

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 868**

51 Int. Cl.:

A61L 26/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2012 PCT/EP2012/071138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14063735**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2012 E 12791441 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2922581**

54 Título: **Composiciones mucoadhesivas que comprenden ácido hialurónico y quitosano para aplicación tópica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2017

73 Titular/es:
**MDT INT'L S.A. (100.0%)
Rue du 31 Décembre 36
1207 Geneva, CH**

72 Inventor/es:
**BETTINI, RUGGERO;
BIANCHERA, ANNALISA;
CORUZZI, MASSIMO y
ELVIRI, LISA**

74 Agente/Representante:
RUO, Alessandro

ES 2 627 868 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones mucoadhesivas que comprenden ácido hialurónico y quitosano para aplicación tópica

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a composiciones acuosas de ácido hialurónico combinadas con quitosano y glicerofosfato que tienen propiedades termogelificantes y mucoadhesivas y uso de las mismas para la reepitelización y reparación de heridas mucosas por administración tópica.

10

Antecedentes de la invención

[0002] El ácido hialurónico (en lo sucesivo en el presentes documento denominado como HA) es un polisacárido biológico de alto peso molecular ya conocido que tiene un carácter polianiónico y que pertenece a la clase de glicosaminoglicanos no sulfatados. Está presente en gran medida en todos los tejidos conectivos de los vertebrados, en el líquido sinovial articular y en el cartílago, donde es un componente principal, y los fluidos endobulbares del ojo.

15

[0003] En la naturaleza puede alcanzar un peso molecular superior a 10.000 kDa, pero, como se sabe, cuando se extrae y se manipula el ácido hialurónico siempre es una fracción comúnmente identificada por un peso molecular medio, que se forma por diferentes polímeros que tienen un peso molecular comprendido en un intervalo de pesos moleculares, concretamente, se caracteriza por un índice de polidispersidad.

20

[0004] Se emplea ampliamente para muchas aplicaciones médicas, incluyendo la administración a los ojos, articulaciones, mucosas y piel para tratar una diversidad de estados patológicos.

25

[0005] En la actualidad, muchas fracciones de este biopolímero extraído de fuentes animales o caldo bacteriano se han usado durante mucho tiempo en condiciones patológicas tales como cicatrización de heridas, enfermedades artrósicas/artríticas y cirugía ocular, basándose estos usos esencialmente en su función biológica y en las propiedades físicas no newtonianas (por ejemplo, viscosidad y/o su viscoelasticidad estructural) de sus soluciones acuosas. Tanto la viscosidad como las propiedades viscoelásticas dependen principalmente del intervalo de pesos moleculares de las fracciones de HA, la concentración polimérica, pero otras características técnicas, tales como el grado de reticulación de cadena con agentes químicos, pueden contribuir a aumentar el rendimiento reológico, así como al peso molecular reivindicado.

30

[0006] De hecho, las propiedades reológicas de HA son influenciadas o resultantes de la combinación de las diferentes características técnicas de la muestra considerada.

35

[0007] No obstante, es conocimiento y práctica común hacer referencia a fracciones de HA de alto peso molecular cuando se solicita una alta viscosidad y/o propiedades viscoelásticas, en particular, por ejemplo, en condiciones inflamatorias de la articulación de la rodilla o cirugía ocular, donde se emplea ácido hialurónico para fines de suplementación de los fluidos sinoviales o endobulbares por sus propiedades de viscosidad/viscoelásticas.

40

[0008] En lo que se refiere a la propiedad de cicatrización de heridas, esto se atribuye principalmente a fracciones de ácido hialurónico que tienen pesos moleculares esencialmente bajos y se ha reivindicado que una fracción de este polisacárido que tiene un peso molecular de 50 a 100 kDa exhibe una baja viscosidad en soluciones acuosas pero tiene la capacidad para promover la reparación del tejido de la herida (Documento US 5.925.626).

45

[0009] La fracción HA reivindicada, como otras fracciones de HA de bajo peso molecular, no muestra ninguna propiedad mucoadhesiva, pero esta propiedad puede ser particularmente útil para la aplicación tópica de la misma.

50

[0010] De hecho, la principal necesidad de cicatrización de heridas y, en particular, para el tratamiento de los tejidos mucosos internos de las cavidades internas del cuerpo, donde no es aplicable un apósito para heridas, consiste en poner a disposición en el sitio a tratar una cantidad apropiada de ácido hialurónico y durante un tiempo suficiente para explotar su actividad biológica.

55

[0011] El documento WO2009/024677 desvela el uso de ácido hialurónico, preferiblemente asociado a vitaminas, para la preparación de composiciones destinadas a mejorar mediante administración tópica la protección del tejido mucoso de las vías respiratorias superiores e inferiores, del tracto intestinal y del ojo. Las composiciones útiles para el tratamiento de la mucosa del tracto intestinal se administran por vía oral en formas farmacéuticas gastro-resistentes.

60

[0012] Sin embargo, para mejorar el tiempo de retención en el sitio de aplicación, una característica particularmente significativa es la propiedad bioadhesiva y mucoadhesiva de las composiciones utilizadas.

5 [0013] Por ejemplo, para el tratamiento de la piel y el epitelio de la mucosa se desvelan composiciones altamente bioadhesivas y mucoadhesivas de biopolímeros, tales como ácido algínico, ácido hialurónico y sulfato de dermatán, asociados a polímeros sintéticos, tales como alcohol polivinílico y policarbófilo (Documento WO96/03973). Estas composiciones se reivindican como útiles para el tratamiento de la sequedad y deshidratación de la piel y los tejidos mucosos, así como vehículos para la absorción percutánea de sustancias activas.

10 [0014] Un biopolímero, que actualmente está recibiendo mucha atención para aplicaciones tópicas cutáneas y mucosas por su capacidad para unirse a alta cantidad de agua y formar hidrogeles, es el quitosano. El quitosano es un derivado desacetilado de quitina que consiste en unidades de glucosamina y N-acetil-glucosamina; es un polímero catiónico biocompatible, biodegradable, no tóxico, insoluble en agua, pero soluble en ácidos acuosos diluidos hasta pH 6,2. Se utiliza ampliamente en muchas aplicaciones, pero su mala solubilidad en soluciones neutras constituye un obstáculo importante para su uso en contextos fisiológicos. Con el fin de superar este inconveniente, la estructura del quitosano se modificó químicamente de diversas maneras al final para obtener un quitosano injertado covalentemente o reticulado y para mejorar de esta manera su solubilidad en agua y sus propiedades gelificantes. Sin embargo, tales modificaciones químicas requieren a menudo el uso de reactivos tóxicos que dificultan parcialmente el traslado de dichos productos a aplicaciones biomédicas.

20 [0015] Un posible medio para evitar el uso de agentes químicos es preparar hidrogeles físicos de quitosano que exploten su naturaleza catiónica en la formación de complejos polielectrolíticos (PEC) mediante interacciones iónicas con polianiones que consisten tanto en polímeros sintéticos como biopolímeros, tales como, por ejemplo, alcohol polivinílico y polisacáridos aniónicos, incluyendo ácido hialurónico, respectivamente (Berger J. et al., Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004, 57, 35-52).

25 [0016] Sin embargo, la formación de hidrogeles estables, homogéneamente dispersados, que contienen quitosano y HA en solución es desafiante debido al hecho de que la adición de HA a la solución de quitosano constituye un elemento perturbador, potencialmente conflictivo. De hecho, las cargas básicas del quitosano conducen a interacciones aniónicas con las cargas aniónicas de HA y, en consecuencia, proporcionan la precipitación de un complejo de polielectrolito de HA-quitosano con separación de fases. Esta ocurrencia es tan común que es ampliamente explotada y reportada como una estrategia para la producción de micro o nanopartículas (se enumeran algunos ejemplos en Berger J. et al., citados previamente). Otra característica peculiar del quitosano es su capacidad para formar geles termosensibles con polioles que llevan una única cabeza aniónica de fosfato, y en particular con glicerofosfato.

35 [0017] El documento US 6.344.488 desvela una formación de temperatura controlada y dependiente del pH de geles de polisacáridos iónicos que consisten en un sistema de soluciones acuosas de quitosano/organofosfato que muestran una transición sol/gel dentro de temperaturas comprendidas entre 30 y 60 °C y un pH comprendido entre 6,5 a 7,4. Los geles obtenidos a pH superior a 6,9 son termorreversibles, mientras que los geles obtenidos a pH inferior a 6,9 son termorreversibles. Además, en la patente se indica claramente que el quitosano tiene un peso molecular comprendido entre 10 y 2.000 kDa, pero la patente no especifica nada sobre la otra característica del quitosano, concretamente, el grado de desacetilación. El organofosfato preferido es glicerofosfato. El documento US 6.344.488 desvela también el método de preparación de hidrogeles y describe en detalle su comportamiento después del calentamiento, pero no incluye el caso de la adición de otras sustancias activas u otros polisacáridos tales como ácido hialurónico.

45 [0018] Después, el mecanismo de formación de geles termosensibles mediante la asociación de sales de quitosano y glicerofosfato se informa por los mismos autores (Chenite A. et al., Biomaterials, 2000, 21, 2155 - 2161; Chenite A. et al., Carbohydr. Polym., 2001, 46, 39 - 47). De acuerdo con los datos mostrados, la presencia de glicerofosfato permite una mayor hidratación de quitosano a bajas temperaturas, promoviendo de este modo la estabilidad de la solución a pH cercano a la neutralidad. Vale la pena señalar que en los artículos en referencia se consideran las características químicas del quitosano (concretamente el grado de desacetilación y el peso molecular). Los resultados mostrados indican que el peso molecular no tiene un efecto significativo sobre la temperatura de gelificación, mientras que el grado de desacetilación parece ser crítico para las temperaturas a las que tiene lugar la transición sol/gel. En particular, la temperatura de gelificación incipiente aumenta a medida que disminuye el grado de desacetilación. Para el quitosano que tiene un grado de desacetilación del 70, 81 y 91 %, las temperaturas de gelificación indicadas son de 66 °C, 57 °C y 37 °C, respectivamente. El grado de desacetilación es también crítico para la estabilidad de los hidrogeles (Ruel-Gariépy E. et al., Int. J. Pharmaceutics, 2000, 203, 89-98).

60 [0019] El documento US2006/0280797 describe una matriz polimérica que comprende una solución de al menos un polímero térmico de gelificación inversa, por ejemplo, una solución de quitosano y β -glicerofosfato, y al menos un polímero gelificante aniónico en forma de polvo, por ejemplo, ácido hialurónico, en el que la matriz polimérica es un gel sólido que es inyectable debido a las propiedades de adelgazamiento por cizalladura del polímero gelificante aniónico y vuelve a su viscosidad original después de la cizalladura. Son raros los datos referentes a la producción

de hidrogel termosensible que contiene quitosano y ácido hialurónico.

[0020] Fang et al. (Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, 68, 626-636) y Chen et al. (Polymer, 2009, 50, 107-116) informan sobre hidrogeles termosensibles compuestos por quitosano y ácido hialurónico pero en ambos casos se requiere una modificación química de quitosano, HA o ambos para superar las incompatibilidades entre estas moléculas.

[0021] Como se ha mencionado previamente, de hecho, la preparación de hidrogeles dispersados homogéneamente que combinan quitosano y un polisacárido polianiónico, tal como ácido hialurónico, no es un problema trivial.

Resumen de la invención

[0022] El propósito de la presente invención es proporcionar composiciones que comprenden ácido hialurónico en una solución acuosa para tratar lesiones mucosas por administración tópica y particularmente para tratar mucosas de cavidades corporales, tales como cavidades orales, nasales, gastrointestinales, colorrectales y vaginales, bien de origen traumático, origen iatrogénico u origen relacionado con un trastorno. La administración de HA se dirige al alivio de las lesiones de las mucosas, con un interés particular en las lesiones derivadas de la quimioterapia y/o radioterapia utilizadas para tratar el cáncer.

[0023] La principal necesidad de la cicatrización de heridas de tejidos, tales como los tejidos mucosos, es poner a disposición en el sitio una cantidad apropiada de ácido hialurónico con un tiempo de contacto con la lesión suficiente para proporcionar alivio del tejido y luego desencadenar los procesos de curación.

[0024] Es un propósito adicional de la presente invención proporcionar composiciones que comprenden ácido hialurónico en una solución acuosa capaz de formar hidrogel, preferiblemente *in situ* después de la aplicación tópica.

[0025] Para los fines anteriormente mencionados, una composición ideal debe poseer las características de biocompatibilidad, seguridad y mucoadhesividad, para garantizar una buena persistencia en el sitio de administración. La capacidad de ser termosensible en la formación de hidrogeles es también una característica relevante en vista de la aplicación perseguida.

[0026] Las composiciones donde el ácido hialurónico se combina con quitosano y glicerofosfato sódico se consideran potencialmente útiles para el suministro de ácido hialurónico en el sitio a tratar.

[0027] Por lo tanto, en un primer aspecto, el objeto de la invención son composiciones que comprenden ácido hialurónico y sales del mismo en mezcla con quitosano y sales del mismo y una sal de glicerofosfato en una solución acuosa, en la que el quitosano tiene un grado de desacetilación en el intervalo del 60 al 80 %, y en la que dichas composiciones tienen una propiedad de transición sol-gel a 35-38 °C, formando así un hidrogel a dichas temperaturas. Además, estas composiciones están dotadas adicionalmente de propiedades mucoadhesivas. Las composiciones que comprenden ácido hialurónico y sales del mismo en mezcla con quitosano y una sal de glicerofosfato opcionalmente comprenden adicionalmente una sal de ácido inorgánico u orgánico.

[0028] Las composiciones de la invención están destinadas a ser utilizadas en el tratamiento de heridas mucosas, ya sea de origen traumático, iatrogénico o relacionado con un trastorno, de las cavidades orales, nasales, gastrointestinales, vaginales y colorrectales corporales por administración tópica. El uso preferido es para el alivio (reepitelización y reparación) de lesiones mucosas derivadas de quimioterapia y/o radioterapia y en particular para lesiones de la mucosa colorrectal derivadas de la radioterapia usada para tratar el cáncer colorrectal.

[0029] Estos y otros propósitos, que se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, se consiguen por las composiciones que comprenden ácido hialurónico combinado con quitosano y glicerofosfato en la solución acuosa objeto de la invención.

[0030] Otras características y ventajas de la presente invención se describirán en la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas, pero no exclusivas, de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

[0031] La descripción se da con referencia a las figuras adjuntas, que se proporcionan puramente con fines indicativos y por tanto no son limitantes.

La figura 1 muestra el porcentaje de agua unida en las composiciones preparadas de acuerdo con los ejemplos 1-3 y 7 frente a la relación entre las concentraciones de quitosano y de HA.

La figura 2 muestra el porcentaje de HA liberado en función del tiempo de la composición del ejemplo 1; las barras representan la desviación estándar (n = 3).

La figura 3 muestra el porcentaje de HA liberado en función del tiempo de la composición a base de Carbopol correspondiente a la composición 1; las barras representan la desviación estándar (n = 3).

La figura 4 muestra el porcentaje de HA liberado en función del tiempo de la composición a base de quitosano del ejemplo 2; las barras representan la desviación estándar (n = 3).

La figura 5 muestra el porcentaje de HA liberado en función del tiempo de la composición a base de Carbopol correspondiente a la composición del ejemplo 2; las barras representan la desviación estándar (n = 3).

Descripción detallada de la invención

[0032] Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos y expresiones usados en la descripción general.

[0033] La expresión "ácido hialurónico" pretende hacer referencia a una fracción de ácido hialurónico extraída de fuentes animales u obtenida por fermentación microbiana que tiene un peso molecular de 7-250 kDa (7.000-250.000). La viscosidad intrínseca de esta fracción determinada según Ph. Eur. 7.0, 2011 pagina 2928, es inferior a 0,65 m³/kg.

[0034] Para el propósito de la invención, el ácido hialurónico preferido es una fracción que tiene un peso molecular que varía de 30 a 250 kDa y más preferiblemente de 30 y 100 kDa. El ácido hialurónico está preferiblemente en forma de sal con un metal alcalino y más preferiblemente está en forma de sal sódica, a saber hialuronato sódico.

[0035] El término "quitosano" pretende definir en el presente documento un polisacárido derivado de la desacetilación de quitina, que tiene un grado de desacetilación (denominado en el presente documento DD) que varía del 60 al 80 % obtenido a partir de fuentes naturales, tales como cáscara de crustáceos o de la pared celular de los hongos. El peso molecular de dicho quitosano está comprendido en el intervalo de 50 a 300 kDa y preferiblemente de 80 y 200 kDa.

[0036] Para el propósito de la invención, el quitosano preferido tiene un grado de desacetilación de aproximadamente el 70-80 %. El quitosano desacetilado al 75 % es el más preferido y es un quitosano con una viscosidad entre 30 y 70 mPas a una concentración del 1 % (p/v) en ácido acético al 1 % a 20 °C.

[0037] Además, un quitosano que tiene el grado de desacetilación mencionado puede estar en forma de sal y puede seleccionarse de entre sulfato de clorhidrato, acetato, lactato, malato, succinato, ascorbato, fumarato, adipato y quitosano.

[0038] El término "glicerofosfato" se refiere en el presente documento a una sal alcalina o alcalinotérrica, preferiblemente de sodio, de ácido D o L α -glicerofosfórico, ácido β -glicerofosfórico y mezcla de los mismos. Puede prepararse a partir de fuentes naturales, tal como, por ejemplo, por hidrólisis de lecitina o por fosforilación de glicerol. Para el propósito de la invención, el glicerofosfato preferido es una sal sódica de ácido β -glicerofosfórico y está según Ph. Eur. 7.0, concretamente como material cristalino hidratado con 4 a 6 moléculas de agua de cristalización. El pentahidrato sódico glicerofosfato es el más preferido.

[0039] La expresión "solución(es) de polisacárido(s)" se refiere en el presente documento a soluciones acuosas transparentes del polisacárido relacionado no gelificado y estable a temperaturas que varían de 0 °C a temperatura ambiente (por ejemplo, 15-25 °C).

[0040] Las expresiones "temperatura de transición sol/gel" y "temperatura de gelificación" son equivalentes y se entiende en el presente documento que se refieren a cualquier temperatura que varía de 34 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a 35-38 °C, a la que una solución acuosa transparente que comprende ácido hialurónico, quitosano y glicerofosfato se convierte en un hidrogel dispersado homogéneamente sin ninguna formación de precipitados y separación de fases.

[0041] Con el fin de cumplir el propósito de la invención, es decir, proporcionar composiciones de hidrogel mucoadhesivas que comprenden ácido hialurónico para su aplicación tópica en los tejidos mucosales interiores de una cavidad corporal, se previó una composición acuosa a base de soluciones de quitosano y glicerofosfato sódico como un sistema potencial útil para ser explotado para el desarrollo de un dispositivo médico adecuado. Como se menciona en el estado de la técnica, se sabe que dicho sistema posee la característica distintiva de ser capaz de formar hidrogeles termosensibles, aumentando consistentemente su viscosidad por calentamiento, mientras que las propiedades mucoadhesivas o la adición de otros componentes no se investigan.

[0042] Sin embargo, se espera que la adición a este sistema de un polianión, tal como ácido hialurónico, dé lugar a los problemas técnicos anteriormente mencionados debido a la incompatibilidad mutua en solución acuosa entre los dos polisacáridos tomados como tal.

5 **[0043]** Por lo tanto, para composiciones que comprenden ácido hialurónico y sales del mismo combinadas con quitosano y sales del mismo y una sal de glicerofosfato en una solución acuosa dotada de una transición sol-gel a 35-38 °C y propiedades mucoadhesivas, esta incompatibilidad tiene que resolverse para obtener hidrogeles estables y evitar la formación de complejos polielectrolíticos por interacciones iónicas entre quitosano y ácido hialurónico con separación de fases.

10 **[0044]** El logro de este propósito se basa en una serie de características técnicas: las características de los polisacáridos utilizados, la relación entre ellos y el pH.

15 **[0045]** El HA se ha seleccionado a partir de las fracciones que presentan un bajo peso molecular por sus propiedades conocidas en la cicatrización de heridas y aunque también por razones tecnológicas. De hecho, se ha informado ampliamente en la bibliografía que los fragmentos de origen natural derivados de la degradación de HA participan activamente en la remodelación y regeneración de tejidos, desempeñando así un papel crucial en la cicatrización de heridas, y al mismo tiempo, se sabe que el tamaño del polímero puede afectar profundamente a su comportamiento en la composición, ya que el número de interacciones entre las dos cadenas poliméricas es estrictamente dependiente de su tamaño molecular. A continuación, el HA para las composiciones de acuerdo con la invención tiene un peso molecular de 7 a 250 kDa y preferiblemente de 30 a 250 kDa, y más preferiblemente de 30 a 100 kDa.

25 **[0046]** En cuanto al quitosano, contrariamente a lo que se desvela en el estado de la técnica para las composiciones de la presente invención, la mejor realización de quitosano con referencia a la temperatura de gelificación en el intervalo fisiológico en torno a 35-38 °C es el quitosano que tiene un grado de desacetilación del 75 %, mientras que con un quitosano con un DD del 95 %, los hidrogeles obtenidos muestran a una temperatura entre 0 y 40 °C la formación de coacervados con separación de fases brusca. Por lo tanto, el quitosano o sales del mismo para las composiciones de acuerdo con la invención tiene un grado de DD del 60-80 % y preferiblemente del 70-80 %, y más preferiblemente tiene un grado de DD del 75 %. La característica más crítica para las composiciones que comprenden ácido hialurónico y sales del mismo combinadas con quitosano y sales del mismo y glicerofosfato sódico en una solución acuosa son las relaciones entre quitosano y HA. Teniendo en cuenta el quitosano, estas relaciones pueden estar comprendidas entre 1:0,6 (HA:quitosano) y 1:45 (HA:quitosano). Preferiblemente, las relaciones entre HA y quitosano son: 1:10 (HA:quitosano); 1:6 (HA:quitosano); 1:3 (HA:quitosano) y 1:1,8 (HA:quitosano).

35 **[0047]** Para la capacidad termogelificante, las relaciones entre quitosano y glicerofosfato pueden estar comprendidas entre 1:0,8 y 1:15 (quitosano:glicerofosfato). Las relaciones preferidas son de 1:1,8 a 1:7,0 (quitosano:glicerofosfato).

40 **[0048]** Por lo tanto, en una realización para las composiciones de la invención que comprenden ácido hialurónico y sales del mismo combinadas con quitosano y sales del mismo, y una sal de glicerofosfato en una solución acuosa de la presente invención, el contenido de los componentes está en los siguientes intervalos en % p/v:

- 45
- ácido hialurónico de 0,1 a 1,5;
 - quitosano de 1,0 a 4,5; y
 - glicerofosfato de 4,0 a 15 como sustancia anhidra

y el pH está comprendido de 6,9 a 7,1.

50 **[0049]** En una realización preferida, las composiciones de la invención comprenden:

- 55
- ácido hialurónico de 0,3 a 1,0;
 - quitosano de 1,8 a 3,0; y
 - glicerofosfato de 5,6 a 12,7 como sustancia anhidra

y el pH está comprendido de 6,9 a 7,1.

60 **[0050]** En este caso, cuando el glicerofosfato es según Ph. Eur. 7,0, y es como una sustancia pentahidrato, los intervalos indicados anteriormente se encuentran en % p/v del 8 al 18 %. Además, para los propósitos de la invención, el glicerofosfato pentahidrato es preferiblemente el 8 % en peso/volumen.

[0051] Por lo tanto, las composiciones preferidas de la invención son: ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 3,0

% y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v; ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 1,8 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v; ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v, y ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 1,8 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v. La última composición es la más preferida.

5 **[0052]** Cuando el quitosano utilizado no está en forma de sales, las composiciones pueden comprender además un ácido inorgánico u orgánico en un intervalo del 0,6 al 0,9 % p/v con el fin de solubilizar el quitosano en agua y proporcionar un pH casi en el intervalo fisiológico, concretamente, 6,9 y 7,1. Dichos ácidos inorgánicos u orgánicos se seleccionan del grupo que consiste en clorhidrato, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido láctico, ascórbico, málico, succínico, adípico o fumárico, preferiblemente el ácido es ácido láctico.

10 **[0053]** Entre las composiciones capaces de proporcionar geles espesos tras el calentamiento a 37°C, dos son los más preferidos: composición que comprende el 0,3 % de HA, 3 % de quitosano, 8 % de glicerofosfato sódico pentahidrato y el 0,9 % de ácido láctico, y composición que comprende el 1,0 % de HA, 1,8 % de quitosano, 8,0 % de glicerofosfato sódico pentahidrato y el 0,6 % de ácido láctico.

15 **[0054]** En una realización, las composiciones se pueden preparar mezclando soluciones acuosas de los componentes individuales en las proporciones adecuadas para obtener la concentración perseguida a temperaturas que varían de 0 a 25 °C. La solución acuosa de quitosano se añade con un ácido inorgánico u orgánico seleccionado de ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, ascórbico, málico, succínico, adípico o fumárico, y se añade preferiblemente con ácido láctico, cuando el quitosano no está en forma de sal. Las temperaturas de preparación no afectan a la gelificación tras el calentamiento a 37 °C, pero influyen fuertemente en el aspecto de las composiciones en cuanto a claridad y homogeneidad. En realidad, las composiciones preparadas a temperaturas superiores a 10 °C pueden presentar una opalescencia/turbidez con signos de separación de fase. Por esta razón, las temperaturas de 0 a 4 °C son las temperaturas de partida para la preparación de las composiciones que se prefieren.

20 **[0055]** El agua desempeña un papel muy crítico en el comportamiento de estas composiciones, en particular, cuanto mayor es la cantidad de agua unida, mejores son las características del gel: la cuantificación del agua libre en la formulación representó aproximadamente el 90 % del agua total, afectando significativamente a la estabilidad de las composiciones. Ninguna de las composiciones, en cualquiera de las condiciones de almacenamiento ensayadas, concretamente, a 4 °C o a 25 °C o a 40 °C, mostró signos significativos de termorreversibilidad, excepto por una ligera disminución de la viscosidad para composiciones con un contenido más alto de HA recién preparado o después de 4 °C de almacenamiento.

25 **[0056]** En una realización adicional, las composiciones de la invención pueden obtenerse preparando dos soluciones acuosas de partida separadas, una que contiene una solución acuosa ácida de quitosano o una solución acuosa de una sal de quitosano, y la otra una solución acuosa de glicerofosfato sódico y HA, a mezclar en el momento de la administración. Las soluciones de partida se pueden concentrar dos veces con respecto a la concentración final en la composición deseada y pueden mezclarse a temperatura ambiente a través de un dispositivo adecuado, por ejemplo un inyector automático uniendo las dos jeringas a una conexión en Y. En estas condiciones, la solución resultante conserva todavía la capacidad de convertirse en un gel espeso en menos de 15 minutos cuando se calienta a 37 °C. Esto es bastante interesante especialmente teniendo en cuenta que todas las etapas pueden realizarse a temperatura ambiente, eliminando así la necesidad de enfriar soluciones antes de mezclar, y los hidrogeles pueden formarse *in situ* en el momento de la administración al sujeto en necesidad del tratamiento.

30 **[0057]** A continuación, se describen brevemente los resultados obtenidos con algunas realizaciones de las composiciones de la invención y se desvelan en detalle en los ejemplos.

35 **[0058]** Como primera etapa, el contenido de agua en las composiciones preparadas como ejemplos se cuantificó mediante análisis termogravimétrico (TGA) dando como resultado una buena concordancia con la cantidad nominal (datos no mostrados). El agua desempeña un papel muy importante en el comportamiento de las composiciones, en particular, cuanto mayor es la cantidad de agua unida, mejores son las características del gel, ya que sus interacciones con las cadenas poliméricas de quitosano determinan la capacidad de la composición para convertirse en un gel, así como su estabilidad. Con el fin de cuantificar la cantidad de agua libre, que es congelable, se realizaron experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) sobre composiciones que tenían diferentes contenidos de quitosano y ácido hialurónico: la cantidad de agua libre dio lugar respectivamente al 87,2 % (relación de la composición quitosano:HA igual a 10:1) y 91,9 % (relación de composición quitosano:HA igual a 1,8:1). En otras palabras, la cantidad de agua unida era de 12,8 para la composición de quitosano:HA igual a 10:1 y 8,1 para la composición de quitosano:HA igual a 1,8:1. Esto significa que la cantidad de agua unida aumentó concomitantemente con la relación relativa entre el quitosano y el ácido hialurónico, lo que sugiere que la unión del agua se debe principalmente al quitosano.

[0059] Las composiciones de acuerdo con la presente invención se han ensayado en un experimento *ex vivo* para determinar la mucoadhesividad. Se seleccionó la mucosa de cerdo como modelo y se realizó una prueba de lavado frente a una formulación basada en Carbopol® tomada como norma de oro. Los resultados del ensayo revelaron que las composiciones ensayadas tenían una mucoadhesividad más alta con respecto a la composición basada en Carbopol® correspondiente.

[0060] Por lo tanto, las características distintivas de las composiciones de la invención son:

- la presencia de componentes biológicamente seguros y biocompatibles;
- la coexistencia en una solución acuosa de un compuesto básico, tal como quitosano, y un ácido, tal como ácido hialurónico, sin modificaciones químicas tanto del quitosano como del ácido hialurónico, evitando de este modo totalmente cualquier riesgo de toxicidad derivado de la reticulación química o fotoinducida;
- la capacidad para formar hidrogeles a 37 °C;
- alta mucoadhesividad, significativamente más alta que el norma de oro.

[0061] En conclusión, las composiciones de acuerdo con la presente invención constituyen un sistema de suministro médico innovador para la administración en mucosas de ácido hialurónico. Poseen las características distintivas de permitir la coexistencia en solución de un compuesto básico tal como quitosano, y un ácido tal como ácido hialurónico. Además, su capacidad para gelificar a 37 °C acompañada de alta mucoadhesividad constituye una buena solución para la administración de hidrogeles formados *in situ* y para una localización eficaz y persistente de HA en el sitio del daño.

Ejemplos

[0062] En los siguientes ejemplos se describen la preparación de la composición en la que el ácido hialurónico, el quitosano y el glicerofosfato se combinan en diferentes cantidades y el quitosano tiene un grado de desacetilación del 75 % (ejemplos 1-8) o, como comparación, un grado de desacetilación del 95 % (ejemplos AF). En lo sucesivo en el presente documento se describe también la prueba de caracterización realizada sobre las composiciones de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1 *Preparación de una composición de ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v.*

[0063] Se preparó una primera solución acuosa de quitosano (4 % p/v) añadiendo a una dispersión acuosa de quitosano, con un grado de desacetilación del 75 %, ácido láctico hasta una concentración del 1 % p/v. Se prepararon por separado una solución acuosa al 50 % p/v de glicerofosfato sódico pentahidrato (NaGP) y una solución acuosa al 10 % p/v de hialuronato sódico (HA). Todas las soluciones acuosas se prepararon a 0 °C. A continuación, las soluciones acuosas obtenidas se estabilizaron en un criostato a temperaturas entre 0 y 25 °C.

[0064] Para obtener las concentraciones finales de ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 3,0 % y NaGP al 8,0 % p/v, se añadieron muestras de volúmenes conocidos de la solución acuosa al 50 % p/v de NaGP y la solución acuosa al 10 % p/v de HA sódico a una muestra de volumen conocido de la primera solución acuosa de quitosano al 4 % (concentración de ácido láctico = 0,9 % p/v). Las tres soluciones acuosas se mezclaron con agitación vorticial o magnética a temperatura ambiente, obteniéndose una solución homogénea y transparente con un pH final de 6,9.

Ejemplo 2 *Preparación de composiciones de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 1,8 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v.*

[0065] Se preparó una primera solución acuosa de quitosano (4 % p/v) añadiendo a una dispersión acuosa de quitosano, con un grado de desacetilación del 75 %, ácido láctico hasta una concentración del 1 % p/v. Se prepararon por separado una solución acuosa al 50 % p/v de glicerofosfato sódico pentahidrato (NaGP) y una solución acuosa al 10 % p/v de hialuronato sódico (HA). Todas las soluciones acuosas se prepararon a 0 °C. A continuación, las soluciones acuosas obtenidas se estabilizaron en un criostato a temperaturas entre 0 y 25 °C.

[0066] Para obtener las concentraciones finales de tres componentes (ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 1,8 % y NaGP al 8,0 % p/v), se añadieron muestras de volúmenes conocidos de la solución acuosa al 50 % p/v de NaGP y la solución acuosa al 10 % p/v de HA a una muestra de volumen conocido de la primera solución acuosa de quitosano al 4 % (concentración de ácido láctico = 0,6 % p/v). La mezcla de las tres soluciones acuosas se mezclaron con agitación vorticial o magnética a temperatura ambiente, obteniéndose una solución homogénea y transparente con un pH final de 6,9.

Ejemplo 3 *Preparación de una composición de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico*

pentahidrato al 8,0 % p/v.

[0067] Se preparó una primera solución acuosa de quitosano (4 % p/v) añadiendo a una dispersión acuosa de quitosano, con un grado de desacetilación del 75 %, ácido láctico hasta una concentración del 1 % p/v. Se prepararon por separado una solución acuosa al 50 % p/v de glicerofosfato sódico pentahidrato (NaGP) y una solución acuosa al 10 % p/v de hialuronato sódico (HA). Todas las soluciones acuosas se prepararon a 0 °C. A continuación, las soluciones acuosas obtenidas se estabilizaron en un criostato a temperaturas entre 0 y 25 °C.

[0068] Para obtener las concentraciones finales de tres componentes (ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 3,0 % y NaGP al 8,0 % p/v), se añadieron muestras de volúmenes conocidos de la solución acuosa al 50 % p/v de NaGP sódico y la solución acuosa al 10 % p/v de HA sódico a una muestra de volumen conocido de la primera solución acuosa de quitosano al 4 % (concentración de ácido láctico = 0,9 % p/v). La mezcla de las tres soluciones acuosas se mezclaron con agitación vorticial o magnética a temperatura ambiente, obteniéndose una solución homogénea y transparente con un pH final de 6,9.

Ejemplo 4 Preparación de una composición de ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 18 % p/v.

[0069] Se preparó una primera solución acuosa de quitosano (4 % p/v) añadiendo a una dispersión acuosa de quitosano, con un grado de desacetilación del 75 %, ácido láctico hasta una concentración del 1 % p/v. Se prepararon por separado una solución acuosa al 50 % p/v de glicerofosfato sódico (NaGP) y una solución acuosa al 10 % p/v de hialuronato sódico (HA). Todas las soluciones acuosas se prepararon a 0 °C. A continuación, las soluciones acuosas obtenidas se estabilizaron en un criostato a temperaturas entre 0 y 25 °C.

[0070] Para obtener las concentraciones finales de tres componentes (ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 3,0 % y NaGP sódico al 18 % p/v), se añadieron muestras de volúmenes conocidos de la solución acuosa al 50 % p/v de NaGP y la solución acuosa al 10 % p/v de HA sódico a una muestra de volumen conocido de la primera solución acuosa de quitosano al 4 % (concentración de ácido láctico = 0,9 % p/v). La mezcla de las tres soluciones acuosas se mezclaron con agitación vorticial o magnética a temperatura ambiente, obteniéndose una solución homogénea y transparente con un pH final de 7,0.

Ejemplo 5 Preparación de una composición de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 1,8 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 18 % p/v.

[0071] Se preparó una primera solución acuosa de quitosano (4 % p/v) añadiendo a una dispersión acuosa de quitosano, con un grado de desacetilación del 75 %, ácido láctico hasta una concentración del 1 % p/v. Se prepararon por separado una solución acuosa al 50 % p/v de glicerofosfato sódico pentahidrato (NaGP) y una solución acuosa al 10 % p/v de hialuronato sódico (HA). Todas las soluciones acuosas se prepararon a 0 °C. A continuación, las soluciones acuosas obtenidas se estabilizaron en un criostato a temperaturas entre 0 y 25 °C.

[0072] Para obtener las concentraciones finales de tres componentes (ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 1,8 % y NaGP al 18 % p/v), se añadieron muestras de volúmenes conocidos de la solución acuosa al 50 % p/v de NaGP sódico y la solución acuosa al 10 % p/v de HA a una muestra de volumen conocido de la primera solución acuosa de quitosano al 4 % (concentración de ácido láctico = 0,6 % p/v). La mezcla de las tres soluciones acuosas se mezclaron con agitación vorticial o magnética a temperatura ambiente, obteniéndose una solución homogénea y transparente con un pH final de 7,1.

Ejemplo 6 Preparación de una composición de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 18 % p/v.

[0073] Se preparó una primera solución acuosa de quitosano (4 % p/v) añadiendo a una dispersión acuosa de quitosano, con un grado de desacetilación del 75 %, ácido láctico hasta una concentración del 1 % p/v. Se prepararon por separado una solución acuosa al 50 % p/v de glicerofosfato sódico pentahidrato (NaGP) y una solución acuosa al 10 % p/v de hialuronato sódico (HA). Todas las soluciones acuosas se prepararon a 0 °C. A continuación, las soluciones acuosas obtenidas se estabilizaron en un criostato a temperaturas entre 0 y 25 °C.

[0074] Para obtener las concentraciones finales de tres componentes (ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 3,0 % y NaGP al 18 % p/v), se añadieron muestras de volúmenes conocidos de la solución acuosa al 50 % p/v de NaGP y la solución acuosa al 10 % p/v de HA a una muestra de volumen conocido de la primera solución acuosa de quitosano al 4 % (concentración de ácido láctico = 0,9 % p/v). La mezcla de las tres soluciones acuosas se mezclaron con agitación vorticial o magnética a temperatura ambiente, obteniéndose una solución homogénea y transparente con un pH final de 7,0.

Ejemplo 7 Preparación de una composición de ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 1,8 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v.

5 [0075] Se preparó una primera solución acuosa de quitosano (4 % p/v) añadiendo a una dispersión acuosa de quitosano, con un grado de desacetilación del 75 %, ácido láctico hasta una concentración del 1 % p/v. Se prepararon por separado una solución acuosa al 50 % p/v de glicerofosfato sódico pentahidrato (NaGP) y una solución acuosa al 10 % p/v de hialuronato sódico (HA). Todas las soluciones acuosas se prepararon a 0 °C. A continuación, las soluciones acuosas obtenidas se estabilizaron en un criostato a temperaturas entre 0 y 25 °C.

10 [0076] Para obtener las concentraciones finales de tres componentes (ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 1,8 % y NaGP sódico al 8 % p/v), se añadieron muestras de volúmenes conocidos de la solución acuosa al 50 % p/v de NaGP y la solución acuosa al 10 % p/v de HA sódico a una muestra de volumen conocido de la primera solución acuosa de quitosano al 4 % (concentración de ácido láctico = 0,9 % p/v). La mezcla de las tres soluciones acuosas se mezclaron con agitación vorticial o magnética a temperatura ambiente, obteniéndose una solución homogénea y
15 transparente con un pH final de 6,8.

Ejemplo 8 Preparación de una composición de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 1,8 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v.

20 [0077] La composición del ejemplo 2 se preparó con un método alternativo que permite la mezcla instantánea de dos soluciones distintas.

[0078] Las soluciones de partida se prepararon a temperatura ambiente, se concentraron dos veces con respecto a la concentración final en la composición deseada y se mezclaron al mismo tiempo a través de un inyector automático.
25

[0079] En más detalle, se preparó una solución de al 3,6 % p/v de quitosano con ácido láctico al 1,2 % p/v. Mientras tanto, se prepararon por separado una solución acuosa al 32 % p/v de glicerofosfato sódico pentahidrato (NaGP) y una solución acuosa al 4 % p/v de hialuronato sódico (HA) y después se mezclaron en la misma proporción, para tener una concentración de NaGP al 16 % y una concentración de HA al 2 %.
30

[0080] Se recogieron 5 ml de cada una de las dos soluciones resultantes con 2 jeringas que se montaron en un conjunto de inyector automático a una velocidad de 50 µl/min. Se permitió que las dos soluciones se mezclaran uniendo las dos jeringas a un conector en Y.
35

[0081] En estas condiciones, la composición resultante era una solución homogénea y transparente con un pH final de 7,1.

Ejemplo A Preparación de una composición de ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v.
40

[0082] La preparación del ejemplo 1 se preparó usando un quitosano que tenía un grado de desacetilación del 95 %. Se registró una separación de fases con precipitación de coacervados.

45 Ejemplo B Preparación de una composición de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 1,8 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v.

[0083] La preparación del ejemplo 2 se preparó usando un quitosano que tenía un grado de desacetilación del 95 %. Se registró una separación de fases con precipitación de coacervados.
50

Ejemplo C Preparación de una composición de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 8,0 % p/v.

55 [0084] La preparación del ejemplo 3 se preparó usando un quitosano que tenía un grado de desacetilación del 95 %. Se registró una separación de fases con precipitación de coacervados.

Ejemplo D Preparación de una composición de ácido hialurónico al 0,3 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 18 % p/v.

60 [0085] La preparación del ejemplo 4 se preparó usando un quitosano que tenía un grado de desacetilación del 95 %. Se registró una separación de fases con precipitación de coacervados.

Ejemplo E Preparación de una composición de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 1,8 % y glicerofosfato sódico

pentahidrato al 18 % p/v.

[0086] La preparación del ejemplo 5 se preparó usando un quitosano que tenía un grado de desacetilación del 95 %. Se registró una separación de fases con precipitación de coacervados.

Ejemplo F Preparación de una composición de ácido hialurónico al 1,0 %, quitosano al 3,0 % y glicerofosfato sódico pentahidrato al 18 % p/v.

[0087] La preparación del ejemplo 6 se preparó usando un quitosano que tenía un grado de desacetilación del 95 %. Se registró una separación de fases con precipitación de coacervados.

Ejemplo 9 Evaluación de la turbidez de las composiciones de los ejemplos 1, 2 D y E

[0088] La turbidez de las soluciones finales preparadas de acuerdo con los ejemplos 1, 2 D y E se determinó leyendo la transmitancia de dichas soluciones a 590 nm usando un espectrofotómetro V530 UV-Vis (Jasco, Japón) equipado con una cubeta de cuarzo que con una longitud óptica de 1 cm.

[0089] Los resultados se informan en la tabla 1.

Tabla 1. Ensayo de turbidez de las composiciones de los ejemplos 1, 2 D y E

Composición (Ejemplos)	Transmitancia de la solución %
1	71,05
2	42,35
D	2,58
E	4,05

[0090] Los datos informados en la Tabla 1 indican que la composición de los Ejemplos D y E eran soluciones no transparentes ya que transmitían sólo el 3-4 % de la luz incidente, mientras que la composición de los Ejemplos 1 y 2 eran soluciones transparentes y claras.

Ejemplo 10 Termogelificación de las composiciones preparadas de acuerdo con los ejemplos 1-6 en comparación con las composiciones preparadas de acuerdo con los ejemplos A-F

[0091] Las propiedades de transición sol-gel de las composiciones acuosas preparadas se evaluaron midiendo la diferencia de viscosidad (viscosidad Δ) entre la viscosidad medida a temperatura ambiente (15-25 °C) y después de la gelificación a 37 °C. Las mediciones de viscosidad se realizaron usando un viscosímetro tipo Brookfield Visco-Star-R, equipado con un husillo tipo R7 (Fungila S.A., Italia).

[0092] El ensayo se realizó en las siguientes condiciones:

- Temperatura de partida: 0 - 0,5 °C;
- Tiempo de estabilización a la temperatura de partida: 15 minutos;
- Tiempo de estabilización a temperatura ambiente (15-25 °C): 30 minutos;
- Calentamiento en un baño termostático de agua a 37 °C durante 12-16 horas;
- Velocidad del husillo (100 rpm).

[0093] Los resultados se informan en la tabla 2.

Tabla 2. Ensayo de termogelificación de las composiciones del ejemplo 1-6 y de los ejemplos de comparación A-F

Composiciones (Ejemplos)	Quitosano (DD al 75 %)	HA	NaGP	Termogelificación (viscosidad Δ)
1	3,0	0,3	8,0	3,75 10 ³
2	1,8	1,0	8,0	1,7 10 ³
3	3,0	1,0	8,0	1,95 10 ³
4	3,0	0,3	18	4,65 10 ³
5	1,8	1,0	18	1,85 10 ³
6	3,0	1,0	18	4,10 10 ³
Composiciones (Ejemplos)	Quitosano (DD al 95 %)	HA	NaGP	Termogelificación (viscosidad Δ)
A	3,0	0,3	8,0	-
B	1,8	1,0	8,0	-
C	3,0	1,0	8,0	-
D	3,0	0,3	18,0	-

E	1,8	1,0	18,0	-
F	3,0	1,0	18,0	-

[0094] Como se muestra por los resultados, el grado de desacetilación de quitosano parecía desempeñar un papel crucial en la transición sol-gel de las composiciones ensayadas.

5 [0095] Un análisis estadístico de los datos presentados en la Tabla 2 evidencia que, en la termogelificación, se presentó una alta significación estadística de los efectos por el grado de desacetilación del quitosano (valor de $p = 3 \times 10^{-4}$). Se presentó una significación estadística inferior por el efecto de la concentración de ácido láctico (valor de $p = 0,025$), mientras que el efecto de la concentración de quitosano, HA y NaGP no fue significativo (valor de $p = 0,15, 0,69$ y $0,59$, respectivamente).

10 [0096] Este análisis de los efectos permite concluir que la concentración de HA y NaGP prácticamente no tiene efecto dentro del intervalo de concentración considerado sobre el pH y la capacidad de la formulación para dar lugar a la termogelificación, mientras que la concentración de ácido láctico demostró ser un parámetro crítico tanto para el pH como para la termogelificación.

15 [0097] El pH no se vio afectado por el tratamiento de calentamiento para la termogelificación.

Ejemplo 11 Termogelificación de las composiciones preparadas de acuerdo con los ejemplos 1, 3, 4 y 6 a diferentes temperaturas

20 [0098] Las composiciones se ensayaron con el fin de averiguar la temperatura mínima a la que tiene lugar la termogelificación. Se consideraron cuatro temperaturas diferentes, concretamente, 30, 34,5, 35,5 y 37,5 °C.

25 [0099] Los resultados obtenidos se informan en la Tabla 3.

Tabla 3. Evaluación del aumento de viscosidad tras el calentamiento a diferentes temperaturas

Composiciones (Ejemplos)	30 ± 0,5 °C	34,5 ± 0,5 °C	35,5 ± 0,5 °C	37,5 ± 0,5 °C
1	Sin gelificación	Sin gelificación	Sin gelificación	Alta gelificación
3	Sin gelificación	Sin gelificación	Sin gelificación	Alta gelificación
4	Únicamente opalescencia	Alta gelificación	Alta gelificación	Alta gelificación
6	Sin gelificación	Alta gelificación	Alta gelificación	Alta gelificación

30 [0100] Se puede observar que ninguna de las composiciones ensayadas dio lugar a la termogelificación a 30 °C. Las composiciones de los ejemplos 4 y 6 se sometieron a transición sol-gel a 34,5 °C, mientras que para las composiciones de los ejemplos 1 y 3 el fenómeno se observó en torno a 37 °C.

Ejemplo 12 Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las composiciones preparadas de acuerdo con los ejemplos 1, 2, 3, 7 y 8

35 [0101] El análisis DSC utilizado para medir la cantidad de agua libre (congelable) se realizó con una DSC 821 e (Mettler Toledo, Estados Unidos) impulsada por un software STARE (Mettler Toledo, Estados Unidos). Esta determinación se basa en la medición de la entalpía de fusión del agua en la muestra en comparación con la entalpía de fusión de agua pura por unidad de peso de acuerdo con la siguiente ecuación (1):

$$F_w = \Delta Hf_s / (\Delta Hf_{pw} / m_{pw}) \quad (1)$$

40 donde:

45 F_w es la masa de agua libre en la muestra ensayada; ΔHf_s es la entalpía de fusión del agua en la muestra ensayada; ΔHf_{pw} es la entalpía de fusión de una muestra de agua pura con masa m_{pw} .

[0102] El porcentaje de agua unida, B_w , se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (2):

$$B_w = (T_w - F_w) / T_w \times 100 \quad (2)$$

50 donde:

T_w es la cantidad total de agua en las muestras según se determina por TGA (TG 50, Mettler Toledo Estados Unidos, impulsado por el software STARe, Mettler Toledo Suiza).

- 5 **[0103]** El porcentaje del agua unida en las muestras se informa en la Tabla 4 con relación relevante entre quitosano y ácido hialurónico.

Tabla 4. Relación entre la concentración (%) de quitosano y la concentración de HA para las diferentes formulaciones y el porcentaje relevante de agua unida.

Composiciones (Ejemplos)	Relación de quitosano/HA	% de agua unida
2	1,8	8,09
3	3	9,07
7	6	10,57
1	10	12,77

- 10 **[0104]** Se encontró una correlación lineal ($R^2 = 0,996$) entre la relación de concentración quitosano/ácido hialurónico y el porcentaje de agua unida (figura 1).

- 15 **[0105]** Esto indica que a medida que la relación entre quitosano y HA aumenta, el porcentaje de agua unida también aumenta. Esto podría estar relacionado con la interacción entre quitosano y HA más que simplemente con la mejor capacidad de quitosano para interactuar con agua con respecto a HA. De hecho, el quitosano está más disponible para el agua de unión en las composiciones en las que está menos implicada en las interacciones con el ácido hialurónico.

- 20 **[0106]** También se ensayó una composición preparada de acuerdo con el ejemplo 8 que tenía la mitad de la concentración de quitosano (0,9 %). Esta formulación no estaba completamente clara, sugiriendo una hidratación incompleta de los componentes. Además, no funcionó en la termogelificación. Los análisis por DSC y TGA indicaron ausencia de agua ligada en la solución de partida.

25 Ejemplo 13 Mucoadhesividad de las composiciones preparadas de acuerdo con los ejemplos 1 y 2: Mucoadhesión ex vivo

- 30 **[0107]** El potencial mucoadhesivo de las composiciones se determinó mediante pruebas de lavado adaptadas del método informado por Lehr et al. (Lehr A. et al., Int. J. Pharmaceutics, 1992, 78, 43-48).

- 35 **[0108]** Se obtuvieron intestinos de cerdo recién extirpados (Large White, Landrace, 10-11 meses, 145-190 kg) de un matadero local (Parma, Italia) a una hora del sacrificio. El explante intestinal (al menos 30 cm de colon descendente, cortado de la flexión izquierda y sigma) se realizó por un veterinario. El intestino de cerdo recién extirpado se transportó al laboratorio en una solución salina isotónica en un baño de hielo en una hora desde el sacrificio. Después de un extenso lavado con solución salina isotónica (500 ml en al menos tres veces), cada muestra de intestino se cortó a lo largo de su longitud y la mucosa se separó cuidadosamente del tejido conectivo subyacente con tijeras quirúrgicas prestando atención a no dañar la estructura mucosa.

- 40 **[0109]** Se pegó un trozo de tejido intestinal de cerdo (aproximadamente 2 cm x 4 cm) sobre un portaobjetos de vidrio usando pegamento de cianoacrilato, manteniendo el lado luminal hacia arriba. Se distribuyó uniformemente un peso dado de la composición sobre el tejido de la mucosa intestinal, luego los portaobjetos de vidrio se mantuvieron durante 15 minutos en un horno a 37 °C. Cada portaobjetos de vidrio se colgó después en el brazo de un aparato desintegrante de comprimidos Ph. Eur. 7.0 (Erweka, Alemania) y se sumergió con regularidad (30 carreras/min) en 30 ml de una solución tampón de fosfato (pH 6,8) a 37 ± 0,5 °C mediante la operación del aparato de ensayo de desintegración de comprimidos Ph. Eur. 7.0.

- 45 **[0110]** A intervalos de tiempo dados, se recogió 1 ml de solución y se reemplazó por tampón fresco. Las muestras recogidas se congelaron antes de tratamiento adicional para la cuantificación. Las muestras extraídas de la prueba de lavado se trataron después y se analizaron por HPLC-ESI-MS para determinar la cuantificación de HA liberado de la composición en la solución tampón. La liberación de HA se tomó como una indicación negativa de la capacidad de la composición para mantener en contacto con la mucosa con el tiempo.

- 50 **[0111]** Se ensayaron las composiciones preparadas de acuerdo con los ejemplos 1 y 2. Para la referencia de control se usaron dos composiciones de gel de Carbopol® que contenían el mismo porcentaje de HA.

55 Preparación de muestras para análisis

[0112] El ácido hialurónico es un polisacárido lineal de alto peso molecular de origen natural. Las unidades disacáridas de repetición consisten en ácido glucurónico y N-acetilglucosamina a través de un enlace β -1,4. La cuantificación directa de HA en solución no es factible para un gran número de muestras tales como la obtenida a partir de estos experimentos de liberación. La HA se suele cuantificar mediante la cuantificación de uno o más productos de degradación de HA. Dado que la degradación enzimática de HA es costosa y duradera, se prefieren métodos que incluyen degradación alcalina o ácida. En este estudio se utilizó un protocolo de degradación de ácidos. Adoptando el método informado por Alkrad et al (Alkrad J.A. et al., J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 30, 913-919): cada muestra (1 ml) obtenida del experimento de lavado se retiró por secado y después se trató con 250 μ l de una solución al 47,5 % (v/v) de ácido sulfúrico. Las muestras se mantuvieron a 45 °C durante 10 minutos, después la reacción se detuvo neutralizando con soluciones de hidróxido sódico para alcanzar un pH 5. Cada muestra se llevó a un volumen final de 3 ml con agua destilada, a continuación se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μ m y se mantuvo a -20 °C antes del análisis por LC-MS.

Método de cromatografía líquida-electronebulización-espectrometría de masas

[0113] La separación por HPLC se realizó en una columna Atlantis® dC18 100 A de 5 μ m (2,1 mm x 100 mm) (Waters Corporation, Estados Unidos). La fase móvil se suministró mediante una bomba binaria (serie Agilent 1100) y la elución se realizó en modo gradiente usando una solución acuosa de ácido fórmico (pH 3,5) (eluyente A) y metanol (eluyente B) a un caudal de 0,2 ml/min. La muestra (V_{inj} : 20 μ l) se inyectó en un gradiente ajustado como se indica a continuación:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
1	98	2
2	98	2
3	60	40
4	60	40
5	20	80
8	20	80
9	98	2
13	98	2

[0114] Los espectros de masas de ESI se registraron usando un MS API 150EX equipado con una fuente de pulverización Turboion (Applied Biosystems, Estados Unidos). Los parámetros de la interfaz de electronebulización se ajustaron como se indica a continuación: tensión capilar 4,5 kV, temperatura de la fuente 450 °C, potencial de desagrupación 50 V, potencial de enfoque 400 V. Para el análisis cuantitativo se adquirieron señales en ionización positiva en modo SIM monitorizando iones a m/z 380, m/z 759. Se usó nitrógeno como una cortina (10 l/hora) y gas nebulizante (10 l/h).

Resultados del estudio de mucoadhesividad

A. Liberación de HA en los experimentos de lavado

[0115] Se mezcló HA con composiciones a base de quitosano y Carbopol®. Mediante la realización de experimentos de lavado como se ha descrito anteriormente, se controló la liberación de HA de la composición de los ejemplos 1 y 2 depositada sobre la mucosa de cerdo en solución de PBS mantenidas a 37 °C en función del tiempo.

[0116] La composición preparada de acuerdo con el ejemplo 1 (que contenía HA al 0,3 %) liberó aproximadamente el 10 % de la cantidad inicial de HA en los primeros 10 minutos, después de lo cual la concentración de HA en la solución tampón se estabilizó indicando que no había más liberación de HA de la composición (figura 2). La explosión inicial es probablemente atribuible a la caída mecánica de la capa superior de la formulación debido a la gravedad después de las primeras carreras de la prueba.

[0117] La composición a base de Carbopol® correspondiente mostró un perfil de liberación similar pero se desplazó a mayores valores de % de HA. De hecho, la cantidad de HA liberada después de 10 minutos fue aproximadamente el 55 % de la dosis. También en este caso se observó una meseta a lo largo de la parte restante del experimento (figura 3).

[0118] En el caso de la composición a base de quitosano preparada de acuerdo con el ejemplo 2 (que contenía HA al 1 %) se controló una liberación de aproximadamente el 60 % de la dosis de HA en los primeros 45 minutos seguida de un aumento muy bajo en la concentración de HA que alcanzó el 70 % después de 10 horas (figura 4).

[0119] En el caso de la composición a base de Carbopol® correspondiente a la composición 2, la liberación de HA

se completó en menos de 45 minutos (figura 5).

[0120] Los resultados indicaron claramente la mayor mucoadhesividad de la composición a base de quitosano tanto en los casos de composiciones preparadas de acuerdo con los ejemplos 1 y 2 con respecto a las composiciones a base de Carbopol® correspondientes.

5

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición que comprende ácido hialurónico y sales del mismo en mezcla con quitosano y sales del mismo y una sal de glicerofosfato en una solución acuosa, en la que el quitosano tiene un grado de desacetilación en el intervalo del 60 al 80 % y dicha composición tiene una propiedad de transición sol-gel a 35-38 °C, formando así un hidrogel a dichas temperaturas.
- 10 **2.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las relaciones entre ácido hialurónico y quitosano son de 1:0,6 a 1:45 (HA:quitosano).
- 3.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las relaciones entre quitosano y glicerofosfato son de 1:0,8 a 1:15 (quitosano:glicerofosfato).
- 15 **4.** La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que las relaciones entre ácido hialurónico y quitosano son de 1:10 a 1:1,8 (HA:quitosano).
- 5.** La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que las relaciones entre quitosano y glicerofosfato son de 1:1,8 a 1:7,0 (quitosano:glicerofosfato).
- 20 **6.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el contenido de los componentes está comprendido en los intervalos:
- ácido hialurónico del 0,1 al 1,5 % p/v;
 - quitosano del 1,0 al 4,5 % p/v; y
 - glicerofosfato anhidro del 4,0 al 15,0 % p/, y
- 25 en la que el pH está comprendido entre 6,9 y 7,1.
- 7.** La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el contenido de los componentes está comprendido en los intervalos:
- ácido hialurónico del 0,3 al 1,0 % p/v;
 - quitosano del 1,8 al 3,0 % p/v; y
 - glicerofosfato anhidro del 5,6 al 12,7 % p/v.
- 35 **8.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el glicerofosfato es del 5,6 % p/v.
- 9.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ácido hialurónico tiene un peso molecular comprendido entre 7 y 250 kDa.
- 40 **10.** La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el ácido hialurónico tiene un peso molecular comprendido entre 30 y 250 kDa.
- 11.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el quitosano tiene un grado de desacetilación del 70-80 %.
- 45 **12.** La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-11, en la que el glicerofosfato está en forma de hidrato cristalino con 4 a 6 moléculas de agua de cristalización.
- 50 **13.** La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-12, que comprende además un ácido inorgánico u orgánico seleccionado de ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, sulfúrico, ascórbico, málico, succínico, adípico o fumárico en un intervalo del 0,6 al 0,9 % p/v.
- 14.** La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas de la mucosa de las cavidades corporales por administración tópica.
- 55 **15.** La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el uso es para la cicatrización de heridas de la mucosa oral, nasal, gastrointestinal, colorrectal y vaginal.
- 16.** La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el uso es para la cicatrización de heridas de lesiones mucosas derivadas de quimioterapia y/o radioterapia usadas para tratar el cáncer.
- 60

FIGURA 1

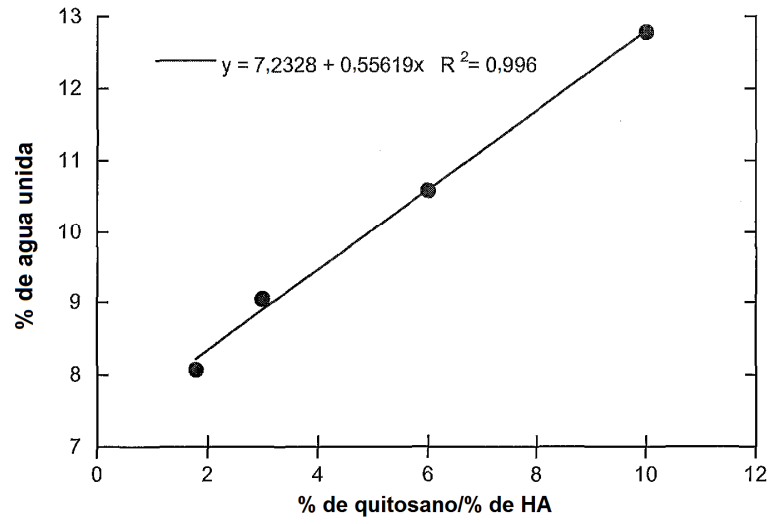


FIGURA 2

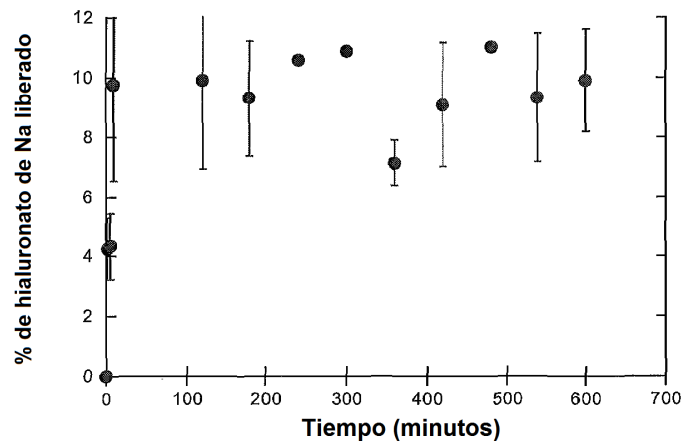


FIGURA 3

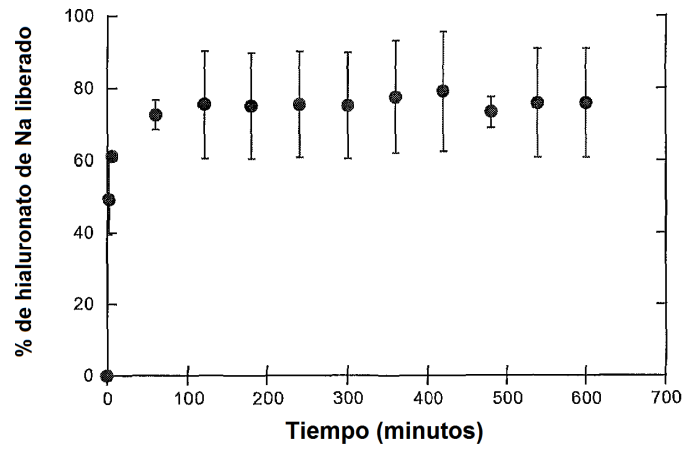


FIGURA 4

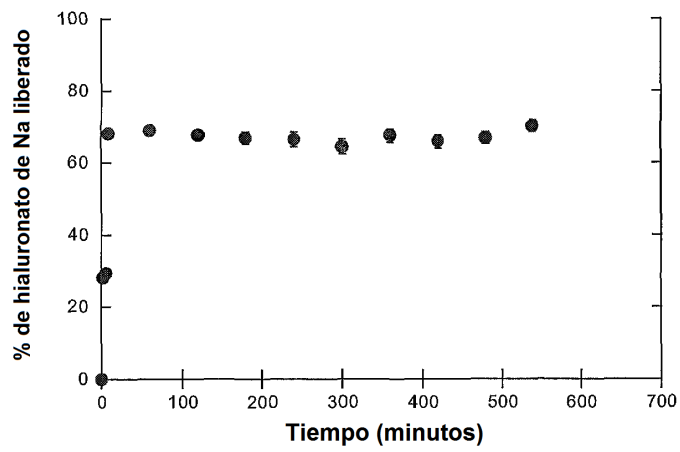


FIGURA 5

