_i$ también se puede dar como $Mw = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i m_i}$ y el peso molecular promedio en peso ($Mn = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i}$ en la que $n_i M_i$ es la masa de polímero con peso molecular M_i y $\sum_i n_i$ es el número total de moles de polímero presente). Las mediciones de viscosidad dinámica η se realizan en un reómetro Anton Paar Physica MCR 301, utilizando una geometría con cilindros coaxiales. η se determina a 25 °C a una velocidad de cizallamiento constante ($\dot{\gamma} = 2s^{-1}$) que entra dentro del intervalo de viscosidad newtoniana de la solución de polímero (η es constante con respecto a $\dot{\gamma}$ y solo depende de la conformación del polímero en solución).

TABLA 1

Muestra	Sol. 2 % en p/v (ml)		H ₂ O (ml)	Solución inicial	Mezcla con ciclo térmico-T _{máx} (°C) -Tiempo (min)			
	H-AH	H-AH			120 °C; 10	110 °C; 10	100 °C; 10	100 °C; 40
	η (Pa · s)							
H-AH	100	0	100	21,321	5,632	10,241	11,513	5,442
L-AH	0	100	100	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
L/H-AH	100	100	0	19,010	0,038	0,062	0,943	0,051
H-AH + L-AH *	100	100	0	-----	4,334	9,523	10,530	4,912

* Las dos soluciones al 2 % en p/v se tratan primero a alta temperatura y a continuación se mezclan en una relación 1:1 en volumen.

Tabla 1 - Medición de la viscosidad dinámica de soluciones con una concentración del 1 % en p/v de L-AH (PM $3,3 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,8) y H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5) y de los correspondientes complejos cooperativos estables de L/H-AH con una concentración del 1 % en p/v y una relación de L-AH/H-AH de 1:1 en p/p. El ciclo de tratamiento térmico en autoclave contempla una fase de calentamiento de 10 minutos de 25 °C a T_{máx}, permaneciendo a T_{máx} durante un tiempo determinado y una fase de enfriamiento desde T_{máx} a 25 °C en 10 minutos. Las mediciones de η se toman inmediatamente después del tratamiento térmico.

Los datos de la Tabla 1 demuestran que: a) el calentamiento de soluciones de H-AH en las condiciones indicadas produce una ligera hidrólisis de las cadenas largas de polímeros (120 °C, 10 min PM $9,51 \cdot 10^5$ Da; 110 °C, 10 min PM $1,04 \cdot 10^6$ Da; 100 °C, 10 min PM $1,20 \cdot 10^6$ Da; 100 °C, 40 min PM $9,10 \cdot 10^5$ Da) con una disminución proporcional de η; b) el calentamiento de soluciones de L-AH en las condiciones indicadas produce una ligera hidrólisis de las cadenas de polímero (120 °C, 10 min PM $2,96 \cdot 10^4$ Da; 110 °C, 10 min PM $3,12 \cdot 10^4$ Da; 100 °C, 10 min PM $3,25 \cdot 10^4$ Da; 100 °C, 40 min PM $2,88 \cdot 10^4$ Da) con una disminución proporcional de η, que después del calentamiento ya no es medible; c) la mezcla simple en solución de L-AH y H-AH da lugar, inmediatamente después de la mezcla, a una ligera reducción de η, porque con L-AH de peso molecular muy bajo ($3,3 \cdot 10^4$ Da) hay un inicio de activación, incluso a temperatura ambiente, de las interacciones parciales a base de enlaces de hidrógeno entre cadenas cortas y largas; d) el calentamiento de una solución que contiene simultáneamente H-AH y L-AH da lugar a la rotura cuantitativa de los enlaces de hidrógeno, causando la pérdida de las condiciones de cooperatividad preexistentes entre las largas cadenas y entre las cadenas cortas; e) en la fase de enfriamiento posterior, si ambas cadenas cortas y largas están presentes en solución, las interacciones de cooperación con puentes de hidrógeno se pueden restaurar al azar entre las cadenas cortas y largas, dando lugar a sistemas híbridos estabilizados por interacciones de cooperación; f) el calentamiento previo de soluciones de H-AH y L-AH y su posterior mezcla después de la fase de enfriamiento no da lugar a la formación de híbridos cooperativos, sino a un comportamiento similar al descrito en c); g) el híbrido L/H-AH, en ausencia de interacciones con otras moléculas o superficies, se mantiene estable a temperatura ambiente, ya que, incluso si los enlaces de hidrógeno se abren al azar, la presencia de una multiplicidad de interacciones de este tipo a lo largo de las cadenas mantiene los elementos estructurales responsables de la unión a una distancia adecuada para volver a formarse; h) cuanto más alta es la temperatura a la que se somete la mezcla de H-AH + L-AH o más largo es el tiempo de exposición, más eficaz es la formación del híbrido cooperativo.

Ejemplo 2 - Producción de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH con diferente composición.

Se preparan complejos híbridos cooperativos de L/H-AH de diferente composición disolviendo H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5) y L-AH (PM $3,3 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,8) en 100 ml de agua, como se muestra en la Tabla 2. Las soluciones resultantes se someten al siguiente ciclo térmico en autoclave: de 25 °C a 120 °C en 10 min, durante 10 min a 120 °C, de 120 °C a 25 °C en 10 min. La viscosidad dinámica de las muestras, el PM y el índice de polidispersidad Mw/Mn de L-AH, H-AH y L/H-AH se determinaron como se describe en el Ejemplo 1. Los datos en la Tabla 2 demuestran la dependencia de la viscosidad de complejos de cooperación de L/H-AH sobre la relación L-AH/H-AH: cuanto mayor sea la relación, menor es la viscosidad.

TABLA 2

Muestra de L/H-AH (L-AH/H-AH en p/p)	L-AH	H-AH	Tratamiento a 120 °C - 10 min	$\eta_{H-AH}/\eta_{L/H-AH}$
	(g en 100 ml de agua)		η * (Pa · s)	
0,0	0,0	1,0	5,632	-----
0,5	0,5	1,0	0,068	82,8
1,0	1,0	1,0	0,038	148,2
1,5	1,5	1,0	0,033	170,7

* Las mediciones de η se toman inmediatamente después de mezclar.

Tabla 2 - Medida de la viscosidad dinámica η de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH con diferente relación L-AH/H-AH. La concentración de H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5) se mantiene constante al 1 % en p/v, mientras que la de L-AH (PM $3,3 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,8) varía del 0 al 1,5 % en p/v. El ciclo de tratamiento térmico en autoclave contempla una fase de calentamiento de 10 min desde 25 °C a $T_{m\acute{a}x}$, manteniendo a $T_{m\acute{a}x}$ durante un tiempo específico y una fase de enfriamiento de $T_{m\acute{a}x}$ a 25 °C en 10 min. Las mediciones de η se toman inmediatamente después del tratamiento térmico.

Ejemplo 3 - Producción de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH utilizando L-AH de diferente peso molecular.

Se preparan soluciones acuosas de H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5), L-AH (PM $3,3 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,8) y L-AH (PM $2,2 \cdot 10^5$ Da; Mw/Mn 1,7) al 2 % en p/v en agua destilada, que se utilizan para la preparación de las diversas soluciones dadas en la Tabla 3. Las soluciones resultantes se someten al siguiente ciclo térmico en autoclave: de 25 a 120 °C en 10 min, durante 10 minutos a 120 °C, de 120 a 25 °C en 10 min. La viscosidad dinámica η de las muestras, el PM y el índice de polidispersidad Mw/Mn de L-AH, H-AH y L/H-AH se determinaron como se describe en el Ejemplo 1.

Los datos de la Tabla 3 demuestran que, en igualdad de todos los demás parámetros, cuanto menor es el PM de L-AH en el híbrido cooperativo, mayor es la disminución de η . Al comparar los valores de η de complejos híbridos de L/H-AH usando L-AH con PM $3,3 \cdot 10^4$ Da o $2,20 \cdot 10^5$ Da el valor de la relación $\eta_{H-AH}/\eta_{L/H-AH}$ aumenta aproximadamente 50 veces.

TABLA 3

Muestra	Sol. 2 % en p/v (ml)		H ₂ O (ml)	Tratamiento a 120 °C - 10 min	$\eta_{H-AH}/\eta_{L/H-AH}$
	H-AH	L-AH		η (Pa · s)	
H-AH	100	0	100	5,632	-----
L-AH $3,3 \cdot 10^4$ Da	0	100	100	<0,001	-----
L-AH $2,2 \cdot 10^5$ Da	0	100	100	0,016	-----
L/H-AH $3,3 \cdot 10^4$ Da	100	100	0	0,038	148,2
L/H-AH $2,2 \cdot 10^5$ Da	100	100	0	1,771	3,0

Tabla 3 - Medición de la viscosidad dinámica η de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH con una relación de L-AH/H-AH de 1 en p/p, contruidos con L-AH de diferente PM. Se preparan soluciones acuosas de H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5), L-AH (PM $3,3 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,8) y L-AH (PM $2,2 \cdot 10^5$ Da; Mw/Mn 1,7) al 2 % en p/v en agua destilada, que se utilizan para la preparación de las diferentes soluciones indicadas en la tabla. Las soluciones resultantes se someten al siguiente ciclo térmico en autoclave: de 25 a 120 °C en 10 min, durante 10 min a 120 °C, de 120 a 25 °C en 10 min.

Ejemplo 4 - Análisis cinético de la formación de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH con y sin ciclo térmico.

Se preparan soluciones acuosas de H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5), L-AH (PM $3,3 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,8) y L-AH (PM $2,2 \cdot 10^5$ Da; Mw/Mn 1,7) al 2 % en p/v en agua destilada, que se utilizan para la preparación de las diversas soluciones dadas en la Tabla 4. La mitad de las soluciones resultantes se mantienen a la temperatura y la otra mitad se someten primero al siguiente ciclo térmico en autoclave: de 25 a 120 °C en 10 min, durante 10 min a 120 °C, de

120 a 25 °C en 10 min y a continuación se mantienen a temperatura ambiente. La viscosidad dinámica η se mide a través del tiempo, para ambas series de muestras. El PM, el índice de polidispersidad Mw/Mn de L-AH, de H-AH y de L/H-AH y la viscosidad dinámica η de las muestras se determinaron como se describe en el Ejemplo 1.

5 Los datos de la Tabla 4 demuestran que: a) cuando PM de L-AH es del orden de 10^4 Da, comienza la formación de complejos cooperativos de L/H-AH, aunque lentamente, incluso a temperatura ambiente, debido a que la menor cooperatividad que existe entre las cadenas cortas de L-AH permite que éstos puedan competir en las interacciones cooperativas existentes entre las cadenas largas de H-AH, dando lugar a la formación de sistemas híbridos; b) por esta razón las soluciones obtenidas mediante mezcla, a temperatura ambiente, de H-AH y L-AH con PM del orden de 10^4 Da, muestran una viscosidad dinámica que varía con el tiempo; c) por el contrario, el tratamiento térmico genera, en unos pocos minutos, complejos híbridos cooperativos, que una vez alcanzan condiciones de equilibrio no muestran un cambio en su viscosidad dinámica con el tiempo; d) cuando el PM de L-AH es del orden de 10^5 , en ausencia de tratamiento térmico, la mezcla simple de las dos soluciones no altera significativamente su viscosidad dinámica con el tiempo, debido a la fuerte cooperatividad preexistente entre las cadenas de L-AH, lo que impide su interacción con las cadenas de H-AH.

15 TABLA 4

Muestra	120 °C; 10'		Sin tratamiento térmico			
	Tiempo (días)					
	0	10	0	4	14	24
	$\eta \cdot (\text{Pa} \cdot \text{s})$					
H-AH + L-AH $3,3 \cdot 10^4$ Da	0,04	0,04	19,01	6,91	1,05	0,68
H-AH + L-AH $2,20 \cdot 10^5$ Da	1,77	1,77	24,03	23,71	22,41	21,01

20 Tabla 4 - Cinética de la viscosidad dinámica η de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH con una relación de L-AH/H-AH de 1 en p/p, contruidos con L-AH de diferente PM. Se preparan soluciones acuosas de H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5), L-AH (PM $3,3 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,8) y L-AH (PM $2,2 \cdot 10^5$ Da; Mw/Mn 1,7) al 2 % en p/v en agua destilada, que se utilizan para la preparación de las diferentes soluciones indicadas en la tabla. La mitad de las soluciones resultantes se mantienen a la temperatura y la otra mitad se someten primero al siguiente ciclo térmico en autoclave: de 25 a 120 °C en 10 min, durante 10 min a 120 °C, de 120 a 25 °C en 10 min y a continuación, se mantienen a temperatura ambiente.

25 **Ejemplo 5** - Preparación de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH en estado sólido por precipitación de la solución que los contiene.

30 La solución acuosa del complejo híbrido cooperativo de L/H-AH, obtenida como se describe en el Ejemplo 1 con un ciclo térmico que contempla la exposición a una $T_{\text{máx}}$ de 120 °C durante 10 min, se trata con 2 volúmenes de etanol anhidro, añadido lentamente y con agitación. Se obtiene un precipitado pulverulento blanco, que sedimenta rápidamente y se puede secar a vacío con calentamiento. El procedimiento da lugar a la formación de un polvo seco blanco, con un rendimiento del 99 % con respecto al valor teórico. El complejo híbrido cooperativo de L/H-AH en polvo, si se disuelve en agua a una concentración del 1 % en p/p, da una solución que tiene el mismo valor de viscosidad dinámica η que la solución precipitada inicialmente.

35 **Ejemplo 6** - Preparación de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH en estado sólido por liofilización de las soluciones que los contienen.

40 Se liofiliza la solución acuosa del complejo híbrido cooperativo de L/H-AH, obtenida como se describe en el Ejemplo 1 con un ciclo térmico que contempla la exposición a una $T_{\text{máx}}$ de 120 °C durante 10 min. Se obtiene una masa esponjosa, que se transforma fácilmente en un polvo blanco por tratamiento mecánico. El rendimiento del polvo liofilizado coincide con el valor teórico. El complejo híbrido cooperativo de L/H-AH liofilizado en polvo, si se disuelven en agua a una concentración del 1 % en p/p, da una solución que tiene el mismo valor de viscosidad dinámica η que la solución precipitada inicialmente.

45 **Ejemplo 7** - Preparación de complejos híbridos cooperativos de C/H-AH y CS/H-AH.

Se preparan soluciones acuosas de H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn de 1,5), condroitina (C; PM $6,6 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn de 1,4) y sulfato de condroitina (CS; PM $3,8 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,4) al 2 % en p/v en agua destilada, que se utilizan para la preparación de las diversas soluciones dadas en la Tabla 5. Las soluciones resultantes se someten al siguiente ciclo térmico en autoclave: de 25 a 120 °C en 10 min, durante 10 min a 120 °C, de 120 a 25 °C en 10 min.

La viscosidad dinámica η de las muestras, el PM y el índice de polidispersidad Mw/Mn de L-AH, de H-AH y de L/H-AH se determinaron como se describe en el Ejemplo 1.

- 5 Los datos de la Tabla 5 demuestran que: a) tanto la condroitina como el sulfato de condroitina, con un PM del orden de magnitud de 10^4 Da, por tratamiento térmico dan lugar a la formación de complejos híbridos cooperativos estables de C/H-AH y CS/H-AH, caracterizados por un bajo valor de viscosidad dinámica η ; b) la simple mezcla de soluciones de C y CS con la de H-AH no produce cambios significativos en la viscosidad dinámica η ; c) la relación η_{pre}/η_{post} del complejo de C/H-AH es aproximadamente el doble que la del complejo de CS/H-AH.

TABLA 5

Muestra	Sol. 2 % en p/v (ml)		H ₂ O (ml)	Pretratamiento térmico	Post-tratamiento térmico 120 °C; 10 minutos	η_{pre}/η_{post}
	H-AH	L-AH		η (Pa · s)		
H-AH	100	0	100	21,321	5,632	-
C	0	100	100	0,004	0,002	-----
CS	0	100	100	0,002	0,001	-----
C/H-AH	100	100	0	22,832	0,873	27,3
CS/H-AH	100	100	0	22,915	1,728	13,2
H-AH	100	0	100	21,321	5,632	-

- 10 Tabla 5 - Medición de la viscosidad dinámica η de complejos híbridos cooperativos de C/H-AH y CS/H-AH. Se preparan soluciones acuosas de H-AH (PM $1,4 \cdot 10^6$ Da; Mw/Mn 1,5), C (PM $6,6 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,4) y CS (PM $3,8 \cdot 10^4$ Da; Mw/Mn 1,4) al 2 % en p/v en agua destilada, que se utilizan para la preparación de las diferentes soluciones indicadas en la tabla. Las soluciones resultantes se someten al siguiente ciclo térmico en autoclave: de 25 a 120 °C en 10 min, durante 10 min a 120 °C, de 120 a 25 °C en 10 min.

- 15 **Ejemplo 8** - Utilización de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH en el campo de la bio-revitalización.

4 g del complejo híbrido cooperativo obtenido como se describe en el Ejemplo 1 se disuelven en 100 ml de solución salina, calentando a 120 °C durante 10 min, y a continuación secando el complejo por liofilización, como se describe en el Ejemplo 5. El ácido hialurónico utilizado es de grado farmacéutico para inyección y todas las manipulaciones se llevan a cabo en condiciones que garanticen la esterilidad y la apirogenicidad de la solución. La solución que contiene 40 mg/ml de complejos de L/H-AH se introduce en jeringuillas de 1 ml provistas de una aguja de calibre 30. Se lleva a cabo un tratamiento de bio-revitalización de la cara en 10 voluntarios informados, que tienen signos evidentes de envejecimiento cutáneo en la cara. El diseño experimental contempla que cada sujeto se someta a un tratamiento idéntico de bio-revitalización por microinyección subcutánea en el lado derecho de la cara con la formulación de la invención (1 ml) y en el lado izquierdo con un producto primario ya comercializado (1 ml). Los resultados obtenidos, objetivado instrumentalmente, demuestran la superioridad del tratamiento con el complejo cooperativo estable de L/H-AH, tanto en términos de calidad como de duración del tratamiento.

- Ejemplo 9** - Uso de complejos híbridos cooperativos de L/H-AH en el campo de la viscosuplementación.

4 g del complejo híbrido cooperativo obtenidos como se describe en el Ejemplo 1 se disuelven en 100 ml de solución salina, calentando a 120 °C durante 10 min, y a continuación secando el complejo por liofilización, como se describe en el Ejemplo 5. El ácido hialurónico utilizado es de grado farmacéutico para inyección y todas las manipulaciones se llevan a cabo en condiciones que garanticen la esterilidad y la apirogenicidad de la solución. La solución que contiene 40 mg/ml de complejos de L/H-AH se introduce en jeringuillas de 1 ml provistas de una aguja de calibre 30. Se lleva a cabo el tratamiento de viscosuplementación en 5 voluntarios informados, con un trastorno bilateral de rodilla, con la indicación terapéutica que es la infiltración de ácido hialurónico en la articulación. El diseño experimental contempla que cada sujeto reciba un tratamiento idéntico de viscosuplementación en la articulación derecha con la formulación de la invención (1 ml) y en la articulación izquierda con un producto primario ya comercializado (1 ml). Los resultados obtenidos, objetivados instrumentalmente, demuestran la superioridad del tratamiento con el complejo cooperativo estable de L/H-AH, tanto en términos de reducción rápida del dolor como de eficacia de la resolución de la condición patológica.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejos híbridos cooperativos estables de L/H-AH preparados sometiendo a tratamiento térmico, a una temperatura comprendida entre 80 °C y 160 °C, a soluciones que contienen simultáneamente ácido hialurónico L-AH o hialuronanos y ácido hialurónico H-AH o hialuronanos, en los que el peso molecular de L-AH está comprendido entre $1 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^6$ Da y el de H-AH viene dado por la fórmula $PM_{H-AH} \geq PM_{L-AH} / 0,9$ y en los que H-AH y L-AH están presentes en cantidades relativas comprendidas entre 0,5-2.
2. Complejos estables de acuerdo con la reivindicación 1 en los que dicha temperatura está comprendida entre 100° y 120 °C.
- 10 3. Complejos de L/H-AH de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 2, que tienen una viscosidad de entre 1,1 a 200 veces inferior a la de una solución que contiene ácido hialurónico H-AH solo usado para formar el complejo.
4. Complejos de L/H-AH de acuerdo con la reivindicación 3, en los que también están presentes en la solución otras especies químicas, además del disolvente y del ácido hialurónico.
5. Complejos de L/H-AH de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 3, en los que el disolvente usado es agua.
- 15 6. Complejos de L/H-AH de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el tratamiento térmico incluye mantener la muestra a la temperatura máxima durante tiempos que oscilan de 10 segundos a 2 h, preferentemente de 10 a 30 min.
7. Complejos de L/H-AH de acuerdo con las reivindicaciones 1, 6 en los que el tratamiento térmico incluye alcanzar la temperatura máxima en tiempos entre 1 min y 1 h, preferentemente entre 2 y 10 min.
- 20 8. Complejos de L/H-AH de acuerdo con las reivindicaciones 1, 6 y 7 en los que el tratamiento térmico incluye el enfriamiento de la solución, después de la exposición a la temperatura máxima, durante tiempos de 1 min a 1 h, preferentemente de 2 a 10 minutos.
9. Complejos de L/H-AH de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, preparados en estado sólido por precipitación de las soluciones que los contienen o por eliminación del disolvente por medio de evaporación al vacío, secado por pulverización o liofilización, en estado seco.
- 25 10. Complejos de L/H-AH de acuerdo con la reivindicación 9, en los que la precipitación se obtiene mediante la adición de un compuesto miscible con la solución y que actúa como un no disolvente para el complejo.
11. Complejos de L/H-AH de acuerdo con la reivindicación 10, en los que el compuesto no disolvente para el complejo es un disolvente orgánico miscible en agua.
- 30 12. Complejos de L/H-AH de acuerdo con la reivindicación 11, en los que el disolvente orgánico miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetona, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol.
13. Complejos híbridos cooperativos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, en los que el ácido hialurónico de bajo peso molecular se sustituye por otros polisacáridos de bajo peso molecular seleccionados entre condroitina y sulfato de condroitina.
- 35 14. Complejos híbridos cooperativos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13 para su uso como sustituto para el ácido hialurónico de alto peso molecular en todos los tratamientos clínicos basados en el empleo de este polisacárido.
- 40 15. Complejos híbridos cooperativos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en tratamientos de bio-revitalización intradérmicos, en tratamientos de la viscosuplementación intra-articular, en tratamientos de cistitis dentro de la vejiga, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias vaginales, enfermedades alveolares y enfermedades orales.