

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 549**

51 Int. Cl.:

A61K 31/728 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2014** **E 19202082 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2022** **EP 3613423**

54 Título: **Composiciones de hialuronano con alta elasticidad y usos de las mismas**

30 Prioridad:

10.07.2013 US 201361844645 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2023

73 Titular/es:

MATRIX BIOLOGY INSTITUTE (100.0%)
17 Annett Avenue
Edgewater, NJ 07020, US

72 Inventor/es:

BALAZS, ENDRE, A y
BELMONTE, CARLOS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 933 549 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 de hialuronano con alta elasticidad y usos de las mismas

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense n.º 61/844.645, presentada el 10 de julio de 2013.

10 **Antecedentes de la invención**

El hialuronano (HA) es un polisacárido lineal de alto peso molecular promedio que se encuentra principalmente en la matriz extracelular y la matriz pericelular, pero también se ha demostrado que aparece intracelularmente. Las funciones biológicas de HA incluyen el mantenimiento de la elastoviscosidad de los tejidos conectivos líquidos, como el líquido sinovial articular y el vítreo ocular, el control de la hidratación de los tejidos y el transporte de agua, el ensamblaje supramolecular de proteoglicanos en la matriz extracelular y numerosas funciones mediadas por receptores en el desprendimiento de células, la mitosis, la migración y el desarrollo tumoral.

El efecto analgésico de las soluciones de HA sobre los receptores del dolor articular está bien documentado. Se ha sugerido anteriormente que el HA de alto peso molecular promedio, cuando se inyecta por vía intraarticular, puede ser el más eficaz para reducir el dolor articular. Existe evidencia experimental que sugiere que el hialuronano de alto peso molecular promedio actúa como un filtro elastoviscoso, amortiguando la transmisión de fuerzas mecánicas a los canales iónicos responsables de la detección de estímulos dañinos en las terminaciones nerviosas del dolor articular, disminuyendo así su excitación. Sin embargo, se desconoce el tipo de interacción entre las moléculas de HA y los canales iónicos que provocan un cambio en la excitabilidad de las terminaciones nerviosas del dolor. Además, las propiedades reológicas de las soluciones de HA que son más apropiadas para maximizar sus efectos analgésicos sobre los receptores del dolor articular no se han investigado completamente.

El dolor asociado con la función articular, incluido el dolor asociado con la función de la articulación de la rodilla y la osteoartritis, puede tratarse mediante la inyección de composiciones que incluyen hialuronano en la articulación dolorida. Sin embargo, los métodos de tratamiento actuales no dan como resultado una supresión completa del dolor o una reducción uniforme del dolor en todos los pacientes. Por tanto, se necesitan en la técnica composiciones a base de hialuronano con propiedades mejoradas.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los presentes inventores han descubierto que las composiciones que comprenden altas concentraciones de HA, por ejemplo, composiciones que tienen concentraciones de HA de aproximadamente 30 mg/ml (aproximadamente 3% en peso/volumen), o más, son sorprendentemente eficaces para tratar el dolor articular. De hecho, tales composiciones de HA son significativamente más efectivas para tratar el dolor articular que Synvisc®, el producto comercial de HA de mayor éxito que se utiliza actualmente para la viscosuplementación. Sin desear ceñirse a una teoría específica, se cree que la efectividad de las composiciones de HA de la invención que comprenden altas concentraciones de HA en el tratamiento del dolor articular está determinada por su alta elasticidad, como lo demuestra el alto valor del módulo elástico, G' . También se cree, sin desear estar ligado a una teoría específica, que la efectividad de las composiciones de HA de la invención está determinada por una probabilidad relativamente alta de interacción de moléculas de HA con canales transductores del dolor, como TRPV1, reduciendo así la excitabilidad de los nociceptores.

Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones que comprenden hialuronano, en las que el hialuronano está presente en la composición a una concentración de más de aproximadamente 30 mg/ml; el hialuronano tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 millones; el hialuronano no está reticulado y/o está sustancialmente libre de modificaciones químicas; y en las que la composición está sustancialmente libre de otras sustancias farmacéuticamente activas.

En una realización, la otra sustancia farmacéuticamente activa es una proteína. En otra realización, la otra sustancia farmacéuticamente activa es un glicosaminoglicano que es diferente de hialuronano. En aún otra realización, la otra sustancia farmacéuticamente activa es hidroxipropilmetilcelulosa. En una realización adicional, la otra sustancia farmacéuticamente activa es un anestésico local, por ejemplo, lidocaína o bupivacaína.

En algunas realizaciones, el hialuronano está presente en la composición a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml o aproximadamente 60 mg/ml.

Según la invención, la composición tiene una elasticidad de al menos aproximadamente 900 pascas cuando se

mide a una frecuencia de 0,5 Hz, o una elasticidad de al menos aproximadamente 1.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En otro aspecto, la composición tiene una elasticidad de al menos aproximadamente 2.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz, o una elasticidad de al menos aproximadamente 4.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende hialuronano, en la que el hialuronano está presente en la composición a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml; el hialuronano tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 millones; el hialuronano no está reticulado y/o está sustancialmente libre de modificaciones químicas; y en la que la composición está sustancialmente libre de otras sustancias farmacéuticamente activas.

En una realización, la otra sustancia farmacéuticamente activa es una proteína. En otra realización, la otra sustancia farmacéuticamente activa es un glicosaminoglicano que es diferente de hialuronano. En aún otra realización, la otra sustancia farmacéuticamente activa es hidroxipropilmetilcelulosa. En una realización adicional, la otra sustancia farmacéuticamente activa es un anestésico local, por ejemplo, lidocaína o bupivacaína.

Según la invención, la composición tiene una elasticidad de al menos aproximadamente 900 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz, o una elasticidad de al menos aproximadamente 1.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En otro aspecto, la composición tiene una elasticidad de al menos aproximadamente 2.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz, o una elasticidad de al menos aproximadamente 4.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.

En una realización, las composiciones de la invención son estériles. En otra realización, las composiciones son adecuadas para inyección en la articulación de un sujeto, por ejemplo, la rodilla, el codo, la cadera u otras articulaciones apendiculares o axiales.

La presente invención también proporciona las composiciones reivindicadas en métodos para reducir al menos un síntoma asociado con la disfunción articular. Los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención, reduciendo así al menos un síntoma asociado con la disfunción articular.

En algunas realizaciones, la disfunción articular es el dolor articular o la disfunción articular asociada con osteoartritis, postartroscopia, postartroplastia, postlesiones o inmovilización prolongada. En una realización específica, la disfunción articular es un dolor articular.

En algunas realizaciones, la administración de la composición de la invención provoca una reducción, por ejemplo, una reducción en al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces o al menos cinco veces del número de impulsos nerviosos inducidos por movimientos normales y anormales en un modelo de rata experimental de osteoartritis.

En algunas realizaciones, la administración de la composición de HA de la invención provoca una reducción, por ejemplo, una reducción en al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces o al menos ocho veces del número de impulsos nerviosos inducidos por movimientos normales en un modelo de rata experimental de osteoartritis.

En algunas realizaciones, la administración de la composición de HA provoca una reducción, por ejemplo, una reducción en al menos dos veces, al menos tres veces o al menos cuatro veces del número de impulsos nerviosos inducidos por movimientos anormales en un modelo de rata experimental de osteoartritis. En una realización específica, la reducción es mayor que la reducción provocada por la administración de una cantidad comparable de Synvisc®.

En algunas realizaciones, la composición de HA se administra mediante inyección intraarticular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una jeringa precargada, por ejemplo, una jeringa estéril, que comprende la composición de HA de la invención, así como kits que comprenden dichas jeringas precargadas.

La presente invención se ilustra además mediante la siguiente descripción detallada y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1, panel A, es un gráfico que muestra los valores de G' (en pascales) en función de la frecuencia (en Hz) para las composiciones de HA disponibles comercialmente utilizadas para la viscosuplementación.

La figura 1, panel B, es un gráfico que muestra los valores G' (en pascales) en función de la frecuencia (en Hz) para las composiciones de HA de la invención (Elastovisc™). Esta figura demuestra que las composiciones de la invención se caracterizan por unos valores de G' mucho más altos que cualquiera de los productos comerciales

de HA ensayados.

La figura 2, panel, A es un gráfico que muestra el número de impulsos nerviosos por movimiento en articulaciones inflamadas en función del tiempo después de la inyección de Synvisc® y varias composiciones de HA de la invención.

La figura 2, panel B, es un gráfico que muestra el número promedio de impulsos nerviosos por movimiento en articulaciones inflamadas en función del peso molecular para las composiciones de HA al 4% de la invención.

La figura 2, panel C, es un gráfico que muestra el número promedio de impulsos nerviosos por movimiento en articulaciones inflamadas en función de la concentración de HA.

La figura 2, panel D, es un gráfico de barras que muestra el número promedio de impulsos nerviosos por movimiento en articulaciones inflamadas para varias composiciones de HA probadas.

La figura 3 es un gráfico que muestra el número de impulsos nerviosos evocados por el componente no nocivo del ciclo de movimiento articular en función del tiempo medido en articulaciones inflamadas de ratas después de la inyección con solución salina, Synvisc® o una composición de HA de la invención (Elastovisc™, HA al 4%, peso molecular promedio 1-2 millones).

La figura 4 es un gráfico que muestra el número de impulsos nerviosos evocados por el componente nocivo del ciclo de movimiento en función del tiempo medido en articulaciones inflamadas de ratas después de la inyección con solución salina, Synvisc® o una composición de HA de la invención (Elastovisc™, HA al 4%, peso molecular promedio 1-2 millones).

La figura 5, panel A, muestra el número total promedio de impulsos por movimiento registrados en diferentes momentos después del inicio de la inflamación seguido de una inyección intraarticular de solución salina o una composición de HA al 4% de la invención.

La figura 5, panel B, muestra la diferencia porcentual en el número total promedio de impulsos por movimiento medidos después de la inyección de solución salina o HA al 4%, en diferentes momentos después de la inyección.

La figura 6, panel A, es un gráfico que muestra el número promedio de impulsos por movimiento con movimientos repetidos en tres articulaciones intactas no inyectadas (círculos en blanco) y en siete articulaciones intactas (círculos rellenos) después de una inyección intraarticular de una composición de HA al 4% de la invención 24 horas antes.

La figura 6, panel B, es un gráfico de barras que muestra los valores promedio de los impulsos provocados por el movimiento por movimiento medidos en articulaciones intactas no inyectadas y en articulaciones intactas inyectadas con una composición de HA al 4% de la invención 24 horas antes.

La figura 6, panel C, es un gráfico que muestra el curso temporal de la disminución en la actividad evocada por el movimiento en dos fibras nociceptoras de articulaciones diferentes de diferentes ratas después de la inyección intraarticular de una composición de HA al 4% en una articulación de rodilla intacta.

La figura 7 es un gráfico que muestra el número de impulsos nerviosos provocados por el movimiento en función del tiempo medido en las articulaciones de rata intactas después de la inyección intraarticular con solución salina o tres volúmenes diferentes de la composición de HA de la invención (Elastovisc™).

En la figura 8, los paneles A1 y A2 muestran aumentos de calcio intracelular evocados en células HEK-TRPV1-EYFP(+) por calor después de la perfusión con solución salina (A1) o 400 µg/ml de HA (A2). El panel A3 muestra la proporción de cambio de amplitud promedio entre las respuestas evocadas por pulsos de calor sucesivos en la solución salina de control y durante la perfusión con HA para las células HEK-TRPV1-EYFP(+).

En la figura 8, los paneles B1 y B2 muestran aumentos de calcio intracelular evocados en neuronas adultas del DRG por calor después de la perfusión con solución salina (B1) o 400 µg/ml de HA (B2). El panel B3 muestra la relación de cambio de amplitud promedio entre las respuestas provocadas por pulsos de calor sucesivos en la solución salina de control y durante la perfusión con 400 µg/ml de HA para neuronas adultas del DRG.

En la figura 8, los paneles C1 y C2 muestran un aumento de calcio intracelular en una célula HEK-TRPV1-EYFP(+) en respuesta a capsaicina 100 nM y carbacol 10 µM en solución de control (C1) y bajo exposición a 400 µg/ml de HA (C2). El panel C3 muestra la amplitud promedio de la respuesta a capsaicina (barras negras) y carbacol (barras rayadas) en células HEK-TRPV1-EYFP(+) durante la perfusión con solución salina control y en presencia de HA.

En la figura 8, los paneles D1 y D2 muestran las respuestas de calcio intracelular de neuronas sensoriales adultas del DRG a capsaicina 100 nM y KCl 30 mM durante la perfusión con solución salina (D1) y con 400 µg/ml de HA (D2). El panel D3 muestra la amplitud promedio de las respuestas de calcio intracelular a la capsaicina (barras negras) o KCl (barras rayadas) en solución salina de control y en presencia de HA.

La figura 9, panel A, muestra las relaciones I-V de las corrientes evocadas por capsaicina en células HEK-293-TRPV1 en solución salina (trazo negro) y en la disolución de 400 µg/ml de HA (trazo gris).

La figura 9, panel B, muestra la corriente promedio medida a un potencial de +80 mV, obtenida de las curvas I-V mostradas en el panel A.

La figura 9, panel C, muestra valores de diferentes parámetros medidos desde las rampas, ajustados con una función que combina una conductancia lineal multiplicada por un término de activación de Boltzmann, $I = g \times (V - E_{rev}) / (1 + \exp((V_{1/2} - V)/S))$.

La figura 9, panel D, muestra las corrientes de células completas medidas a un potencial de -60 mV, en respuesta a capsaicina 1 µM, en condiciones de control (trazo superior) y en células preincubadas durante 30 minutos y perfundidas continuamente con HA (trazo inferior).

La figura 9, panel E, muestra valores promedio de corrientes pico en células HEK-293-TRPV1 evocadas por capsaicina a -60 mV en solución salina y en presencia de HA.

La figura 10, panel A, muestra un registro de muestra de la actividad de un solo canal de TRPV1 bajo perfusión con solución salina.

La figura 10, panel B, muestra un registro de muestra de la actividad de un solo canal de células incubadas en HA y registradas bajo perfusión con solución de HA. Los recuadros representan histogramas de probabilidad de amplitud de un solo canal de cada registro.

La figura 10, panel C, muestra las curvas I-V obtenidas en condiciones de control (cuadrados rellenos) y después de la exposición a HA (círculos grises).

La figura 10, panel D, muestra amplitudes de un solo canal obtenidas de parches individuales, representadas como cuadrados (control) y círculos (tratados con HA).

La figura 10, panel E, muestra la probabilidad del estado abierto para diferentes parches. Los símbolos más grandes representan los datos de las mediciones realizadas en los trazos que se muestran en los paneles A y B.

La figura 11, panel A, muestra un registro de muestra de la respuesta a la capsaicina en una única neurona del DRG perfundida con solución salina.

La figura 11, panel B, muestra un registro de muestra de la estimulación con capsaicina en una neurona del DRG tratada con HA y registrada en presencia de HA.

La figura 11, panel C, muestra un registro de muestra en una neurona del DRG tratada con HA, en la que la respuesta a la capsaicina fue abrogada mientras aún se evocaba una respuesta normal al KCl.

La figura 11, panel D, muestra la frecuencia promedio de disparo (izquierda) y los datos individuales (derecha) de las neuronas del DRG en condiciones de control y después de la exposición a HA.

La figura 12 muestra la latencia de la respuesta nociceptiva de ratones en la prueba de placa caliente a una temperatura de placa de 52 °C en ratones de tipo salvaje (panel izquierdo) y en ratones con TRPV1 inactivada (panel derecho), después de una inyección subcutánea en la pata de 10 µl de solución salina estéril, HA, hialuronidasa (Hyasa 6U) o hialuronidasa seguida de otra inyección de HA.

La figura 13, panel A, muestra la actividad del impulso nervioso evocado por un movimiento articular en una rata anestesiada.

La figura 13, panel B, es un trazado expandido de una de las fibras nerviosas activadas por el movimiento de la articulación. El panel B muestra que esta fibra nerviosa se recluta mediante una rápida inyección en embolada de capsaicina en la arteria articular (trazo superior). Después de una inyección intraarticular de HA, la respuesta a la capsaicina disminuye gradualmente con el tiempo (trazo intermedio, 180 min; trazo inferior, 240 min).

La figura 13, panel C, es un gráfico que muestra los valores promedio de la respuesta de disparo a la capsaicina intraarterial, medidos en animales que recibieron una inyección de solución salina intraarticular (cuadrados rellenos) o HA (cuadrados en blanco).

La figura 14 muestra la presión requerida para expulsar una solución de HA al 4% a través de agujas de diferentes tamaños.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones que comprenden altas concentraciones de hialuronano (HA). Se determinó que tales composiciones tenían alta elasticidad, por ejemplo, módulo de elasticidad G' alto, cuando se mide a frecuencias de 0,1-10 Hz. Actualmente se ha descubierto que las composiciones de HA caracterizadas por una alta elasticidad, por ejemplo, las composiciones que comprenden altas concentraciones de HA, son sorprendentemente eficaces para tratar el dolor articular, tal como el dolor articular causado por la osteoartritis. El peso molecular promedio de HA comprendido en las composiciones de la invención puede ser de 2 millones o menos, por ejemplo, entre aproximadamente 1-2 millones.

El descubrimiento anterior fue inesperado porque anteriormente se creía que la eficacia de las composiciones de HA en el tratamiento del dolor articular dependía del peso molecular promedio de HA y no de su concentración. En particular, se creía que las composiciones de HA de alto peso molecular promedio, por ejemplo, las composiciones que comprenden HA con un peso molecular promedio superior a 2 millones, eran las más eficaces para tratar el dolor articular.

El hialuronano (también llamado ácido hialurónico o hialuronato o HA) es un glicosaminoglicano presente en el líquido articular y en el tejido sinovial que lo rodea. Este polisacárido polidisperso, altamente elastoviscoso, es un componente principal del líquido sinovial que rellena el espacio intercelular en la membrana sinovial, el tejido conectivo que rodea el espacio articular.

Las propiedades elastoviscosas del líquido sinovial son fundamentales para sus funciones fisiológicas. El líquido sinovial debe tener un flujo viscoso para participar en los movimientos del líquido que son críticos para el metabolismo intraarticular. Sin embargo, el mismo líquido sinovial también debe comportarse como un amortiguador, utilizando sus propiedades elásticas para almacenar el impacto de la tensión mecánica en la articulación de una manera que limite la deformación de las superficies tisulares, estructuras fibrosas, terminaciones nerviosas y células.

La capacidad del HA contenido en el líquido sinovial y los tejidos para modular la respuesta de una articulación a diferentes tipos de movimientos se explica por el hecho de que el HA posee propiedades tanto viscosas como elásticas. Durante el movimiento lento, el líquido sinovial que rellena el tejido está expuesto a bajas frecuencias de deformación y la velocidad a la que se transmite la energía a la red de hialuronano es lo suficientemente baja como para permitir que las moléculas de hialuronano ajusten su configuración y se alineen en la dirección del flujo. Por lo tanto, durante el movimiento lento, la energía aplicada al líquido sinovial se disipa predominantemente como flujo viscoso y calor. Esta alineación de moléculas de hialuronano también es responsable de la pseudoplasticidad del líquido sinovial (adelgazamiento por cizallamiento o disminución de la viscosidad al aumentar el caudal). Sin embargo, cuando la red de hialuronano en el líquido sinovial se somete a una alta tasa de deformación, como durante la carrera o el salto, la tensión se transfiere rápidamente y, por lo tanto, las moléculas de hialuronano no tienen tiempo suficiente para ajustar su configuración. En cambio, el HA actúa como un amortiguador de choque molecular enrollado, almacenando la energía transmitida como deformación elástica y comportándose como un sólido elástico.

La frecuencia de deformación de la tensión mecánica aplicada determina si el hialuronano actúa predominantemente como un fluido viscoso o como un amortiguador elástico. Se utilizan dos valores para describir el perfil reológico de un fluido elastoviscoso: el módulo de elasticidad, G' , que es una medida de elasticidad, mientras que el módulo de viscosidad, G'' , es una medida de viscosidad. Cuando el HA se somete a una alta tasa de deformación, por ejemplo, durante la carrera o el salto, las moléculas de HA actúan como un amortiguador molecular enrollado y se comportan como un sólido elástico. Cuando el HA se somete a una baja tasa de deformación (por ejemplo, durante el movimiento lento), la energía aplicada al líquido sinovial se disipa como flujo viscoso y calor.

En la década de 1960, se descubrió que el hialuronano, cuando se inyecta en las articulaciones de la rodilla inflamadas, reduce el dolor. Como resultado de este descubrimiento, se desarrollaron soluciones de HA altamente purificadas para el tratamiento del dolor artrítico en seres humanos y animales. Este nuevo uso terapéutico se denominó viscosuplementación. El HA puede actuar como una cubierta elastoviscosa, reduciendo la fuerza mecánica que llega a los canales iónicos responsables de la activación de las fibras nerviosas del dolor por estímulos nocivos, reduciendo así la probabilidad de apertura de ciertos canales, disminuyendo el número de impulsos nerviosos en las terminales del dolor y, por tanto, reduciendo las sensaciones de dolor. También se demostró que un aumento de la protección de los receptores del dolor mejora los procesos de curación en la articulación.

El peso molecular promedio del hialuronano en el líquido sinovial humano de un individuo sano es de entre 3-4

millones, mientras que el peso molecular promedio de hialuronano en la articulación patológica está entre 0,5 y 2 millones. Se pensaba que el hialuronano utilizado en el tratamiento del dolor articular, por ejemplo, el dolor articular asociado con la osteoartritis, debía tener un peso molecular promedio similar o incluso mayor que el hialuronano presente en la articulación sana. Para reducir el dolor y la inflamación se utilizó un hialuronano de alto peso molecular promedio que era del mismo tamaño o más grande que el presente en la articulación antes de que la articulación se volviera patológica (dolorosa).

En el líquido sinovial de las articulaciones de la rodilla humana sana, el hialuronano se encuentra en una concentración promedio de alrededor de 321 mg/100 ml (intervalo de 250-368/mg/100 ml). En las articulaciones patológicas, se ha encontrado que el líquido sinovial tiene una concentración más baja, principalmente entre 40-188 mg por 100 ml. También se pensó que el hialuronano utilizado en el tratamiento del dolor articular, por ejemplo, en el dolor articular asociado con la osteoartritis, tenía que administrarse a la misma concentración o incluso más alta que el hialuronano presente en la articulación sana. Las composiciones de hialuronano disponibles comercialmente para inyección en una articulación dolorosa o patológica tienen una concentración de hasta un 2,2% (22 mg/ml). Por tanto, la concentración de hialuronano en las composiciones disponibles para inyección en articulaciones es mucho mayor que la concentración de hialuronano en las articulaciones sanas.

Hay varios productos de hialuronano en el mercado mundial para la mejora de la función articular y el tratamiento del dolor asociado con la función articular (ver por ejemplo, la tabla 1 en el ejemplo 1). Estos productos generalmente tienen un peso molecular promedio alto de hialuronano y una concentración relativamente baja (1-2,2%). Como se señaló anteriormente, el hialuronano en el líquido sinovial humano de un individuo sano tiene un peso molecular promedio de entre 3-4 millones. Se pensó que el hialuronano con un peso molecular promedio alto sería el más eficaz en el tratamiento del dolor articular.

El producto ultrapuro de hialuronano Synvisc® (descrito, por ejemplo, por Endre A. Balazs en la patente de EE. UU. n.º 4.141.973) es el producto de hialuronano con el peso molecular promedio más alto disponible para viscosuplementación (5 millones), y se descubrió que es el "analgésico" más activo en articulaciones patológicas de animales y humanos. Synvisc® también contiene un 20% de un gel de hialuronano reticulado y altamente hidratado. Synvisc® reduce la actividad de impulsos en las fibras sensoriales provocada por los movimientos en las articulaciones normales e inflamadas, reduciendo así el dolor asociado con la función articular. Se cree que Synvisc® es el más eficaz de los productos comerciales de HA disponibles actualmente para el tratamiento del dolor. Sin embargo, la producción de hialuronano estéril con un peso molecular promedio alto es un desafío, y se cree que esta es una razón por la que todos los productos de hialuronano disponibles comercialmente, excepto Synvisc®, tienen un peso molecular promedio significativamente más bajo.

Muchos productos de hialuronano actualmente en el mercado tienen una concentración de hialuronano de aproximadamente 0,8% (Synvisc®), 1,0% (Euflexxa®, Supartz®, Hyalgan®, Gel-One®, Synocrom®, Synocrom® Mini), 1,5% (Orthovisc®), 2% (Synocrom® Forte, Synocrom® Forte One, Synolis V-A) o 2,2% (Monovisc®). Estos productos de hialuronano tienen un porcentaje de hialuronano no superior al 0,8-2,2%, porque dicha concentración ya es mucho más alta que la concentración en el tejido sano. Se asumió en la técnica que concentraciones incluso superiores al 0,8-2,2% serían demasiado altas en comparación con la concentración de hialuronano en la articulación humana sana.

Ahora se ha reconocido por primera vez que las articulaciones inflamadas y dolorosas son más sensibles a las composiciones de HA de alta elasticidad que a las composiciones de HA con baja elasticidad. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones de hialuronano con altas propiedades elásticas y demuestra las propiedades superiores en el tratamiento del dolor articular de las composiciones de hialuronano con altas propiedades elásticas (por ejemplo, Elastovisc™) en comparación con las composiciones actualmente disponibles de hialuronano con baja elasticidad. Las composiciones de hialuronano con altas propiedades elásticas descritas en la presente (por ejemplo, Elastovisc™) se basan en el descubrimiento de que el efecto antidolor del hialuronano en la articulación no depende de la viscosidad del producto, sino de su elasticidad. En consecuencia, el éxito terapéutico de las composiciones de hialuronano descritas en la presente depende de la elasticidad de las composiciones de hialuronano utilizadas. Si bien no se limita a un mecanismo particular, se cree que las concentraciones de hialuronano de alta elasticidad proporcionadas en la presente persisten en la articulación durante mucho tiempo (por ejemplo, semanas o más) e influyen no solo en los receptores del dolor, sino que interactúan con los agentes químicos que causan dolor y/o los eliminan.

Como se describe en la presente, en una realización, se pueden generar composiciones de hialuronano con alta elasticidad aumentando la concentración de hialuronano en las composiciones. En la presente se demuestra, inesperadamente, que las composiciones de hialuronano con una alta concentración de hialuronano, incluso con un peso molecular promedio de 1-2 millones, pueden usarse en el tratamiento del dolor articular. Este resultado es inesperado porque antes de la presente invención se pensaba que solo las composiciones de alto peso molecular promedio de hialuronano (por ejemplo, Synvisc®) podían tener un fuerte efecto reductor del dolor. El resultado es aún más inesperado porque antes de la presente invención se pensaba que concentraciones superiores al 0,8-2,2% (que ya son mucho más altas que las concentraciones que aparecen en la articulación sana) no tendrían efectos beneficiosos adicionales o incluso podrían ser demasiado altas, en comparación con la

concentración en la articulación sana. Además, los presentes inventores han descubierto que la alta concentración de moléculas de HA facilita su interacción con los canales TRPV1 de los nociceptores, reduciendo así la capacidad de respuesta de los nociceptores a los estímulos nocivos.

5 I. Composiciones de hialuronano de la invención

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden hialuronano (HA). En algunas realizaciones, una composición de la invención comprende hialuronano, en la que el hialuronano está presente en la composición a una concentración de más de aproximadamente 30 mg/ml (o más de aproximadamente 3% en peso/volumen); el hialuronano tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 millones; el hialuronano no está reticulado y/o está sustancialmente libre de modificaciones químicas; y en las que la composición está sustancialmente libre de otras sustancias farmacéuticamente activas.

Por ejemplo, la concentración de HA en las composiciones de la invención puede ser de aproximadamente 30 mg/ml (o aproximadamente 3% en p/v), aproximadamente 35 mg/ml (o aproximadamente 3,5% en p/v), aproximadamente 40 mg/ml (o aproximadamente 4,0% en p/v), aproximadamente 45 mg/ml (o aproximadamente 4,5% en p/v), aproximadamente 50 mg/ml (o aproximadamente 5% en p/v), aproximadamente 55 mg/ml (o aproximadamente 5,5% en p/v), aproximadamente 60 mg/ml (o aproximadamente 6% en p/v), aproximadamente 65 mg/ml (o aproximadamente 6,5% en p/v), aproximadamente 70 mg/ml (o aproximadamente 7% en p/v), aproximadamente 75 mg/ml (o aproximadamente 7,5% en p/v), aproximadamente 80 mg/ml (o aproximadamente 8% en p/v), aproximadamente 85 mg/ml (o aproximadamente 8,5% en p/v), aproximadamente 90 mg/ml (o aproximadamente 9% en p/v), aproximadamente 95 mg/ml (o aproximadamente 9,5% en p/v), aproximadamente 100 mg/ml (o aproximadamente 10% en p/v), aproximadamente 105 mg/ml (o aproximadamente 10,5% en p/v), aproximadamente 110 mg/ml (o aproximadamente 11% en p/v), aproximadamente 115 mg/ml (o aproximadamente 11,5% en p/v), aproximadamente 120 mg/ml (o aproximadamente 12% en p/v), aproximadamente 125 mg/ml (o aproximadamente 12,5% en p/v), aproximadamente 130 mg/ml (o aproximadamente 13% en p/v), aproximadamente 135 mg/ml (o aproximadamente 13,5% en p/v), aproximadamente 140 mg/ml (o aproximadamente 14% en p/v), aproximadamente 145 mg/ml (o aproximadamente 14,5% en p/v) o aproximadamente 150 mg/ml (o aproximadamente 15% en p/v). En una realización específica, el HA está presente en la composición a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml (o aproximadamente 4% en p/v). En otra realización específica, el HA está presente en la composición de la invención a una concentración de aproximadamente 60 mg/ml (o aproximadamente 6% en p/v).

En determinadas realizaciones, el hialuronano usado en las composiciones de la invención no está reticulado y/o está libre de modificaciones químicas. Por ejemplo, el hialuronano usado en las composiciones de la invención está libre de amidación que puede formarse mediante una reacción entre el grupo carboxilo de HA y el grupo amina de un agente derivatizante como se describe, por ejemplo, en la patente EP n.º 1095064 B1. El hialuronano usado en las composiciones de la invención también puede estar libre de modificaciones químicas y/o reticulaciones que pueden resultar de la reacción del hialuronano con una carbodiimida, tal como una monocarbodiimida o una biscarbodiimida, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 8.323.617.

En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención están libres de otras sustancias farmacéuticamente activas. Tal como se usa en el presente documento, una "sustancia farmacéuticamente activa" es una sustancia que puede ejercer un efecto biológico sobre un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano o animal. Este término "sustancia farmacéuticamente activa" también comprende sustancias que pueden modular el efecto biológico de una composición de HA cuando la composición se administra a un sujeto, por ejemplo, modular la capacidad de la composición de HA para reducir el dolor en una articulación inflamada. En determinadas realizaciones, la sustancia farmacéuticamente activa es una proteína, por ejemplo, una proteína morfogénica ósea (BMP), tal como rhGDF-5. En determinadas realizaciones, la sustancia farmacéuticamente activa es un glicosaminoglicano (GAG) que es diferente de HA, por ejemplo, condroitina. En algunas realizaciones, la sustancia farmacéuticamente activa es hidroxipropilmetilcelulosa. En otras realizaciones, la sustancia farmacéuticamente activa es un anestésico tópico, tal como lidocaína o bupivacaína.

En determinadas realizaciones, las composiciones de HA de la invención están libres de moléculas que pueden captar radicales libres, tales como sorbitol. En otras realizaciones, las composiciones de HA de la invención están libres de moléculas que disminuyen la elasticidad de HA, por ejemplo, dextrano o sacarosa.

En algunas realizaciones, una composición de HA de la invención consiste esencialmente en HA presente en una concentración de más de aproximadamente 30 mg/ml (aproximadamente 3% en p/v), o aproximadamente 40 mg/ml (aproximadamente 4% en p/v) en un tampón fisiológico, por ejemplo, un tampón fosfato o un tampón bicarbonato, y que tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 millón y aproximadamente 2 millones. En una realización específica, una composición de HA de la invención consiste esencialmente en HA presente en una concentración de aproximadamente 40 mg/ml (o aproximadamente 4% en p/v) y que tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 millón y aproximadamente 2 millones.

En otra realización, las composiciones de HA de la invención pueden administrarse a un sujeto que las necesite mediante una inyección usando un dispositivo de inyección, tal como una aguja, un trócar, una cánula o un dispositivo de perfusión. El dispositivo de inyección adecuado para inyectar las composiciones de HA de la invención puede tener un diámetro nominal de 2,11 mm o más (correspondiente a una aguja 14G, o un calibre de aguja de 14 o más). En algunas formas de realización, las composiciones de HA de la invención pueden ser demasiado viscosas para la administración con agujas más pequeñas, por ejemplo, agujas con un diámetro nominal inferior a 2,11 mm. En otras realizaciones, las composiciones de HA de la invención pueden permitir la administración utilizando dispositivos de inyección más pequeños que tienen un diámetro nominal de menos de 2,11 mm.

Por ejemplo, un dispositivo adecuado para inyectar las composiciones de HA de la invención, como una jeringa, puede tener un diámetro nominal de aproximadamente 0,31 mm, 0,34 mm, 0,36 mm, 0,41 mm, 0,474 mm, 0,46 mm, 0,49 mm, 0,515 mm, 0,51 mm, 0,54 mm, 0,57 mm, 0,59 mm, 0,642 mm, 0,64 mm, 0,67 mm, 0,718 mm, 0,72 mm, 0,77 mm, 0,82 mm, 0,87 mm, 0,91 mm, aproximadamente 0,99 mm, aproximadamente 1,07 mm, aproximadamente 1,17 mm, aproximadamente 1,27 mm, aproximadamente 1,42 mm, aproximadamente 1,47 mm, aproximadamente 1,57 mm, aproximadamente 1,65 mm, aproximadamente 1,73 mm, aproximadamente 1,83 mm, aproximadamente 1,98 mm, aproximadamente 2,11 mm, aproximadamente 2,26 mm, aproximadamente 2,41 mm, aproximadamente 2,54 mm o aproximadamente 2,77 mm, correspondientes, respectivamente, al calibre de 30, 29, 28, 27, 26s, 26, 25,5, 25s, 25, 24,5, 24, 23,5, 23s, 23, 22,5, 22s, 22, 21,5, 21, 20,5, 20, 19,5, 19, 18,5, 18, 17,5, 17, 16,5, 16, 15,5, 15, 14,5, 14, 13,5, 13, 12,5 o 12 (o a agujas 30G, 29G, 28G, 27G, 26sG, 26G, 25,5G, 25sG, 25G, 24,5G, 24G, 23,5G, 23sG, 23G, 22,5G, 22sG, 22G, 21,5G, 21G, 20,5G, 20G, 19,5G, 19G, 18,5G, 18G, 17,5G, 17G, 16,5G, 16G, 15,5G, 15G, 14,5G, 14G, 13,5G, 13G, 12,5G o 12G). En una realización, las composiciones de HA de la invención pueden administrarse usando una aguja de jeringa 18G que tiene un diámetro nominal de aproximadamente 1,27 mm. En algunas formas de realización, las composiciones de HA de la invención pueden ser demasiado viscosas para la administración con agujas más pequeñas, por ejemplo, agujas que tienen un diámetro nominal de.

El hialuronano en las composiciones de la invención tiene una elasticidad de al menos 900 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz, una elasticidad de al menos 1.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz, o una elasticidad de al menos 2.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz, o una elasticidad de al menos 4.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz, o una elasticidad de entre 900 y 5.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.

Debe apreciarse que se encuentran disponibles una variedad de métodos para medir la elasticidad de un biopolímero como el hialuronano. En una realización, la presente invención proporciona composiciones que comprenden hialuronano con alta elasticidad, en las que la elasticidad se mide como presión (expresada en pascales) a una frecuencia específica (expresada en hercios). En algunas realizaciones, las frecuencias utilizadas en la presente corresponden a un movimiento articular particular. Por ejemplo, las frecuencias que se pueden usar para evaluar la elasticidad de las composiciones de hialuronano proporcionadas en la presente se pueden medir a 0,5 Hz (correspondiente a caminar), 2,5 Hz (correspondiente a correr) o 5,0 Hz (correspondiente a saltar). Estas frecuencias son aplicables a la articulación de la rodilla, pero otras articulaciones que tienen una exposición similar (por ejemplo, cadera, tobillos) pueden experimentar la misma frecuencia de estrés. Además, mientras que la elasticidad puede expresarse como una presión en una función específica asociada con la función de la rodilla (por ejemplo, caminar, correr), la elasticidad también puede expresarse como presión ejercida por un movimiento sin caminar (por ejemplo, la rotación de un codo o un hombro o un movimiento de muñeca).

Debe apreciarse además que la elasticidad puede expresarse en cualquier frecuencia pertinente. Así, por ejemplo, en una realización, la elasticidad se expresa en base a una frecuencia de funcionamiento de 2,5 Hz y una composición que comprende hialuronano con alta elasticidad es una composición con una elasticidad de al menos 200 Pa a una frecuencia de 2,5 Hz. De manera similar, en una realización, la elasticidad se expresa en base a una frecuencia de "salto" de 5,0 Hz y una composición que comprende hialuronano con alta elasticidad es una composición que tiene una elasticidad de al menos 400 Pa a una frecuencia de 5,0 Hz.

Según la invención, la composición tiene una elasticidad de al menos 900 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende hialuronano, en la que la composición tiene una elasticidad de al menos 1000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 1600 pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 2000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende hialuronano, en la que la composición tiene una elasticidad de al menos 2600 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En

algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 4000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 4500 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende hialuronano, en la que la composición tiene una elasticidad de al menos 4000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 5000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 6000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz.

En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 900 y 10.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 900 y 5.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 1.000 y 2.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.

En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 300 y 10.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 750 y 6.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 1.500 y 4.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz.

En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 300 y 10.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 900 y 7.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 2.000 y 5.000 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz.

En algunas realizaciones, la elasticidad se mide utilizando un dispositivo adecuado (por ejemplo, un reómetro). En algunas realizaciones, la elasticidad se mide usando un reómetro de investigación de alta resolución Stresstech (Reologica Instruments AB). Según la invención, la elasticidad se determina a temperatura y presión ambientales. Sin embargo, debe apreciarse que la elasticidad también se puede medir a temperatura y/o presión no ambiental. Debe apreciarse además que un experto en la técnica sabe cómo convertir una magnitud de elasticidad determinada a diversas temperaturas y presiones en una magnitud de elasticidad a temperatura y presión ambientales.

Como se describe en la presente, las composiciones de hialuronano de alta elasticidad se pueden preparar aumentando la concentración de hialuronano en la composición. Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona composiciones que tienen alta elasticidad que comprenden un alto porcentaje de hialuronano. Por ejemplo, las composiciones de la invención comprenden al menos 3,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 3,5% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 4,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 4,5% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 5,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 5,5% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 6,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 6,5% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 7,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 7,5% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 8,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 8,5% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 8,9% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 9,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 10,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 11,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 12,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 13,0% de hialuronano (en peso por volumen), al menos 14,0% de hialuronano (en peso por volumen), o al menos 15,0% o más de hialuronano (en peso por volumen).

También se pretende que los intervalos intermedios de los valores enumerados sean parte de esta invención. Por ejemplo, el contenido de hialuronano en las composiciones de la invención puede estar entre aproximadamente 3% y aproximadamente 15% (en peso/volumen), entre aproximadamente 3% y aproximadamente 10% (en peso/volumen), aproximadamente 3,5% y aproximadamente 9% (en peso/volumen), aproximadamente 4% y aproximadamente 8% (en peso/volumen), o aproximadamente 5% y aproximadamente 7% (en peso/volumen).

Debe apreciarse además que la cantidad de hialuronano en un volumen particular también puede expresarse por medios alternativos (por ejemplo, gramo/litro o mol/litro). Un experto en la técnica sabría cómo convertir los diversos medios para expresar la cantidad de hialuronano en un volumen particular.

Como se indicó anteriormente, en la presente se demuestra que, inesperadamente, las composiciones de hialuronano con una alta concentración de hialuronano, incluso con un peso molecular promedio de aproximadamente 1-2 millones, son particularmente eficaces en el tratamiento del dolor articular. Por tanto, en algunas realizaciones de las composiciones de hialuronano proporcionadas en la presente, el peso molecular promedio del hialuronano es menos de 2 millones, menos de 1,9 millones, menos de 1,8 millones, menos de 1,7 millones, menos de 1,6 millones, menos de 1,5 millones, menos de 1,4 millones, menos de 1,3 millones, menos de 1,2 millones, menos de 1,1 millones, menos de 1 millón, menos de 0,9 millones, menos de 0,8 millones,

menos de 0,7 millones, menos de 0,6 millones, o menos de 0,5 millones.

También se pretende que los intervalos intermedios de los valores enumerados sean parte de esta invención. Por ejemplo, en las composiciones de hialuronano proporcionadas en la presente, el peso molecular promedio de hialuronano está entre 1 y 2 millones, entre 1 y 1,5 millones, entre 0,5 y 1 millón, entre 0,5 y 2 millones, o entre 0,9 y 1,4 millones.

En algunas realizaciones de las composiciones de hialuronano proporcionadas en la presente, la mayoría del hialuronano presente en la composición se encuentra dentro del intervalo de peso molecular promedio proporcionado en la presente. Así, por ejemplo, en composiciones con un peso molecular promedio de hialuronano de entre 0,2 y 2 millones, al menos el 95% del hialuronano presente en la composición se encuentra está dentro del intervalo de entre 0,2 y 2 millones. En algunas realizaciones, al menos el 50% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio. En algunas realizaciones, al menos el 60% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio. En algunas realizaciones, al menos el 70% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio. En algunas realizaciones, al menos el 80% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio. En algunas realizaciones, al menos el 90% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio. En algunas realizaciones, al menos el 95% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio. En algunas realizaciones, al menos el 98% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio. En algunas realizaciones, al menos el 99% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio. En algunas realizaciones, al menos el 99,9% del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentra dentro del intervalo mencionado de peso molecular promedio.

II. Fuentes de hialuronano

El hialuronano usado en las composiciones y métodos proporcionados en la presente se puede obtener de cualquier fuente. En general, el hialuronano tiene la misma estructura química, independientemente de su origen (por ejemplo, cresta de pollo o gallo, pared de células humanas o bacterianas). El hialuronano se puede obtener, por ejemplo, a partir de crestas de pollo o de gallo, de las paredes de las células bacterianas y de tejido humano (humor vítreo del ojo, líquido sinovial de las articulaciones, etc.). En algunas realizaciones, el hialuronano se aísla de las crestas de pollo. En algunas realizaciones, el hialuronano se aísla de tejido humano, por ejemplo, cordón umbilical, humor vítreo del ojo, líquido sinovial de las articulaciones. En algunas realizaciones, el hialuronano se aísla de un cultivo celular. En algunas realizaciones, el hialuronano se aísla de las paredes de las células bacterianas. El aislamiento de hialuronano de diversas fuentes es conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, la recolección y purificación de hialuronano de crestas de gallo se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.141.973, mientras que la recolección y purificación de hialuronano a partir de fuentes bacterianas se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.517.295. En algunas realizaciones, el hialuronano se purifica y se recoge en una solución con NaCl 0,15 M a un pH de 6-8. Generalmente, el hialuronano obtenido de las diversas fuentes estará libre de proteínas o glicosaminoglicanos distintos del hialuronano.

En algunas realizaciones, el hialuronano aislado se purifica aún más para obtener hialuronano con un intervalo de peso molecular promedio deseado (por ejemplo, mediante cromatografía en columna). Los expertos en la técnica conocen métodos para purificar hialuronano con un intervalo de peso molecular promedio deseado.

En un aspecto, el hialuronano con alta elasticidad descrito en la presente es hialuronano sin modificar. Sin embargo, debe apreciarse que en algunas realizaciones, el hialuronano puede modificarse químicamente. Por ejemplo, el hialuronano puede modificarse químicamente para aumentar la elasticidad del hialuronano.

III. Esterilización de las composiciones de hialuronano de la invención

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención son estériles. Una "composición estéril", como se usa en la presente, se refiere a una composición que es segura para administrarse a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. Por lo tanto, una composición estéril solo tendrá un número mínimo de agentes que pueden causar efectos secundarios no deseados, como una respuesta inmune no deseada, por ejemplo, inflamación o infección.

Los métodos para esterilizar composiciones de hialuronano son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, esterilización por calor o vapor, por ejemplo, por autoclave. En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención se esterilizan calentando las composiciones. En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención se esterilizan incluyendo la composición de HA en una jeringa y esterilizando en autoclave la

jeringa que contiene HA a 131°C durante 2 minutos o 121°C durante 15 minutos seguido de un enfriamiento inmediato.

IV. Componentes adicionales para las composiciones de hialuronano de la invención

5 Las composiciones de HA de la invención pueden incluir componentes adicionales que pueden estabilizar el hialuronano y/o hacer que la composición sea más adecuada para la administración a un sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención pueden incluir un tampón. Se agregan tampones para permitir un pH estable. Los tampones adecuados para su uso en la presente invención incluyen tampones fosfato y tampones bicarbonato. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón tris-fosfato. En algunas realizaciones, el tampón está presente en una concentración de entre 1 mM y 100 mM, entre 2 mM y 50 mM, o entre 5 mM y 20 mM. En algunas realizaciones, la concentración de tampón es menor que 1 mM. En algunas realizaciones, la concentración de tampón es más de 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración de tampón es 10 mM. Debe apreciarse que la concentración de tampón depende de la naturaleza del tampón que se está utilizando. En algunas realizaciones, el pH de la composición está entre pH 7 y pH 9 o entre pH 7,5 y pH 8,5. En algunas realizaciones, el pH de la composición es 8,0. En algunas realizaciones, el pH de la composición es 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la composición es 8,5. Si es necesario, se puede agregar un ácido (como HCl) o una base (como NaOH) a la composición para alcanzar el pH deseado.

20 En algunas realizaciones, las composiciones de hialuronano incluyen un tampón, por ejemplo, un tampón fisiológicamente compatible, pero no incluyen ningún componente adicional.

En algunas realizaciones, la composición incluye un excipiente estabilizador, como ácido carboxílico o una sal del mismo. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido monocarboxílico y/o una sal del mismo. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido glucónico y/o gluconato de sodio. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido dicarboxílico y/o una sal del mismo. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido cítrico, ácido succínico, ácido malónico, ácido maleico, ácido tartárico y/o una sal de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido carboxílico es citrato de sodio. En algunas realizaciones, la composición incluye un coadyuvante tricarboxílico y/o una sal del mismo. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido nitrilotriacético y/o ácido nitrilotriacético sódico. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido tetracarboxílico y/o una sal del mismo. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y/o EDTA sódico. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido pentacarboxílico y/o una sal del mismo. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y/o DTPA sódico. Los ácidos carboxílicos adecuados incluyen, pero no se limitan a compuestos de citrato, tales como citrato de sodio; compuestos de tartrato, compuestos de succinato y EDTA. Kaushil *et al.*, en Protein Science, 1999, 8:222-233 y Busby *et al.*, en Journal of Biological Chemistry, volumen 256, n.º 23, pp. 12140-12110-12147 describen ácidos carboxílicos y sus usos. En algunas realizaciones, el excipiente estabilizador tiene una concentración de entre 50 y 600 mM, entre 250 y 500 mM o entre 250 y 350 mM. En algunas realizaciones, la concentración del excipiente estabilizador es 300 mM. En algunas realizaciones, la concentración del excipiente estabilizador es menor que 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración del excipiente estabilizador es más de 600 mM.

En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención incluyen un azúcar (por ejemplo, un azúcar disacárido). Los azúcares disacáridos que se pueden añadir a la composición incluyen, entre otros, sacarosa, lactulosa, lactosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, dextrosa y dextrano. En algunas realizaciones, el azúcar está presente entre 0,5 y 5% (en peso/volumen). En algunas realizaciones, el azúcar está presente entre el 1 y el 2% (en peso/volumen). En una realización, el azúcar está presente al 1%. En algunas realizaciones, el azúcar está presente en menos del 1% (en peso/volumen). En algunas realizaciones, el azúcar está presente en más del 5% (en peso/volumen). En una realización, el azúcar es sacarosa o trehalosa y está presente al 1% (en peso/volumen).

En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención incluyen sales. Las sales que pueden usarse en las composiciones incluyen cloruro de sodio y otras sales fisiológicamente compatibles. En algunas realizaciones, la concentración de sal está entre 10 mM y 250 mM, entre 25 mM y 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal es 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal es menor de 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal es superior a 250 mM.

En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención incluyen uno o más antioxidantes. Los antioxidantes son sustancias capaces de inhibir la oxidación al eliminar los radicales libres de la solución. Los antioxidantes son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como ácido ascórbico, derivados del ácido ascórbico (por ejemplo, palmitato de ascorbilo, estearato de ascorbilo, ascorbato de sodio o ascorbato de calcio), hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, galato de alquilo, metabisulfito de sodio, bisulfito de sodio, ditionito de sodio, ácido tioglicólico de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, tocoferol y sus derivados (d-alfa tocoferol, acetato de d-alfa tocoferol, succinato de d-alfa tocoferol, beta tocoferol, delta tocoferol, gamma tocoferol y d-alfa tocoferol polioxietilenglicol 1000 succinato), monotioglicerol y sulfito de sodio. Estos materiales se añaden típicamente en intervalos de 0,01 a 2,0%.

En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención incluyen uno o más agentes de isotonicidad. Este término se usa en la técnica de manera intercambiable con agente isoosmótico, y se conoce como un compuesto que se puede agregar a una preparación farmacéutica para aumentar la presión osmótica, tal como una presión osmótica de una solución de cloruro de sodio al 0,9%, que es isoosmótico con fluidos extracelulares humanos, como el plasma. Los agentes de isotonicidad preferidos para usar en las composiciones de la invención incluyen cloruro de sodio, manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa y glicerol.

En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención incluyen uno o más conservantes. Los conservantes adecuados incluyen pero no se limitan a: clorobutanol (0,3-0,9% en p/v), parabenos (0,01-5,0%), timerosal (0,004-0,2%), alcohol bencílico (0,5-5%), fenol (0,1-1,0 %), y similares.

En algunas realizaciones, la composición incluye uno o más componentes que minimizan los efectos secundarios no deseados durante la inyección de la composición.

V. Kits y artículos de fabricación que comprenden las composiciones de hialuronano de la invención

También dentro del alcance de la presente invención están los kits que comprenden las composiciones de HA de la invención e instrucciones de uso. El término "kit", como se usa en la presente, se refiere a un producto empaquetado que comprende componentes con los que administrar la composición de HA de la invención para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, el dolor articular. El kit comprende preferiblemente una caja o recipiente que contiene los componentes del kit. A la caja o recipiente se le adhiere una etiqueta o un protocolo aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos. La caja o recipiente contiene componentes de la invención que preferiblemente están contenidos en recipientes de plástico, polietileno, polipropileno, etileno o propileno. Los recipientes pueden ser tubos con tapón o botellas. El kit también puede incluir instrucciones para administrar una composición de HA de la invención.

El kit puede contener además otros reactivos y/o medicamentos adicionales, como medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o suplementos nutricionales, por ejemplo, suplementos que comprenden glucosamina y/o sulfatos de condroitina. Los ejemplos no limitantes de AINE incluyen aspirina, diflunisal, salsalato, trisalicilato de colina magnesio, ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, fenoprefeno, cetoprofeno, dexcetoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, loxoprofeno, indometacina, tolmetina, sulindaco, etodolaco, ceterolaco, diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam, isoxicam, ácido melfenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido folfenámico, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib, lumiracoxib, etoricoxib, firocoxib, nimelsufuro o licofelona. Los kits suelen incluir una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier escritura o material grabado suministrado en el kit o con el kit, o que de otro modo acompañe al kit.

La invención también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con una composición de la invención. En una realización, un recipiente relleno con una composición de la invención es una jeringa precargada. En una realización específica, las composiciones de la invención se formulan en viales de dosis única como un líquido estéril. Opcionalmente, asociado con dicho(s) recipiente(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, y este aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración a seres humanos.

En una realización, un recipiente relleno con una composición de la invención es una jeringa precargada. Se puede utilizar cualquier jeringa precargada conocida por un experto en la técnica en combinación con una composición de la invención. Las jeringas precargadas que pueden usarse se describen, por ejemplo, pero sin limitarse a las publicaciones PCT WO05032627, WO08094984, WO9945985, WO03077976, las patentes de EE. UU. n.ºs US6792743, US5607400, US5893842, US7081107, US7041087, US5989227, US6807797, US6142976, US5899889, las publicaciones de patentes de EE. UU. US20070161961A1, US20050075611A1, US20070092487A1, US20040267194A1, US20060129108A1. Las jeringas precargadas pueden estar hechas de varios materiales. En una realización, una jeringa precargada es una jeringa de vidrio. En otra realización, una jeringa precargada es una jeringa de plástico. Un experto en la técnica comprenderá que la naturaleza y/o la calidad de los materiales utilizados para fabricar la jeringa pueden influir en la estabilidad de una composición de HA almacenada en la jeringa. En una realización, una jeringa precargada comprende un lubricante a base de silicona. En una realización, una jeringa precargada comprende silicona horneada. En otra realización, una jeringa precargada está libre de lubricantes a base de silicona. Un experto en la técnica también entenderá que pequeñas cantidades de elementos contaminantes que se filtran en la formulación desde el cuerpo de la jeringa, el capuchón de la punta de la jeringa, el émbolo o el tapón también pueden influir en la estabilidad de la composición. Por ejemplo, se entiende que el wolframio introducido durante el proceso de fabricación puede afectar negativamente a la estabilidad de la formulación. En una realización, una jeringa precargada puede comprender wolframio a un nivel superior a 500 ppb. En otra realización, una jeringa precargada es una jeringa de bajo contenido de wolframio. En otra realización, una jeringa precargada puede comprender wolframio a un nivel entre aproximadamente 500 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 400 ppb y

aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 300 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 200 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 100 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 50 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 25 ppb y aproximadamente 10 ppb.

La presente invención también abarca un producto farmacéutico terminado, envasado y etiquetado. Este artículo de fabricación incluye la forma de dosificación unitaria apropiada en un recipiente o depósito apropiado, tal como un vial de vidrio, una jeringa precargada u otro recipiente que esté sellado herméticamente. En una realización, la forma de dosificación unitaria se proporciona como una composición de HA libre de partículas estéril que es adecuada para la administración parenteral, por ejemplo, una inyección en la rodilla o articulaciones axiales y apendiculares.

Como ocurre con cualquier producto farmacéutico, el material de envasado y el recipiente están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y envío. Además, los productos de la invención incluyen instrucciones de uso u otro material informativo que aconsejen al médico, técnico o paciente sobre cómo prevenir o tratar adecuadamente la enfermedad o trastorno en cuestión, así como cómo y con qué frecuencia administrar el fármaco. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o sugieren un régimen de dosificación que incluye, entre otros, dosis reales, procedimientos de control y otra información de control.

VI. Métodos de tratamiento que utilizan las composiciones de hialuronano de la invención

La presente invención también proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en métodos de tratamiento, reducción o prevención de al menos un síntoma asociado con la disfunción articular. Los métodos incluyen administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención, de manera que se trate, reduzca o prevenga dicho al menos un síntoma asociado con la disfunción articular. En otras realizaciones, la presente invención también proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en métodos para tratar o prevenir la osteoartritis, incluyendo dichos métodos la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención, de modo que se trate o prevenga la osteoartritis. En algunas realizaciones, la presente invención también proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en métodos para mejorar la función articular.

Un tratamiento o efecto preventivo es evidente cuando hay una mejora estadísticamente significativa en uno o más parámetros del estado de la enfermedad o un trastorno patológico, por ejemplo, al menos un síntoma asociado con la disfunción articular, como el dolor de la osteoartritis. Un tratamiento o efecto preventivo también es evidente por la incapacidad de empeorar o de desarrollar síntomas cuando, por lo demás, esto se preveía. Como ejemplo, un cambio favorable de al menos el 10% en un parámetro medible de la enfermedad, y preferiblemente al menos el 20%, 30%, 40%, 50% o más puede ser indicativo de un tratamiento eficaz. El término “prevenir”, como se usa en la presente, comprende, por ejemplo, la prevención de la reaparición de al menos un síntoma asociado con la disfunción articular, por ejemplo, dolor de osteoartritis, en un sujeto que previamente ha experimentado dicho al menos un síntoma.

En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano, un mamífero, por ejemplo, un gato, un perro, un animal de granja (como una vaca, una oveja, un caballo, un burro) o un roedor. En una realización específica, el sujeto es un ser humano. En otra realización específica, el sujeto es un caballo, como un caballo de carreras, o un perro.

En algunas realizaciones, dicho “al menos un síntoma asociado con la disfunción articular” puede ser causado, por ejemplo, por un trastorno patológico. Los ejemplos no limitantes de tales trastornos patológicos incluyen osteoartritis, artritis reumatoide, fibromialgia, infección o inflamación de la articulación. Dicho al menos un síntoma asociado con la disfunción articular también puede ser causado por un procedimiento médico, como artroscopia, ortoplastia, lesión o inmovilización prolongada. En algunas realizaciones, dicho al menos un síntoma asociado con la disfunción articular es el dolor o la movilidad reducida de la articulación.

Como se usa en la presente, la expresión “reducir al menos un síntoma” comprende disminuir, mejorar o eliminar al menos un síntoma asociado con la disfunción articular, como el dolor o la movilidad reducida. Esta expresión también comprende reducir el número total de impulsos nerviosos evocados por el movimiento, o reducir el número medio de impulsos por movimiento, en articulaciones intactas o inflamadas después de administrar una composición de HA de la invención. Esta expresión también comprende reducir el grado de activación de los canales iónicos, tales como los canales TRPV1, que están implicados en el proceso de transducción del dolor en las neuronas, tras la administración de una composición de HA de la invención. Se puede medir la activación de tales canales, por ejemplo, midiendo el cambio de Ca^{2+} intracelular en neuronas después de un impulso nociceptivo, o midiendo las corrientes de células completas en neuronas, tras administrar una composición de HA de la invención. Además, la expresión “reducir al menos un síntoma” también comprende disminuir la activación nociceptiva de las neuronas en las articulaciones inflamadas tras la administración de una composición de HA de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención son más efectivas para reducir al menos un síntoma asociado con la disfunción articular que otras composiciones de HA,

por ejemplo, otras composiciones de HA que están actualmente disponibles comercialmente, como Synvisc®. En algunas realizaciones, las composiciones de HA de la invención pueden reducir al menos un síntoma asociado con la disfunción articular en aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 25%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 35%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 45%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 55%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 75%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95% o aproximadamente un 96%, 97%, 98% o 99%.

- 10 En algunas realizaciones, los métodos para reducir al menos un síntoma asociado con la disfunción articular comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención. El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en la presente, pretende incluir una cantidad de una composición de HA de la invención que, cuando se administra a un sujeto que lo necesita, es suficiente para tratar, prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la disfunción articular o es suficiente para tratar o prevenir la osteoartritis. Un experto en la técnica, por ejemplo, un médico, será capaz de determinar fácilmente la cantidad de composición de HA que sería terapéuticamente eficaz. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición está entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 420 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 490 mg o aproximadamente 500 mg.

- 35 En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de HA de la invención es suficiente para lograr una concentración eficaz de HA dentro de la articulación de la rodilla o en otras articulaciones axiales o apendiculares. En consecuencia, la cantidad eficaz de HA es suficiente para lograr una concentración de HA intraarticular superior al 3%, por ejemplo, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10% o más del 10%.

- 40 Al llevar a cabo los métodos descritos actualmente, las composiciones de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía de administración que un experto en la técnica determine que es adecuada. En una realización, las composiciones de la invención se administran por vía parenteral. En una realización específica, las composiciones de HA de la invención pueden administrarse mediante una inyección, por ejemplo, mediante inyección intraarticular. En algunas realizaciones, un régimen de tratamiento puede comprender una única inyección intraarticular. En otras realizaciones, un régimen de tratamiento puede comprender múltiples inyecciones intraarticulares, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más de 10 inyecciones. Un experto en la técnica podrá determinar el régimen de tratamiento apropiado y la programación de las composiciones de HA de la invención para cada sujeto.

- 50 En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente, las composiciones se administrarán como una única inyección intraarticular o en múltiples inyecciones, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 inyecciones. En general, se administrarán de 2-6 ml de composición de hialuronano a una concentración del 4%. Sin embargo, debe apreciarse que los volúmenes de composición administrados pueden ser de mayor volumen y/o mayor concentración. Por tanto, en algunas realizaciones, el volumen de la composición de hialuronano administrado es de al menos 0,1 ml, al menos 0,5 ml, al menos 1 ml, al menos 2 ml, al menos 3 ml, al menos 4 ml, al menos 5 ml, al menos 6 ml, al menos 7 ml, al menos 8 ml, al menos 9 ml, al menos 10 ml, al menos 11 ml, al menos 12 ml, al menos 13 ml, al menos 14 ml, al menos 15 ml, al menos 16 ml, al menos 17 ml, al menos 18 ml, al menos 19 ml, al menos 20 ml, al menos 30 ml o más. En algunas realizaciones, la composición de hialuronano administrada está entre 1-30 ml, entre 2-20 ml, entre 2-10 ml, entre 2-8 ml, entre 3-6 ml o entre 4 y 5 ml.

- 60 En algunas realizaciones, el volumen de una composición de HA de la invención administrada a un sujeto es suficiente para rellenar una cavidad en la articulación del sujeto, por ejemplo, la rodilla, el codo, la cadera u otra articulación apendicular o axial. El volumen de la composición de HA también es suficiente para revestir la membrana sinovial de la articulación del sujeto. En determinadas realizaciones, el volumen de la composición de HA de la invención administrada a un sujeto es suficiente para evitar la dilución de la composición de HA por el fluido dentro de la articulación. Por ejemplo, el volumen de la composición de HA de la invención es suficiente para mantener una concentración de HA del 3% o más, por ejemplo, 4%, en la articulación del sujeto.

En ciertas realizaciones, el volumen de las composiciones de HA de la invención administradas a un sujeto que las necesita es suficiente para mejorar la función articular, por ejemplo, suficiente para reducir el dolor en las articulaciones, pero sigue siendo lo suficientemente pequeño como para evitar la acumulación de presión atmosférica positiva dentro de la articulación.

En un aspecto, la invención proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en métodos para mejorar la función articular (por ejemplo, articulación de rodilla, codo, cadera, hombro u otras articulaciones axiales y apendiculares). Mejorar la función articular, como se usa en la presente, se refiere tanto a la mejora de la función mecánica (por ejemplo, la capacidad de utilizar la articulación, por ejemplo, al caminar, correr y el uso de las manos), y la capacidad de reducir los efectos secundarios no deseados (por ejemplo, dolor) asociados con la función articular. En un aspecto, la descripción proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en un método para reducir el dolor asociado con la función articular. Sin embargo, debe apreciarse que la mejora de la función articular no se limita a la mejora de la función mecánica y la reducción del dolor. Cualquier mejora en la función articular, como una reducción de la inflamación o una reducción de la hinchazón, está incluida en los métodos actuales.

En un aspecto, la invención proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en métodos para tratar la osteoartritis. La osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa de las articulaciones caracterizada por un grupo de anomalías mecánicas que implican la degradación de las articulaciones, incluido el cartilago articular y el hueso subcondral. Los síntomas asociados con la osteoartritis incluyen dolor en las articulaciones, sensibilidad, rigidez, bloqueo. La osteoartritis puede afectar cualquier articulación del cuerpo. Las articulaciones más comúnmente afectadas son manos, pies, columna, cadera y rodilla. El tratamiento de la osteoartritis, como se usa en la presente, se refiere tanto a la mejora de la función mecánica de la articulación afectada (por ejemplo, la capacidad de utilizar la articulación, por ejemplo, al caminar, correr y el uso de las manos), y la capacidad de reducir el dolor de la articulación afectada.

En un aspecto, la presente invención proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en métodos para mejorar la función mecánica de la articulación. En un aspecto, la descripción proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en métodos para mejorar la funcionalidad de una articulación afectada con osteoartritis. En un aspecto, los métodos para mejorar la función articular y la funcionalidad de una articulación afectada con osteoartritis comprenden introducir mediante inyección en una articulación una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención, por ejemplo, una composición que comprende hialuronano caracterizada por una alta elasticidad. La mejora en la función articular y la mejora en la funcionalidad se pueden evaluar en relación con la funcionalidad antes del tratamiento o en comparación con un sujeto que no está recibiendo el tratamiento. En algunas realizaciones, la mejora en la funcionalidad se mide por referencia a una línea de base de funcionalidad experimentada por el sujeto antes de ser tratado con las composiciones proporcionadas en la presente. Por ejemplo, en una realización, el sujeto puede experimentar una mejora en la funcionalidad basada en la función KOOS (Knee and Osteoarthritis Outcome Score) en la vida diaria (ver, por ejemplo, Roos *et al.*, J. Orthop. Deportes. Phys. Ther. (1998), 28: 22-96). En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente, el sujeto puede experimentar un cambio de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 puntos desde la línea de base según la función KOOS en la vida diaria antes de recibir tratamiento. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente, el sujeto puede experimentar un cambio de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 puntos desde la línea de base según la función KOOS en la vida diaria en comparación con un sujeto que no recibe tratamiento.

En algunas realizaciones, el sujeto puede experimentar una mejora en la función medida por la subescala de función WOMAC (índice de osteoartritis de las universidades de Western Ontario y MacMaster) (ver, por ejemplo, Bellamy *et al.*, Ann. Reuma. Dis. (2005), 64: 881-885). En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente, el sujeto puede experimentar al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de mejora en la función desde la línea de base en según la subescala de función WOMAC antes de recibir tratamiento. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente, el sujeto puede experimentar al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de mejora en la función desde la línea de base según la subescala de la función WOMAC en comparación con un sujeto que no recibe tratamiento.

En algunas realizaciones, la mejora en la funcionalidad articular puede evaluarse usando un cuestionario con la escala Likert de 5 puntos.

En un aspecto, la presente invención proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en un método para reducir el dolor asociado con la función articular. En otro aspecto, la presente invención proporciona las composiciones reivindicadas para su uso en un método para reducir el dolor asociado con la osteoartritis. En algunas realizaciones, la reducción del dolor se mide por referencia a una línea de base del dolor experimentado por un sujeto antes de ser tratado con una de las composiciones proporcionadas en la presente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el paciente experimenta una reducción del dolor basada en la puntuación de la subescala de dolor KOOS (Knee and Osteoarthritis Outcome Score) comúnmente conocida que cuantifica la experiencia de

dolor de un sujeto en función de una gama conocida de factores (ver, por ejemplo, Roos *et al.*, J. Orthop. Deportes. Phys. Ther. (1998), 28: 22-96). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sujeto puede experimentar al menos un cambio de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 puntos desde la línea de base según la subescala de dolor KOOS antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto puede experimentar al menos un cambio de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 puntos desde la línea de base según la subescala de dolor KOOS en comparación con un sujeto que no recibe tratamiento.

En algunas realizaciones, el sujeto puede experimentar una reducción del dolor medida por la subescala de dolor WOMAC (índice de osteoartritis de las universidades de Western Ontario y MacMaster) (ver, por ejemplo, Bellamy *et al.*, Ann. Reuma. Dis. (2005), 64: 881-885). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sujeto puede experimentar al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de reducción del dolor desde la línea de base según la subescala de dolor WOMAC antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto puede experimentar al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de reducción del dolor desde la línea de base según la subescala de dolor WOMAC en comparación con un sujeto que no recibe tratamiento.

En algunas realizaciones, la reducción del dolor en un sujeto puede evaluarse usando un cuestionario con la escala Likert de 5 puntos.

Los métodos descritos en la presente abarcan una variedad de regímenes de tratamiento. Por ejemplo, un sujeto puede recibir una primera dosis de las composiciones de hialuronano descritas en la presente seguida de dosis adicionales. En algunas realizaciones, se administra una primera dosis seguida de una segunda dosis en un intervalo específico. En algunas realizaciones, la segunda dosis se administra aproximadamente 30 días, aproximadamente 60 días, aproximadamente 90 días, aproximadamente 120 días, aproximadamente 150 días, aproximadamente 180 días, aproximadamente 210 días, aproximadamente 240 días, aproximadamente 270 días, aproximadamente 300 días, aproximadamente 330 días, o aproximadamente 360 días después de la primera dosis. Debe apreciarse que el régimen de dosis puede ajustarse basándose en la mejora de la funcionalidad y/o la reducción del dolor experimentado por el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto recibirá una dosis cada mes, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada cinco meses, cada seis meses, cada siete meses, cada ocho meses, cada nueve meses, cada diez meses, cada once meses, o cada doce meses. En algunas realizaciones, una dosis se administra como una inyección/inyecciones intraarticulares únicas o múltiples.

En un aspecto, las composiciones descritas en la presente se administran directamente a las articulaciones patológicas. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar directamente a la articulación de la rodilla, articulación de la cadera, articulación del dedo o del pulgar, articulación del dedo del pie, articulación del tobillo, articulación de la muñeca, articulación del hombro, articulación del codo o articulaciones de la columna. En algunas realizaciones, las composiciones se administran a la articulación de la rodilla. En algunas realizaciones, las composiciones se administran a la articulación del hombro. En algunas realizaciones, las composiciones se administran a la articulación de la cadera. En algunas realizaciones, las composiciones se administran a una articulación de la pierna o del brazo. En algunas realizaciones, las composiciones se administran en una articulación de la pierna o el brazo, distinta de la articulación de la rodilla, el hombro o la cadera, o en una articulación axial o apendicular. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en la presente, la articulación es una articulación del esqueleto axial. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en la presente, la articulación es la articulación temporomandibular o craneal.

En un aspecto, las composiciones se administran introduciendo mediante inyección en una articulación una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición. En algunas realizaciones, las composiciones se administran mediante inyección intraarticular. En algunas realizaciones, las composiciones se administran mediante inyección a través de una jeringa y una aguja. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía tópica en el sitio de la articulación. En algunas realizaciones, las composiciones se administran de forma periarticular.

La presente invención se ilustra más a fondo mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, el hialuronano utilizado en las composiciones descritas en la presente se obtiene de fuentes animales, humanas o bacterianas. A menos que se indique lo contrario, las composiciones utilizadas en la presente están en tampones fisiológicos.

Ejemplo 1: Propiedades elásticas de las composiciones de HA de la invención

El propósito de este experimento fue investigar las propiedades elásticas de los productos de hialuronano (HA) disponibles comercialmente de las composiciones de HA de la invención. El HA utilizado en la preparación se obtuvo a partir de una fuente de pared celular bacteriana y tenía un peso molecular promedio de 1-2 millones. Las composiciones se prepararon en solución salina fisiológica (NaCl 8,47 g/l) o una solución de tampón fosfato

(NaCl 8,47 g/l, NaH₂PO₄·H₂O 0,047 g/l, Na₂PO₄ 0,213 g/l) con pH de 5,5-7,5. Si las muestras se esterilizaron por calor después de la preparación, el ciclo de autoclave utilizado fue de 121 ° C durante 15 minutos o 131 ° C durante 2 minutos con enfriamiento rápido del material inmediatamente después del ciclo.

Las mediciones de las propiedades elásticas de las muestras de HA se realizaron en un reómetro de investigación de alta resolución Stresstech de Reologica Instruments AB, Inc. usando el software RheoExplorer versión 5.0.40.9. Se realizó una prueba de oscilación de barrido de frecuencia y se determinó el módulo elástico (G'). Las frecuencias de interés oscilan entre 0,1 y 10 hercios (Hz o ciclos/s) que corresponden al grado de movimiento o tensión en la articulación de la rodilla humana al estar de pie, caminar, correr y saltar.

La tabla 1 a continuación muestra la concentración de HA y el peso molecular promedio en productos comerciales de HA seleccionados para la viscosuplementación.

Tabla 1. Concentraciones de HA y pesos moleculares promedio para productos comerciales de HA

Producto	Fabricante	PM promedio de HA	Concentración de HA
Synvisc®	Sanofi	5 millones	0,8% (8 mg/ml)
Synvisc® One	Sanofi	5 millones	0,8% (8 mg/ml)
Euflexxa®	Ferring Pharmaceuticals	3 millones	1% (10 mg/ml)
Supartz®	Seikagaku Corp.	1 millón	1% (10 mg/ml)
Gel-One®	Seikagaku Corp.	1 millón (antes de la reticulación)	1% (10 mg/ml)
Hyalgan®	Fidia Pharma	0,6 millones	1% (10 mg/ml)
Orthovisc®	Anika Therapeutics, Inc.	2 millones	1,5% (15 mg/ml)
Monovisc®	Anika Therapeutics, Inc.	1-2,9 millones	2,2% (22 mg/ml)
Synocrom®	Chroma-Pharma GmbH	1,6 millones	1% (10 mg/ml)
Synocrom® Mini	Chroma-Pharma GmbH	1,6 millones	1% (10 mg/ml)
Synocrom® Forte	Chroma-Pharma GmbH	2,1 millones	2% (20 mg/ml)
Synocrom® Forte One	Chroma-Pharma GmbH	2,1 millones	2% (20 mg/ml)
Synolis V-A	Anteis	2 millones	2% (20 mg/ml)

Las propiedades elásticas de productos de HA seleccionados disponibles comercialmente para la viscosuplementación se evaluaron midiendo el módulo elástico (G') en frecuencias comprendidas entre 0,1 y 10 hercios (Hz o ciclos/s). Las articulaciones operan a frecuencias que van de 0,1 a 7 Hz, con frecuencias que determinan la fuerza que experimentan las superficies de las articulaciones al pararse, caminar, correr y saltar. El comportamiento elástico de HA en este intervalo de frecuencia determina la transmisión de fuerzas mecánicas a ambas superficies articulares en la articulación de la rodilla. La tabla 2 a continuación muestra los valores medidos de G' (en pascales) a diversas frecuencias en cinco productos comerciales de HA, y la figura 1, panel A muestra los mismos datos en un formato de gráfico.

Tabla 2. Valores de G' (en pascales) para productos comerciales de HA

Frecuencia (Hz)	Orthovisc®	Synvisc®	Euflexxa®	Supartz®	Hyalgan®
7	188	131	117	30	6
5	170	125	109	10	12
2	156	120	103	21	2,0
1	117	106	84	10	0,5
0,5	64	80	56	2	0,08
0,1	22	49	30	N/A	N/A

La tabla 3 a continuación muestra los valores medidos de G' (en pascales) a diversas frecuencias en varias composiciones inventivas, y la figura 1, panel B muestra los mismos datos en un formato de gráfico.

Tabla 3. Valores de G' (en pascles) para composiciones de la invención

	Concentración de HA				
Frecuencia (Hz)	2,0%	3,5%	4,5%	6,5%	8,9%
7	423	1,020	2,142	4,898	6,920
5	394	957	2,003	4,623	6,530
2	315	788	1,691	4,029	5,850
1	232	604	1,356	3,376	5,010
0,7	193	515	1,189	3,021	4,550
0,5	157	435	1,025	2,678	4,110
0,1	54	168	459	1,368	2,290

La tabla 4 a continuación muestra la comparación de los valores de G' para productos comerciales de HA seleccionados y composiciones de HA seleccionadas de la invención.

5 *Tabla 4. Comparación de los valores de G' a diferentes frecuencias para productos comerciales de HA y composiciones de HA de la invención*

Productos comerciales de HA	Caminar, 0,5 Hz	Correr, 2,5 Hz	Saltar, 5 Hz
Orthovisc®	64	160	170
Synvisc®	80	125	125
Euflexxa®	56	110	109
Supartz®	2	22	10
Hyalgan®	0,08	3	2
Composiciones inventivas			
Concentración de HA			
3,5%	433	800	957
4,5%	1,025	1,700	2,005
6,5%	2,678	4,100	4,600
8,9%	4,110	6,000	6,530

10 Como puede verse a partir de los datos, las composiciones de la invención se caracterizan por valores de G' mucho más altos que cualquiera de los productos comerciales de HA probados. Los valores de G' de las composiciones de HA reflejan la capacidad de las moléculas de HA para actuar como un amortiguador de choque molecular enrollado y comportarse como un sólido elástico.

15 Ejemplo 2. Efectos analgésicos *in vivo* de las composiciones de HA de la invención

15 Los filamentos nerviosos delgados del nervio safeno de ratas Wistar macho adultas se diseccionaron y se colocaron sobre un electrodo de alambre de plata y se evaluaron los impulsos nerviosos en las fibras nerviosas del dolor provocados por estimulación mecánica. Las articulaciones se rotaron para reproducir el movimiento inocuo (dentro del intervalo de trabajo de la articulación) y el movimiento nocivo (que excede el intervalo de trabajo de la articulación). Las rotaciones que incluían un movimiento inocuo seguido de un movimiento nocivo, es decir, un ciclo de movimiento, se repitieron cada 5 minutos durante la duración del experimento. La actividad nerviosa se analizó contando por separado el número de impulsos nerviosos durante los componentes inocuos y nocivos de cada ciclo de movimiento individual. Se sumaron los números de impulsos nerviosos evocados por cada componente (no nocivos y nocivos) para obtener el número total de impulsos del ciclo de movimiento en cada momento.

30 El experimento se llevó a cabo para probar los efectos analgésicos de composiciones que contienen HA de diferentes pesos moleculares promedio (de 0,2 a 6 millones) y concentraciones crecientes (de 1% a 6%) sobre receptores del dolor articular de articulaciones intactas e inflamadas. En un grupo de experimentos, se inyectó caolín-carragenano por vía intraarticular en las articulaciones para inducir la inflamación articular. Una hora más tarde, se inyectaron por vía intraarticular soluciones de HA de diferentes concentraciones y peso molecular promedio o control de solución salina, y se determinó la evolución temporal del efecto analgésico. El efecto analgésico se evaluó midiendo los impulsos en las fibras nerviosas de la articulación del dolor durante las 8 horas siguientes a la inyección intraarticular de la sustancia de prueba.

35 La figura 2 resume los resultados. En el panel A se muestra el número promedio de impulsos por movimiento

evocados por un ciclo de movimiento completo repetido cada 5 minutos. Los impulsos se midieron en fibras individuales del nervio articular mediano de articulaciones inflamadas tratadas durante 24 horas con las composiciones de diferentes concentraciones de HA y pesos moleculares promedio, como se indica en el recuadro derecho. Es evidente que las soluciones que contienen HA de un PM promedio de 1,3-1,6 millones o más y en concentraciones del 4% o más son más efectivas para reducir el número de impulsos nerviosos evocados por ciclos de movimiento sucesivos. El panel B muestra el número promedio de impulsos por movimiento en función del peso molecular promedio para composiciones de HA al 4%. Los resultados demuestran una mayor eficacia de las composiciones que tienen un peso molecular promedio de 1 millón o más. El panel C muestra el número promedio de impulsos por movimiento en función de la concentración de HA. Los resultados evidencian que los efectos máximos se obtuvieron con composiciones de HA al 4%. El efecto de la inyección de Synvisc® está marcado por el triángulo negro. El panel D muestra el resumen de los efectos promedio sobre la actividad evocada por el movimiento en articulaciones de rodilla inflamadas 24 horas después del tratamiento con composiciones de HA de diferentes concentraciones y pesos moleculares promedio. HA2 corresponde a HA con un peso molecular promedio de 1,3 millones, proporcionado por Croma-Pharma GmbH. HA1 corresponde a la composición de HA proporcionada por Matrix Biology Institute.

Los resultados presentados en la figura 2 demuestran que las composiciones de HA al 4% con un peso molecular promedio de 1 millón son muy eficaces para reducir el número promedio de impulsos nerviosos en las articulaciones inflamadas y, por tanto, son eficaces para reducir el dolor en las articulaciones inflamadas.

En consecuencia, la actividad del impulso nervioso del dolor evocada por el movimiento en las articulaciones inflamadas es alta y permanece estable durante el período de registro. La inyección de HA al 4%-6%, con un PM promedio de 1,3 millones o más, tuvo un efecto inhibitor pronunciado sobre la actividad de impulsos evocada por el movimiento. Se obtuvo una reducción similar con HA al 6% con PM de 1,6 millones. La reducción de la concentración de HA manteniendo constante el PM o empleando una solución de HA al 4% de PM inferior redujo el efecto inhibitor. También se han representado para su comparación los resultados obtenidos con la solución comercial de HA Synvisc®, que contiene HA al 0,8% con un PM de alrededor de 6 millones. Se puede concluir con seguridad que el HA de un PM promedio superior a 1,3 millones ejerce un poderoso efecto inhibitor sobre la actividad nociceptor articular evocada por el movimiento.

Las figuras 3 y 4 muestran que la composición de HA al 4% afecta tanto a la actividad del impulso nervioso evocada por los componentes inocuos como nocivos del ciclo de movimiento. La figura 3 representa el número de impulsos nerviosos contados durante la parte no nociva del movimiento en articulaciones inflamadas que habían sido inyectadas 24 horas antes con solución salina, HA al 4% o Synvisc®. La figura 4 muestra los datos correspondientes a la parte nociva del ciclo de movimiento. Estos resultados confirman la eficacia de la composición de HA al 4% para reducir la capacidad de respuesta global de las fibras nerviosas del dolor articular a la actividad del dolor evocada por el movimiento.

La figura 5 muestra los efectos a largo plazo de la inyección intraarticular de una composición de HA al 4% sobre la actividad del impulso nervioso. El panel A muestra el número promedio de impulsos por movimiento registrados un día, una semana, dos semanas y tres semanas después del inicio de la inflamación, seguido de una inyección intraarticular de solución salina o composición de HA al 4%. El panel B muestra la diferencia porcentual en el número promedio de impulso/movimiento medido después de la inyección de solución salina y HA al 4%, en los mismos momentos que en el panel A.

El efecto inhibitor de HA al 4% sobre la actividad evocada por el movimiento también se observó en articulaciones intactas. Como se muestra en la figura 6, panel A, el número total de impulsos evocados por el movimiento en animales intactos fue de alrededor de 210 impulsos por ciclo, como lo muestran los datos de la curva superior (círculos en blanco). Cuando se realizó el mismo registro en animales intactos 24 horas después de la inyección de HA al 4%, el número promedio de impulsos evocados por el mismo movimiento fue muy bajo, por debajo de 50 impulsos por ciclo. Esto se muestra en la figura 6, curva inferior (círculos rellenos) y el panel B, que muestra los datos promedio de 7 experimentos. Esto demuestra que los efectos del HA sobre los nociceptores articulares también están presentes en las fibras no sensibilizadas.

Para determinar el momento en el que comienza a desarrollarse el efecto inhibitor de HA, se registró la actividad evocada por el movimiento articular en dos ratas intactas. Después de realizar 6 movimientos a intervalos de 10 minutos, se inyectó por vía intraarticular una composición de HA al 4% (Elastovisc™). Los movimientos se repitieron con el mismo intervalo de tiempo durante las siguientes 8 horas. Como se muestra en la figura 6, panel C, en dos fibras individuales, la actividad evocada por el movimiento aumentó gradualmente durante los primeros 30-60 minutos después de la inyección y luego comenzó a disminuir. Los valores de control se recuperaron aproximadamente a las 3 horas de la inyección y disminuyeron gradualmente durante las siguientes 2 a 3 horas, momento en el que se interrumpió el experimento.

La figura 7 muestra que el efecto inhibitor de HA sobre la actividad evocada por el movimiento depende del volumen total de HA inyectado por vía intraarticular en articulaciones intactas. Cuando el volumen de inyección es de 25 µl, la curva que representa la actividad de impulsos evocada por el movimiento (cuadrados negros) es

similar a la obtenida con la solución salina intraarticular (círculos en blanco). Con 50 μ l (triángulos negros) y 75 μ l (triángulos en blanco), la actividad evocada por el movimiento en las fibras del dolor fue significativamente menor que en el control.

5 Ejemplo 3: Efectos *in vitro* de las composiciones de HA de la invención sobre los canales de iones implicados en la transducción del dolor

Las propiedades reológicas del HA extracelular determinan la eficacia del HA para filtrar la transmisión de energía mecánica a las terminaciones nerviosas del dolor en la articulación y se ven afectadas por los procesos inflamatorios o degenerativos locales. Además, durante la lesión y la inflamación, una gran variedad de mediadores químicos liberados localmente actúan sobre las terminaciones de los nociceptores periféricos causando sensibilización. Sin embargo, existe la posibilidad de que el efecto atenuador de HA sobre el dolor también se deba a una modificación de los mecanismos de transducción y excitación activados por lesión en nociceptores periféricos. Esta modificación estaría asociada a la concentración y el tamaño de las moléculas de HA.

El miembro 1 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial del receptor transitorio (TRPV1) es un canal catiónico no selectivo que desempeña un papel importante en la detección de estímulos nocivos y en los efectos sensibilizantes de los mediadores inflamatorios sobre las terminaciones nerviosas nociceptivas. TRPV1 se comporta como un integrador de estímulos químicos y térmicos endógenos y exógenos nocivos en terminales de nociceptores polimodales. En las articulaciones, TRPV1 se ha relacionado con los efectos inflamatorios causados por mediadores liberados durante la artritis dolorosa sistémica a largo plazo.

El propósito de este experimento fue investigar el efecto de HA sobre la activación de TRPV1, el principal canal iónico involucrado en la transducción del dolor. Se utilizaron dos líneas celulares para los experimentos: la línea celular SH-SY5Y VR1 que fue modificada genéticamente para tener una mayor expresión de TRPV1, y células HEK293 transfectadas con la proteína de fusión TRPV1+ EYFP para inducir la expresión del canal TRPV1 e identificar visualmente las células que contienen los canales TRPV1. Está bien establecido que el calor y la capsaicina abren selectivamente los canales TRPV1, permitiendo la entrada de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en las células, que puede medirse mediante técnicas de formación de imágenes ópticas. Por consiguiente, la excitación de las células corresponde a un aumento transitorio de la fluorescencia celular específica que se registró y midió cuantitativamente. Se midió el cambio en la concentración de calcio intracelular causado por la apertura de los canales TRPV1 en respuesta a estímulos nocivos naturales en células individuales. Después de cargar las células con una sonda de calcio fluorescente (Fura-2AM), las células se estimularon cuatro veces con pulsos de calor cortos y se midió el cambio en los iones de calcio. Definir una respuesta fiable a los estímulos repetidos con calor excluyendo la taquifilaxia (es decir, la reducción de la respuesta a estímulos repetidos) se definieron las características de la respuesta de las células TRPV1 a estímulos repetidos. Se usaron pulsos de calentamiento rápido de la superficie celular hasta 47-48 ° C como estímulo nocivo, se aplicaron durante 30 segundos y se repitieron a intervalos de 10 minutos (ver el ejemplo mostrado en la figura 8, panel A1). Para cuantificar el efecto del estímulo, se midió el cambio en el calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) que se produjo en condiciones controladas en respuesta a un pulso de calentamiento inicial en cada celda, y se promedió la respuesta para un gran número de celdas. Posteriormente se estableció un protocolo de estímulos repetidos a intervalos de tiempo fijos. El 4º pulso se consideró el más estable y la reducción porcentual de su amplitud, en comparación con la amplitud del primer estímulo (tomada como lectura basal del 100%), se consideró que se debía al efecto de la taquifilaxia. Por tanto, la respuesta de las células al 4º pulso se expresó en términos del porcentaje de reducción en la magnitud de la primera respuesta cuando se perfundió con la solución de control.

Se investigaron los efectos de HA sobre los canales TRPV1 expresados por células HEK293 cultivadas con fluorescencia transfectadas con la proteína de fusión TRPV1+ EYFP para inducir la expresión del canal TRPV1 y por neuronas sensoriales primarias del ganglio de la raíz dorsal (DRG) disociadas, midiendo el cambio en el calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ evocado por estímulos nocivos repetidos (calor o aplicación del agonista de TRPV1 capsaicina) antes y después de la perfusión con HA. Para estos estudios se utilizaron composiciones de HA de un PM promedio de 5,6 millones y se prepararon para obtener una solución final que contenía 400 μ g/ml de HA.

Los resultados del experimento se muestran en la figura 8. El panel A1 muestra los aumentos en el calcio intracelular evocados en células HEK-TRPV1-EYFP(+) calentando la solución de baño a 48 ° C, repetido a intervalos de 10 minutos. Los aumentos en el Ca^{2+} citosólico se representan como la relación de las intensidades de fluorescencia de emisión a 340 y 380 nm (F340/380: unidades arbitrarias de fluorescencia). El panel A2 muestra el mismo experimento que en A1, pero con 400 μ g/ml de perfusión de HA que comenzó al final del primer estímulo de calentamiento. El panel A3 muestra la relación de cambio de amplitud promedio entre las respuestas evocadas por pulsos de calor sucesivos (indicados en el eje de abscisas) en solución salina de control (CS, barras negras) y durante la perfusión con HA (barras grises). Es de destacar que la inhibición aparece 20 min después del inicio de la perfusión de HA.

Los paneles B1-B3 muestran los resultados de un experimento que utiliza el mismo protocolo que en A1-A3 pero realizado en las neuronas adultas del DRG. El efecto inhibitor de HA se hace evidente después de 30 minutos

de tratamiento (ver 4º estímulo frente al 1º estímulo).

Los paneles C1-C3 muestran el cambio de calcio intracelular en una célula HEK-TRPV1-EYFP(+) en respuesta a capsaicina 100 nM y carbacol (Cch) 10 µM, en solución salina de control (C1) y bajo exposición a HA iniciada 30 minutos antes (C2). El panel C3 muestra la amplitud promedio de la respuesta a capsaicina (barras negras) y Carbacol (barras rayadas) bajo perfusión con solución salina de control (negro) y en presencia de HA (gris).

Los paneles D1-D2 muestran las respuestas de calcio intracelular de neuronas sensoriales adultas del DRG a capsaicina 100 nM y KCl 30 mM durante la perfusión con solución salina (D1) y con HA (D2). El panel D3 muestra la amplitud promedio de las respuestas del calcio intracelular a la capsaicina (barras negras) o KCl (barras rayadas) en la solución salina de control (negro) y en presencia de HA (gris).

Los resultados de la figura 8 demuestran que después de una exposición de 30 minutos a HA, la respuesta de las células HEK-TRPV1 cultivadas a los pulsos de calor se redujo en un 77% en comparación con las células de control perfundidas con solución salina. En el experimento que utilizó un protocolo idéntico, la respuesta de las neuronas del DRG cultivadas a los pulsos de calor se redujo en un 24% en comparación con el control. Además, un número significativamente menor de células HEK-TRPV1 (63%) respondió con un aumento de calcio intracelular después de la estimulación con capsaicina 100 nM en presencia de HA, siendo la amplitud de la respuesta un 33% menor en comparación con las condiciones de control. Asimismo, el 68% de las neuronas del DRG perfundidas con solución salina respondieron a la capsaicina, mientras que solo el 37% de las neuronas del DRG perfundidas con HA respondieron, reduciéndose la amplitud de la respuesta al 44% del control. En consecuencia, al reducir la excitabilidad de las neuronas, el HA puede reducir eficazmente el dolor.

Se utilizó otra línea celular, SH-SY5Y VR1, para experimentos en los que se estudió el efecto de la concentración de HA sobre las respuestas al calor de TRPV1. La tabla 5 muestra el efecto de HA de PM bajo y alto sobre la respuesta del calcio intracelular al calor en células SH-SY5Y VR1. Los valores de la respuesta al 4º pulso de calentamiento se expresan como porcentaje de la respuesta al primer pulso, bajo con perfusión con solución salina (control) y con HA de bajo PM (PM promedio de 470000 Da) o HA de PM alto (5,2x10⁶ Da) a concentraciones de 200, 400 y 800 µg/ml (n = número total de células medidas en diferentes experimentos para cada concentración; estadística de la t de Student * P < 0,05, ** 0,01 < P < 0,001, *** P < 0,001). Como se muestra en la tabla 5, cuando se aplicaron soluciones de HA de mayor concentración de PM bajo (600000) o alto (5,6 M) a las células SH-SY5Y VR1, su respuesta al calor disminuyó significativamente.

Tabla 5. Efecto de HA de PM bajo y alto sobre la respuesta del calcio intracelular al calor en células SH-SY5Y VR1.

Control	PM bajo	PM alto
51,8 ± 1,6 (n = 510)	200 = 45,3 ± 1,6 (n = 472) *	200 = 22,6 ± 1,2 (n = 353) ***
53,7 ± 0,9 (n = 1119)	400 = 33,7 ± 0,6 (n = 1025) ***	400 = 17,9 ± 0,8 (n = 400) ***
62,2 ± 1,6 (n = 267)	800 = 32,0 ± 0,5 (n = 765) ***	800 = 16,7 ± 0,6 (n = 192) ***

Ejemplo 4: Inhibición *in vitro* de la excitabilidad neuronal por las composiciones de HA de la invención

La inhibición mediada por HA de la estimulación evocada por capsaicina de células HEK-TRPV1 también se investigó registrando corrientes de células completas en células HEK-293-TRPV1-EGFP(+). En la figura 9, el panel A muestra las relaciones I-V de TRPV1 activado con capsaicina 100 nM en solución salina (trazo superior, promedio de n = 19) y en la solución de HA 400 µg/ml (trazo inferior, promedio de n = 18). Las rampas de voltaje fueron de -120 mV a +10 mV, 0,2 Hz, con una pendiente de 0,8 mV/ms mV/s medida a un voltaje de +80 mV. La figura 9, panel B muestra la corriente promedio a +80 mV obtenida de las curvas I-V mostradas en el panel A. En la figura 9, el panel C muestra valores de diferentes parámetros medidos desde las rampas equipadas con una función que combina una conductancia lineal multiplicada por un término de activación de Boltzmann, $I = g \times (V - E_{rev}) / (1 + \exp((V_{1/2} - V)/S))$. En la figura 9, el panel D muestra corrientes de células completas ahora a -60 mV en respuesta a capsaicina 1 µM, en condiciones de control (trazo superior) y en células preincubadas durante 30 minutos y perfundidas continuamente con HA (trazo inferior). En la figura 9, el panel E muestra valores promedio de corrientes pico evocadas por capsaicina a -60 mV en solución salina y en presencia de HA.

Los resultados presentados en la figura 9 demuestran que la capsaicina evoca corrientes de membrana en células HEK-TRPV1 y en neuronas del DRG mediadas por TRPV1. La amplitud máxima de la corriente que fluye a través de los canales TRPV1 y registrada con la técnica de pinza de parche en respuesta a la capsaicina se redujo en un 72% después de la exposición a HA. Este efecto inhibitorio todavía estaba presente a valores fisiológicos de -60 mV del potencial de membrana de las células. También se confirmó que el mecanismo de activación de voltaje y la dependencia del voltaje de TRPV1 no se vieron afectados por HA, aunque la conductancia (g) se redujo en un 47%.

También se investigó la modulación de la actividad de un solo canal de TRPV1 por HA. La disminución observada en las corrientes macroscópicas causada por HA en las células HEK-TRPV1 se exploró midiendo las corrientes de un solo canal antes y después de 30-60 min de exposición a HA. La actividad de un solo canal evocada por capsaicina 0,25 μ M presente en la pipeta se registró en parches unidos a células HEK293-TRPV1-EFYP(+). Los registros se realizaron a +60 mV.

En la figura 10, el panel A muestra un registro de muestra de la actividad de un solo canal de TRPV1 bajo perfusión con solución salina, mientras que el panel B muestra un registro de muestra de la actividad de un solo canal de células incubadas en HA y registradas bajo perfusión con solución de HA. Los recuadros representan histogramas de probabilidad de amplitud de un solo canal de parches registrados bajo solución salina (negro) y después de la exposición a HA (gris). En la figura 10, el panel C muestra las curvas I-V obtenidas en condiciones de control (cuadrados) y después de la exposición a HA (círculos), mientras que el panel D muestra la amplitudes de un solo canal obtenidas de parches individuales, representadas como cuadrados (control) y círculos (tratados con HA). Los símbolos más grandes corresponden a los datos de las medidas realizadas en los trazos mostrados en los paneles A y B. Las barras corresponden a los valores promedio de las amplitudes de un solo canal $\pm$ p.e.e en cada condición; ensayo de la t, $P = 0,73$ N.S.

En la figura 10, el panel E muestra la probabilidad del estado abierto para diferentes parches. Los símbolos más grandes representan los datos de las mediciones realizadas en los trazos mostrados en los paneles A y B. Las barras representan los valores promedio de la probabilidad de apertura de un solo canal $\pm$ p.e.e.; t de Student, ** $P = 0,002$. En particular, los estados de cierre prolongados que eran muy poco frecuentes en las condiciones de control aumentaron en su frecuencia después del tratamiento con HA. No se pudieron observar diferencias en la incidencia de estados abiertos entre las condiciones de control y con tratamiento de HA.

Los resultados mostrados en la figura 10 demuestran que en presencia de HA, la actividad del canal TRPV1 en respuesta a la capsaicina está ausente en aproximadamente el 30% de los parches. Además, la probabilidad de aparición de estados abiertos se reduce drásticamente en presencia de HA. La relación I-V de un solo canal y la amplitud de la corriente de un solo canal en condiciones de control y en presencia de HA fueron similares. Sin embargo, el HA provocó un aumento en el número de acontecimientos de larga duración en los histogramas de tiempo cerrado, como lo demuestran las mediciones de la distribución de los tiempos de canal abierto y cerrado. En consecuencia, los resultados sugieren que el HA mantiene el canal cerrado durante más tiempo, reduciendo así su probabilidad de apertura. La consecuencia es que las neuronas nociceptivas se vuelven menos excitables por estímulos nocivos que abren los canales TRPV1 en presencia de HA.

En las neuronas del DRG nociceptivas que poseen canales TRPV1, la apertura de estos canales por la capsaicina provoca una disminución en la resistencia de entrada, una despolarización y una descarga del potencial de acción. La frecuencia de descarga de los potenciales de acción evocados por capsaicina 1 μ M se midió con pinzas de parche en neuronas del DRG disociadas que expresan TRPV1. Específicamente, se realizaron registros electrofisiológicos de neuronas del DRG en la configuración unida a células a un potencial de retención de -60 mV en presencia de capsaicina 1 μ M. En la figura 11, el panel A muestra un registro de muestra de la respuesta a la capsaicina en una única neurona del DRG perfundida con solución salina. La frecuencia media de descarga de la respuesta fue de 16 picos/segundo. En la figura 11, el panel B muestra un registro de muestra de la estimulación con capsaicina en una neurona del DRG tratada con HA y registrada en presencia de HA. La frecuencia promedio de la respuesta fue de 4,6 picos/segundo. En la figura 11, el panel C muestra un registro de muestra de una neurona del DRG tratada con HA y registrada en HA, en la que no se observó respuesta a la capsaicina pero se pudo evocar una descarga del impulso con KCl 60 mM. El recuadro muestra la elevación del calcio intracelular producido por un pulso de calor en esta neurona. La ausencia de aumento de calcio intracelular frente al mismo pulso de calor en dos neuronas diferentes es evidente en el trazo inferior.

En la figura 11, el panel D muestra la frecuencia de descarga promedio (izquierda) y los datos individuales (derecha) de las neuronas del DRG en condiciones de control (barra izquierda, $n = 8$) y después de la exposición a HA (barra derecha, $n = 9$).

Los resultados presentados en la figura 11 demuestran que en presencia de HA, 4 de cada 10 neuronas que habían respondido previamente a la capsaicina no activaron potenciales de acción, a pesar de su excitabilidad intacta a otros estímulos. La frecuencia de descarga promedio evocada por la capsaicina en las neuronas del DRG de control se redujo significativamente en las neuronas del DRG incubadas con HA. Finalmente, la sensibilización de los canales TRPV1 de las neuronas del DRG por el mediador inflamatorio bradiquinina se redujo significativamente con HA. En conjunto, estos resultados indican que en las neuronas del DRG, el HA inhibe selectivamente la descarga de impulsos evocada por capsaicina, modulando la función de TRPV1 a través de la interacción directa o indirecta con el canal.

Ejemplo 5: Inhibición directa de la actividad de impulsos nerviosos por las composiciones de HA de la invención

En otro grupo de experimentos, se midió la latencia de la primera respuesta nocifensiva en ratones de tipo salvaje (WT) o TRPV1-/- "knockout" (KO) después de someterlos a la prueba de la placa caliente. La latencia de

la primera respuesta nocifensiva (lamer, morder, levantar, vigilar, sacudir la pata trasera o saltar) se considera una expresión conductual del dolor agudo evocado por el estímulo de calor nocivo que actúa sobre las patas. Se midió el valor de latencia y se comparó entre animales control (línea base), animales que recibieron en la pata una inyección subcutánea de 10 µl de solución salina estéril, de HA 400 µg/ml o de hialuronidasa, la enzima que digiere el ácido hialurónico nativo que rodea al matriz extracelular alrededor de las terminales nerviosas del dolor.

Como se muestra en la Figura 12, la latencia de la respuesta nocifensiva al calor de 52°C se redujo significativamente con la hialuronidasa 7 días después, mientras que EL HA aumentó la latencia, lo que refleja una sensibilidad reducida al calor nocivo. Los efectos analgésicos máximos de la inyección de HA se observaron 48 horas después de su inyección. En un grupo adicional de animales, se inyectó HA días después de la inyección de hialuronidasa, para reemplazar el ácido hialurónico nativo destruido por la enzima. En estas condiciones, la latencia recuperó valores normales. Estos datos sugieren que el HA inhibe TRPV1, reduciendo así la sensibilidad mediada por TRPV1 de las terminaciones del nociceptor a estímulos nocivos. Cuando los experimentos se repitieron en ratones TRPV1^{-/-} genéticamente modificados, no se observó ninguna de las diferencias en las respuestas a la prueba de la placa caliente entre los tratamientos observadas en animales de tipo salvaje.

Para confirmar que la inhibición de los canales TRPV1 por HA también ocurrió en los canales TRPV1 de las fibras dolorosas de las articulaciones de la rodilla que se activan mediante la rotación articular (figura 13A), se inyectó capsaicina 10 µM por vía intraarterial en ratas anestesiadas como una embolada a través de un catéter en la arteria safena cerca de la articulación de la rodilla a intervalos regulares de 30 minutos antes y después de la inyección intraarticular de solución salina o HA. Se midió la actividad de impulsos evocada por una inyección intraarterial cercana de capsaicina 10 µM y las respuestas a la rotación controlada de la articulación de la rodilla (ver figura 13).

La inyección en embolada de capsaicina provocó una descarga de impulsos nerviosos en una parte de los filamentos explorados (figura 13, panel B). El número de impulsos evocados por la primera inyección (respuesta de control) se tomó como 100% y sirvió para expresar la amplitud de la respuesta a las siguientes inyecciones. La frecuencia de descarga de impulsos siempre se redujo después del segundo o tercer estímulo, persistiendo durante toda la serie de inyecciones (taquifilaxis) y disminuyendo en promedio a 88 ± 13 (n = 7) de la respuesta de control en 180 min cuando se inyectó solución salina por vía intraarticular (figura 13, panel B, cuadrados negros). Cuando se inyectó HA al 4%, el porcentaje de reducción de la descarga fue de 31 ± 7 (n = 6), lo que representa un 65% de reducción. Este efecto inhibitorio fue mayor al final del experimento, 270 min después de la inyección intraarticular de HA, cuando se observó una reducción de la actividad del 84% (figura 13, panel B, cuadrados en blanco). En conjunto, estos hallazgos confirman que el HA inhibe directamente los canales TRPV1 en las fibras nerviosas del dolor de la articulación de la rodilla.

Ejemplo 6. Requisitos de fuerza para la expulsión de HA a través de varios tamaños de agujas

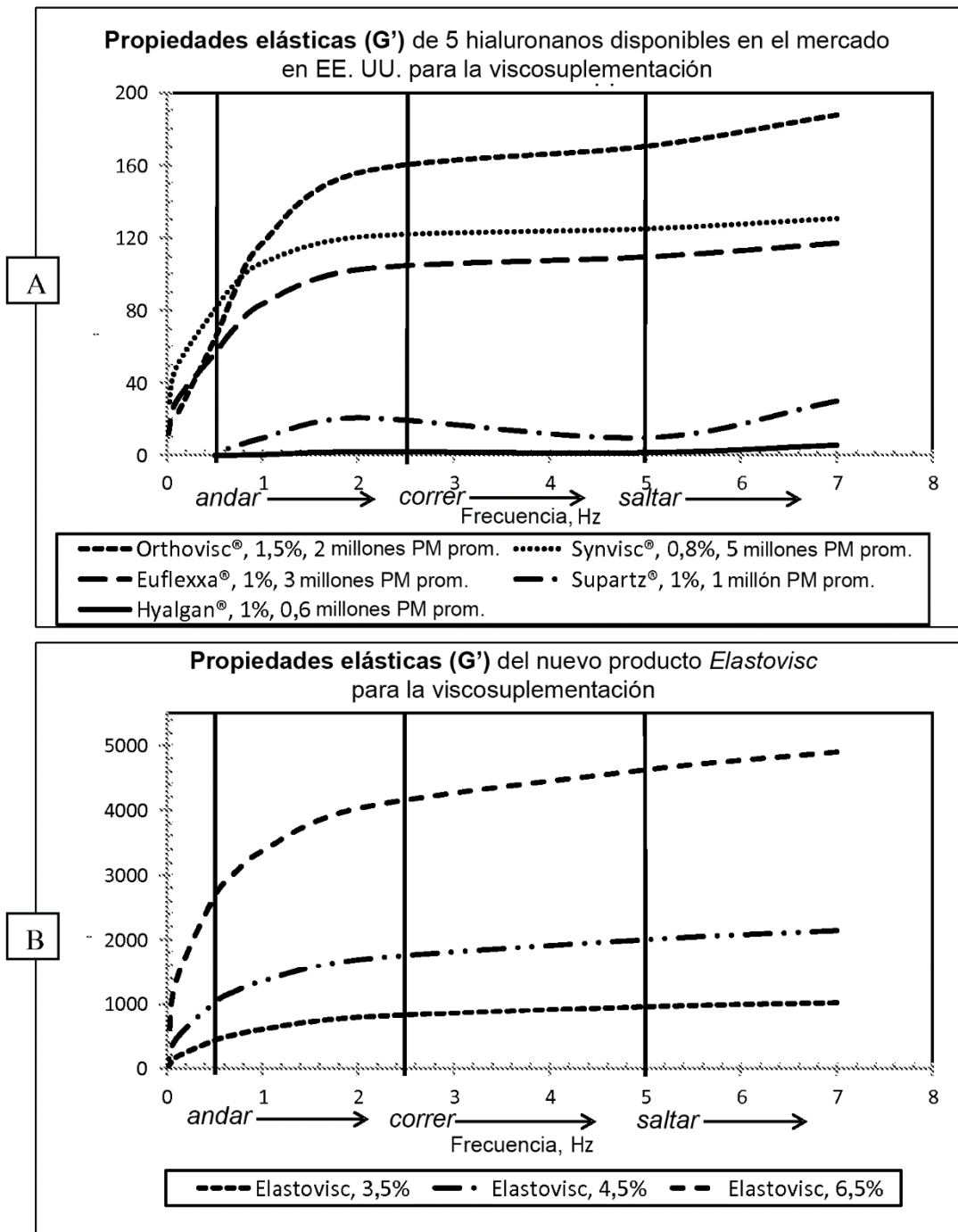
Se midió la presión requerida para expulsar una composición de HA al 4% de una jeringa de 3 ml con agujas de diferente diámetro (30-18G) y se muestra en la figura 14. La fuerza fue ejercida por un platillo de una balanza de dos platillos, actuando perpendicularmente en el émbolo de la jeringa. Se agregaron pesos de magnitud creciente al platillo placa contralateral. Como demuestran los resultados mostrados en la figura 14, las composiciones de HA de la invención pueden administrarse a sujetos usando agujas con diámetros de 30-18G.

REIVINDICACIONES

1. Composición de alta elasticidad que comprende hialuronano para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, en la que la composición tiene una elasticidad (G') de al menos aproximadamente 900 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz y temperatura y presión ambientales.
2. Composición de alta elasticidad para su uso según la reivindicación 1, en la que el hialuronano está presente en la composición de alta elasticidad a una concentración de más de 30 mg/ml (3% en p/v); opcionalmente en la que el hialuronano está presente en la composición de alta elasticidad a una concentración de 40 mg/ml (4% en p/v) a 60 mg/ml (6% en p/v).
3. Composición de alta elasticidad para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el hialuronano tiene un peso molecular promedio de entre 1 millón y 2 millones; o en la que el hialuronano tiene un peso molecular promedio de menos de 2 millones.
4. Composición de alta elasticidad para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el hialuronano no está reticulado y/o está sustancialmente libre de modificaciones químicas.
5. Composición de alta elasticidad para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición de alta elasticidad es estéril.
6. Composición de alta elasticidad para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición de alta elasticidad comprende además un tampón; opcionalmente en la que el tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS); opcionalmente en la que el tampón comprende NaCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Na_2HPO_4 ; opcionalmente en la que el tampón comprende NaCl 8,47 g/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,047 g/l y Na_2HPO_4 0,213 g/l.
7. Composición de alta elasticidad para su uso según las reivindicaciones 1 a 6, en la que el dolor resulta de la activación de un canal iónico TRPV1.
8. Composición de alta elasticidad para su uso según las reivindicaciones 1 a 7, en la que la administración de la composición de alta elasticidad da como resultado la inhibición de un aumento de Ca^{2+} citosólico tras un estímulo nociceptivo en una neurona que expresa el canal iónico implicado en la transducción del dolor.
9. Composición de alta elasticidad para su uso según las reivindicaciones 1 a 8, en la que la administración de la composición de alta elasticidad da como resultado una disminución de la corriente de células completas tras un estímulo nociceptivo en una neurona que expresa el canal iónico implicado en la transducción del dolor.
10. Composición de alta elasticidad para su uso según las reivindicaciones 1 a 9, en la que el canal iónico implicado en la transducción del dolor está en un nervio de una articulación del sujeto; opcionalmente en la que la articulación se selecciona del grupo que consiste en una articulación de la rodilla, una articulación del codo, una articulación de la cadera y una articulación del hombro.
11. Composición de alta elasticidad para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la administración de la composición de alta elasticidad da como resultado una disminución del número medio de impulsos nerviosos por dolor en el sujeto.
12. Composición de alta elasticidad para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el dolor está en una articulación del sujeto; opcionalmente en la que la articulación se selecciona del grupo que consiste en una articulación de la rodilla, una articulación del codo, una articulación de la cadera y una articulación del hombro.
13. Composición de hialuronano de alta elasticidad, que comprende: hialuronano de un peso molecular promedio de entre 1,3 y 2 millones; un tampón que comprende NaCl 8,47 g/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,047 g/l y Na_2HPO_4 0,213 g/l, en la que el hialuronano está presente en la composición a una concentración de al menos 40 mg/ml (4% en p/v) y en la que la composición tiene una elasticidad (G') de al menos 900 pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz y temperatura y presión ambientales.
14. Composición de hialuronano de alta elasticidad según la reivindicación 13, en la que la composición tiene un pH de 5,5-7,5.
15. Composición de alta elasticidad para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el hialuronano está presente en la composición a una concentración de al menos 45 mg/ml (4,5% en p/v).
16. Composición de alta elasticidad para su uso según la reivindicación 13, en la que el hialuronano está

presente en la composición de alta elasticidad a una concentración de entre 45 mg/ml (4,5% en p/v) y 55 mg/ml (5,5% en p/v).

- 5 17. Composición de alta elasticidad para su uso según la reivindicación 14, en la que el hialuronano está presente en la composición de alta elasticidad a una concentración de 45 mg/ml (4,5% en p/v) ó 50 mg/ml (5% en p/v).



Los cinco productos a 2,5 Hz: 3-160 Pa

Elastovisc a 2,5 Hz: 800-4100 Pa

Figura 1

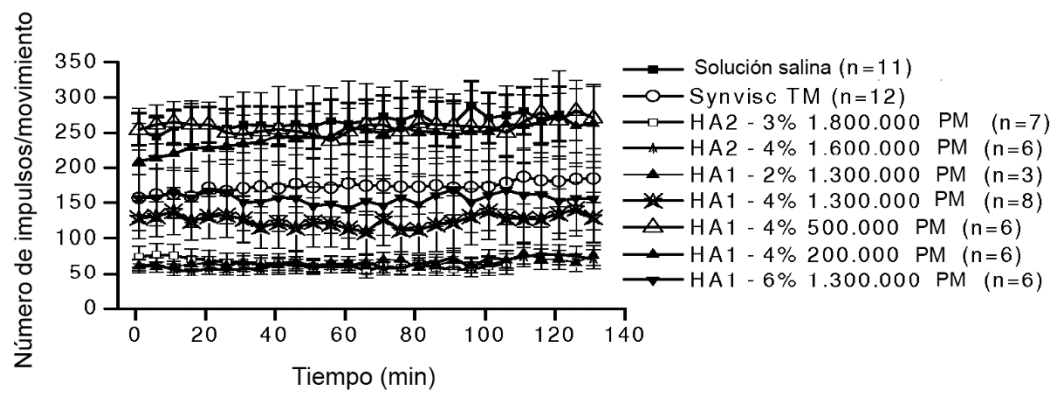


Figura 2A

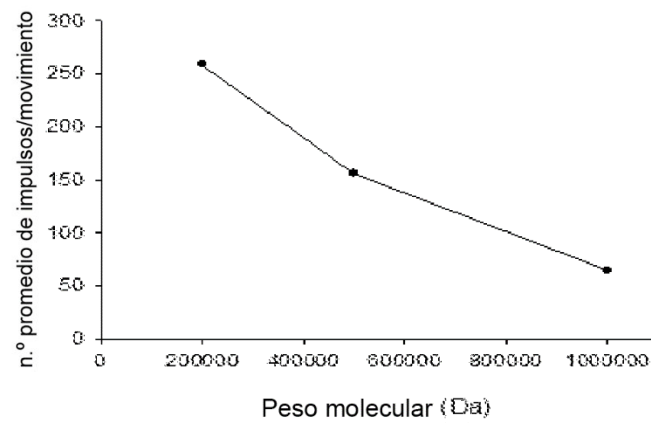


Figura 2B

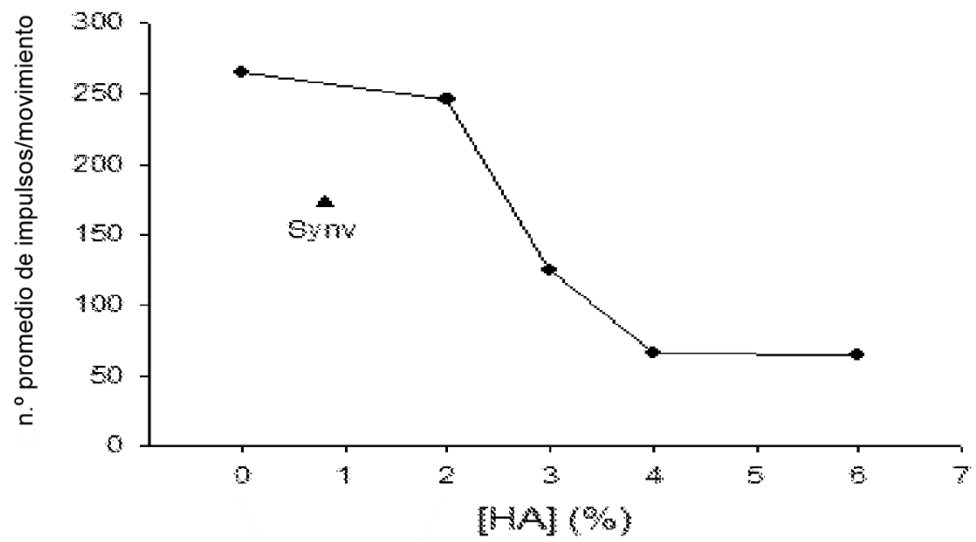


Figura 2C

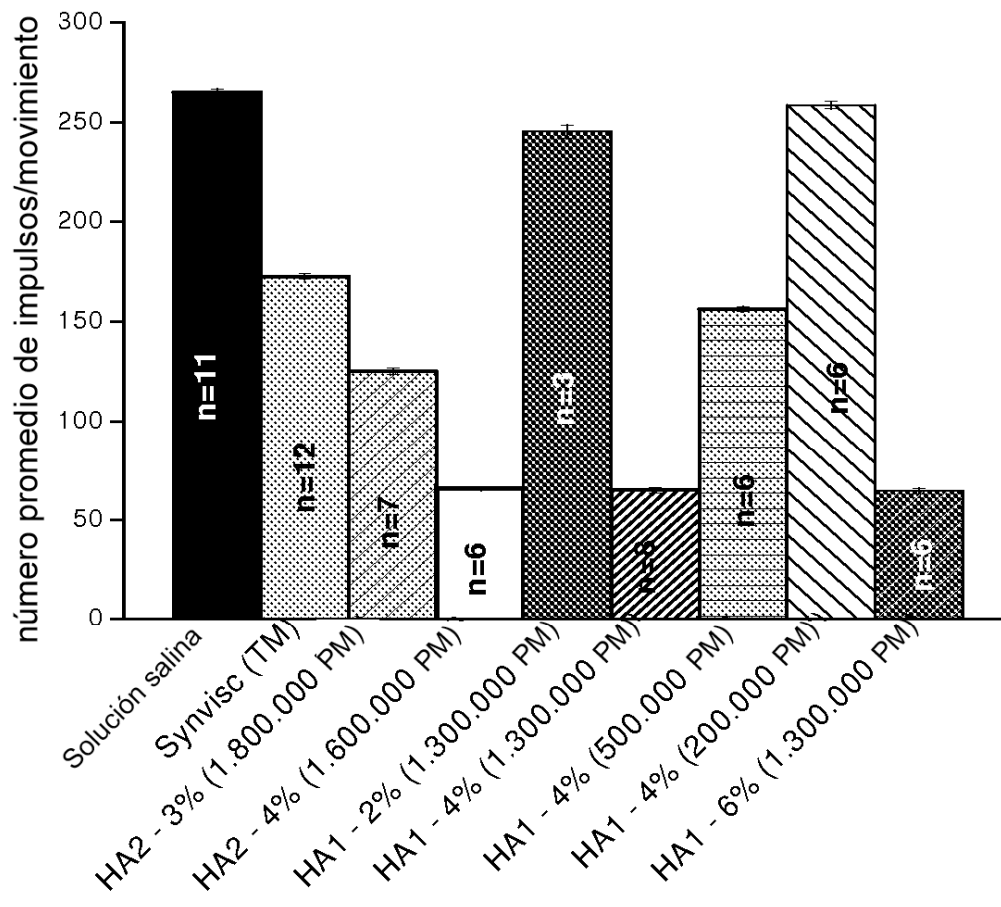


Figura 2D

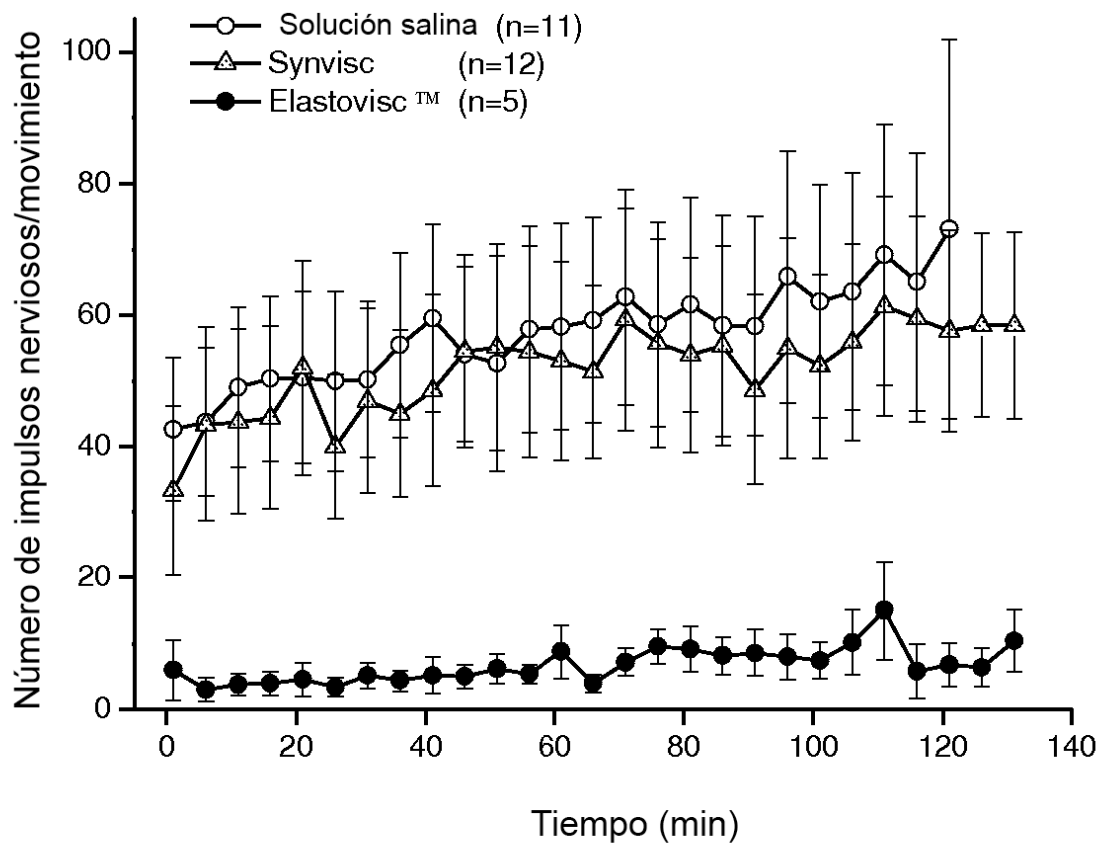


Figura 3

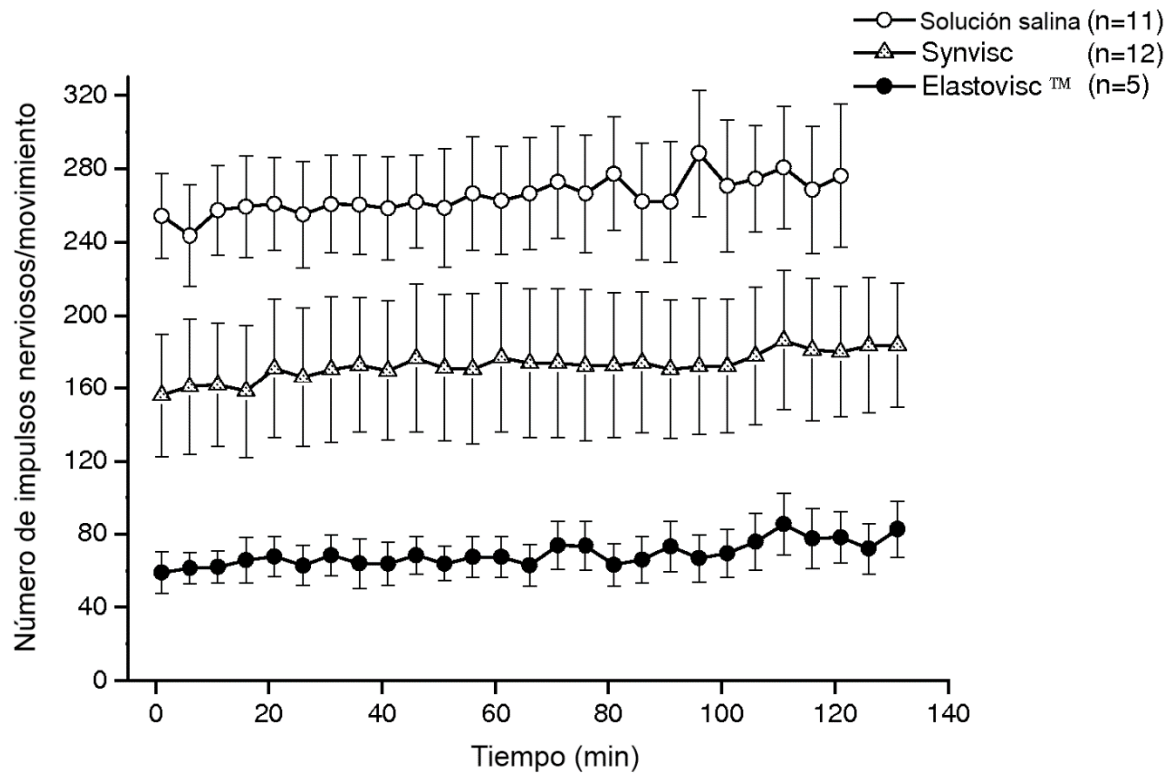
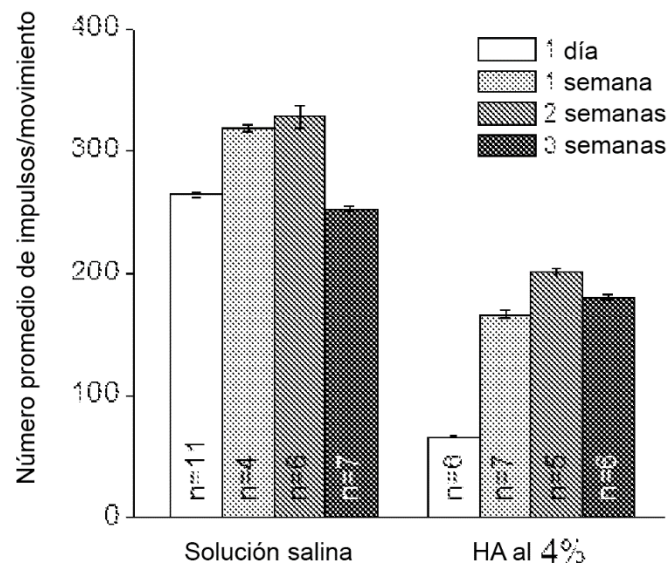


Figura 4

A.



B.

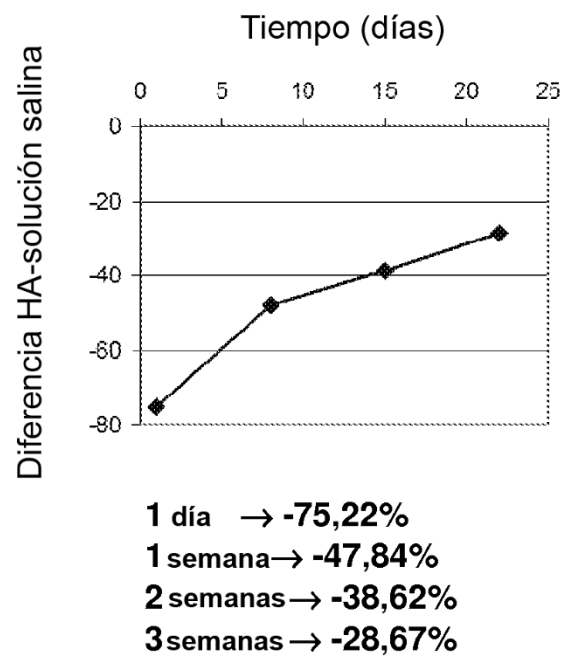
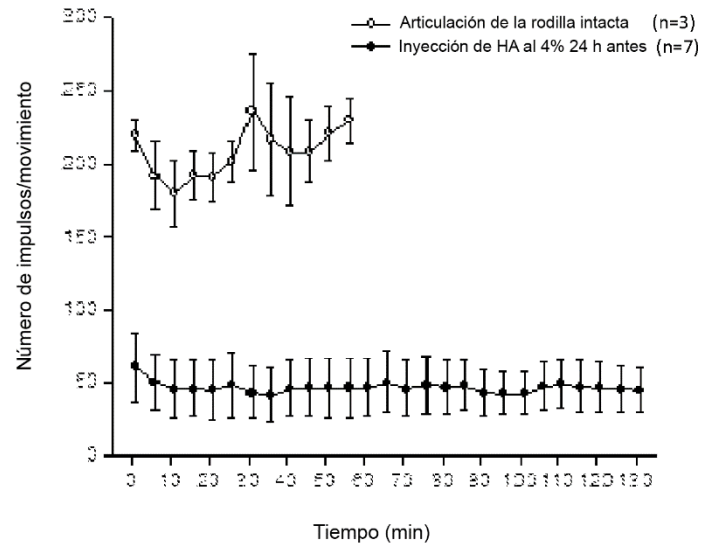
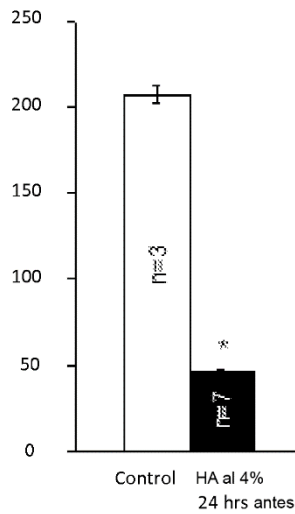


Figura 5

A.



B



*P<0,001 Ensayo de la suma de rangos

C

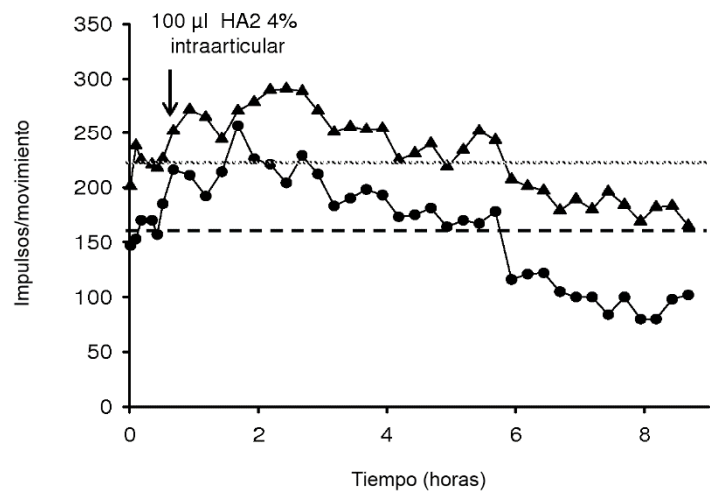


Figura 6

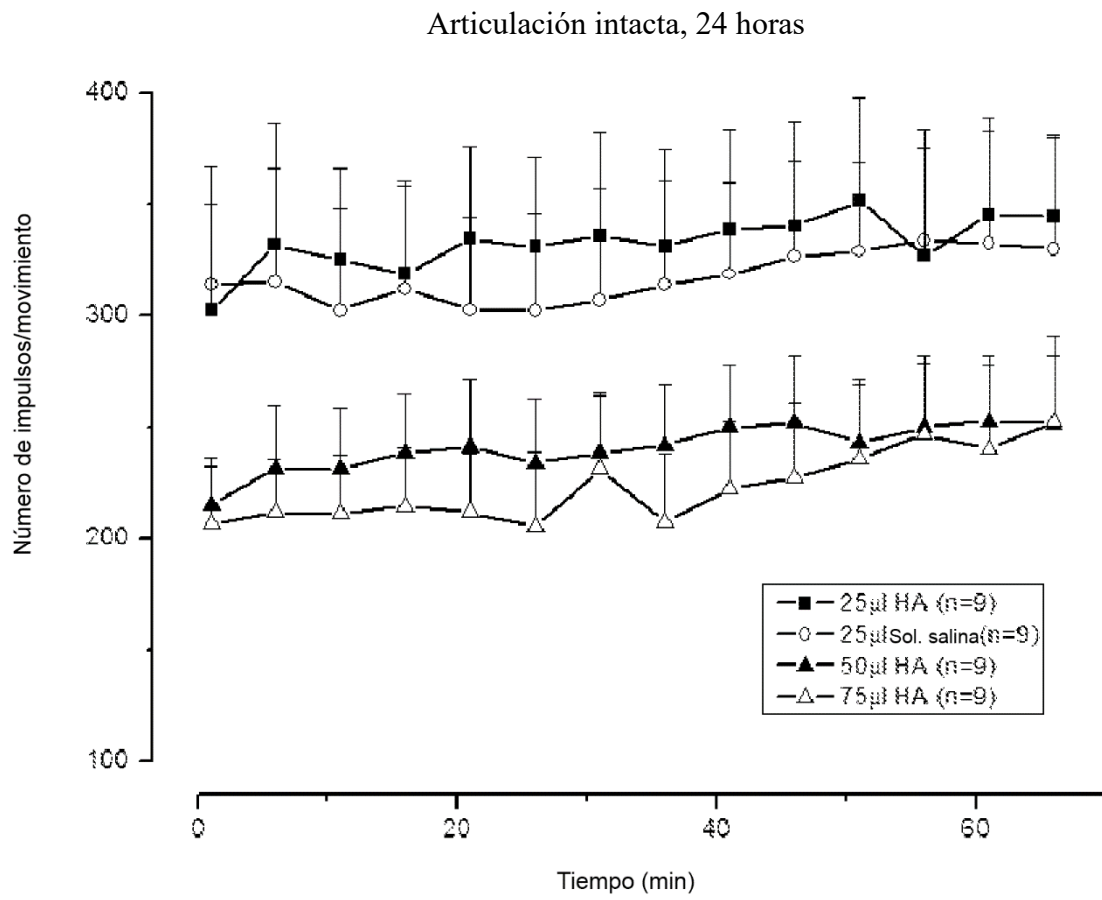


Figura 7

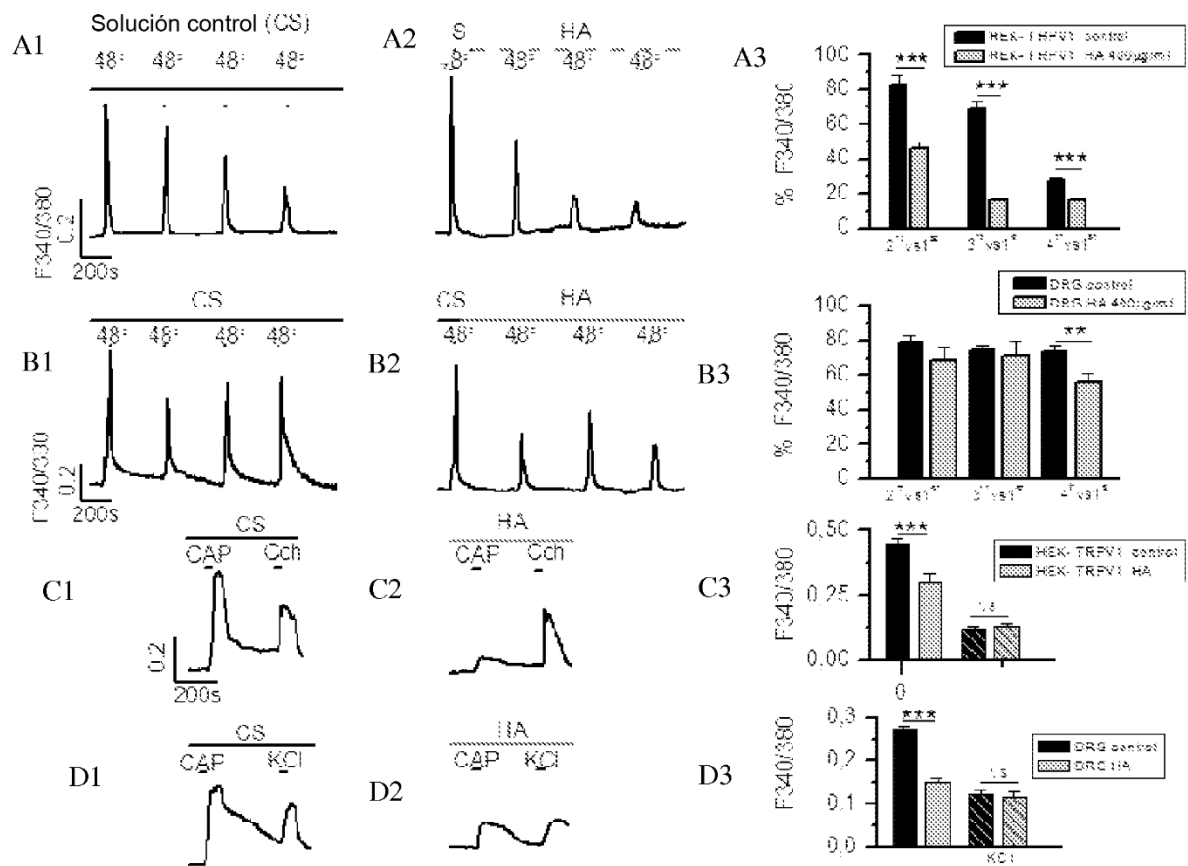


Figura 8

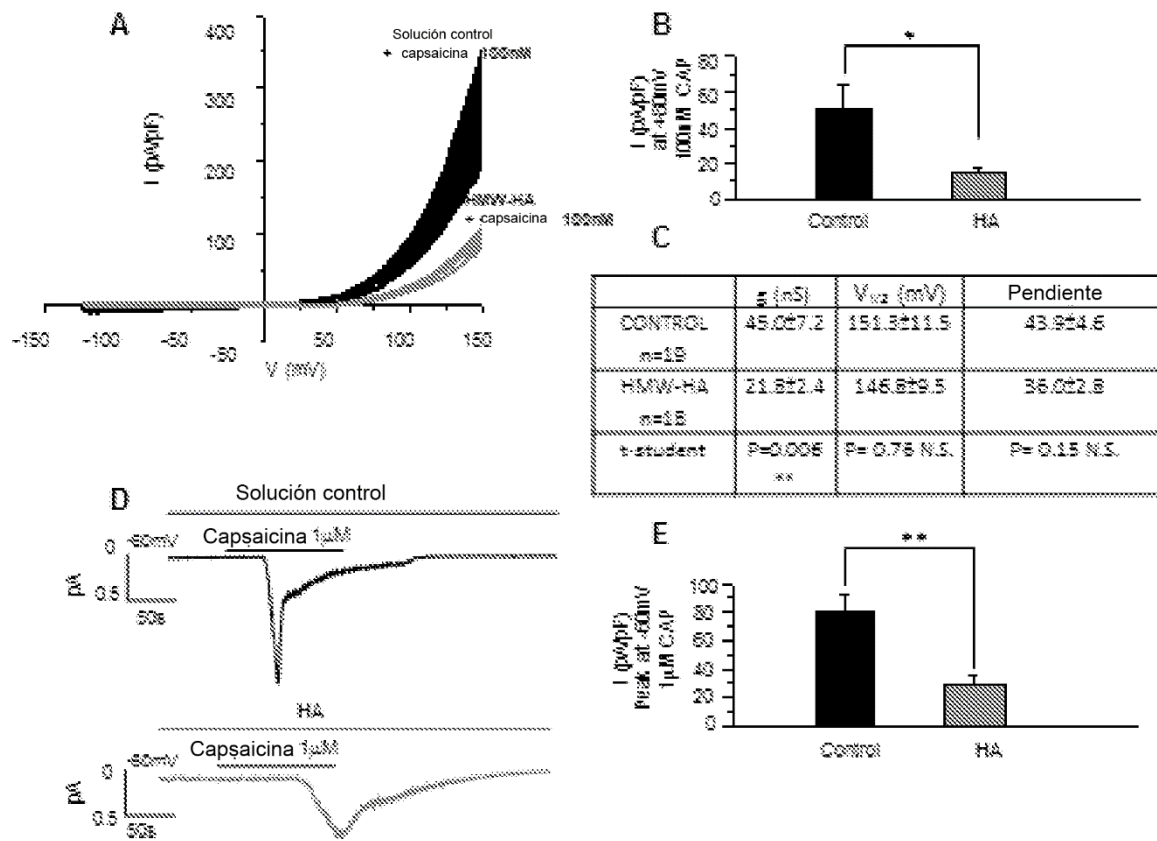


Figura 9

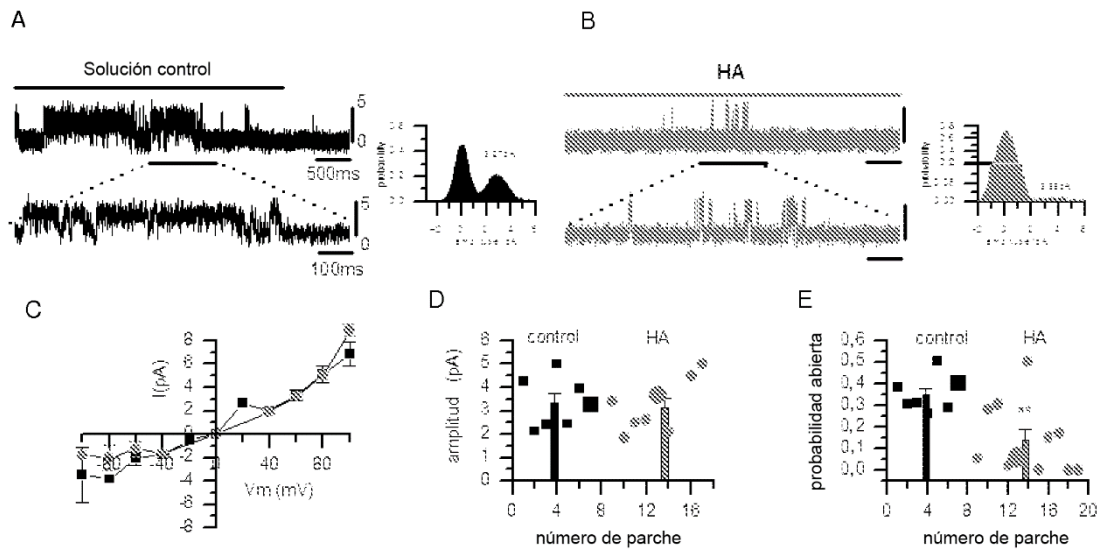


Figura 10

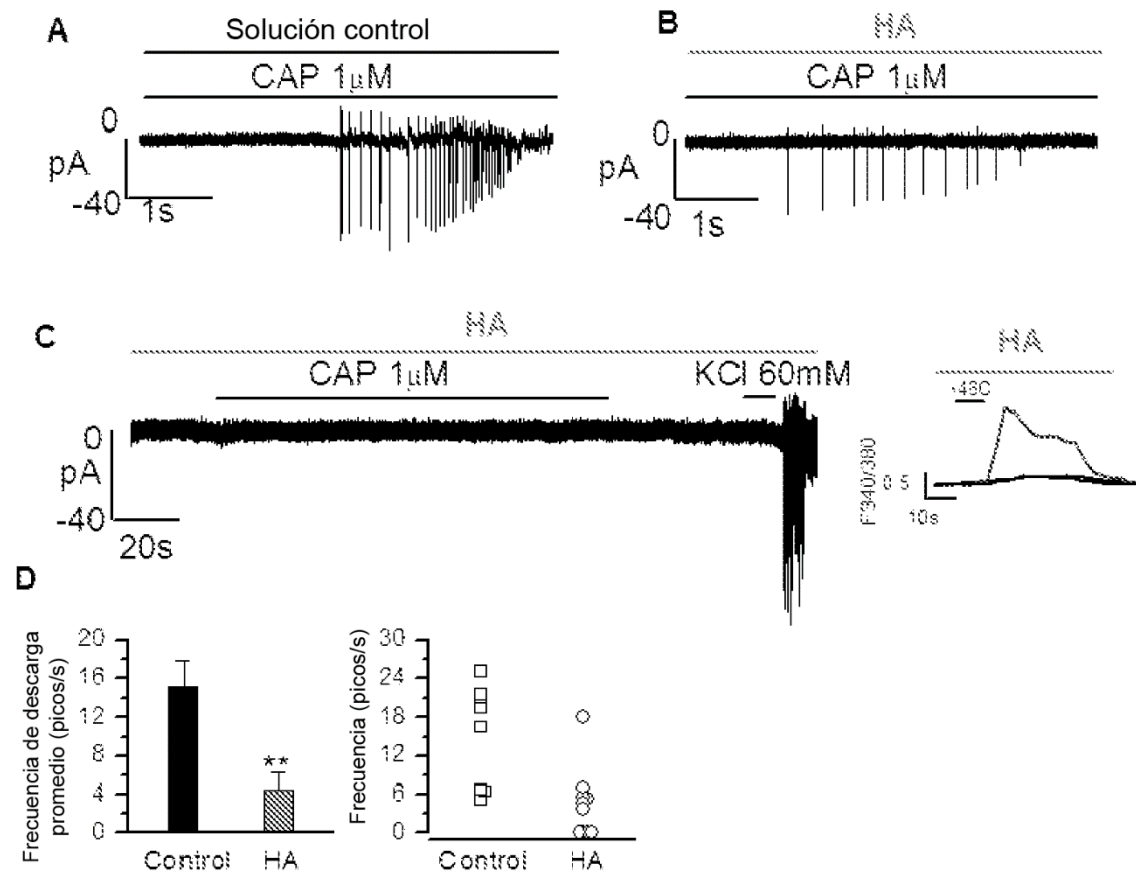


Figura 11

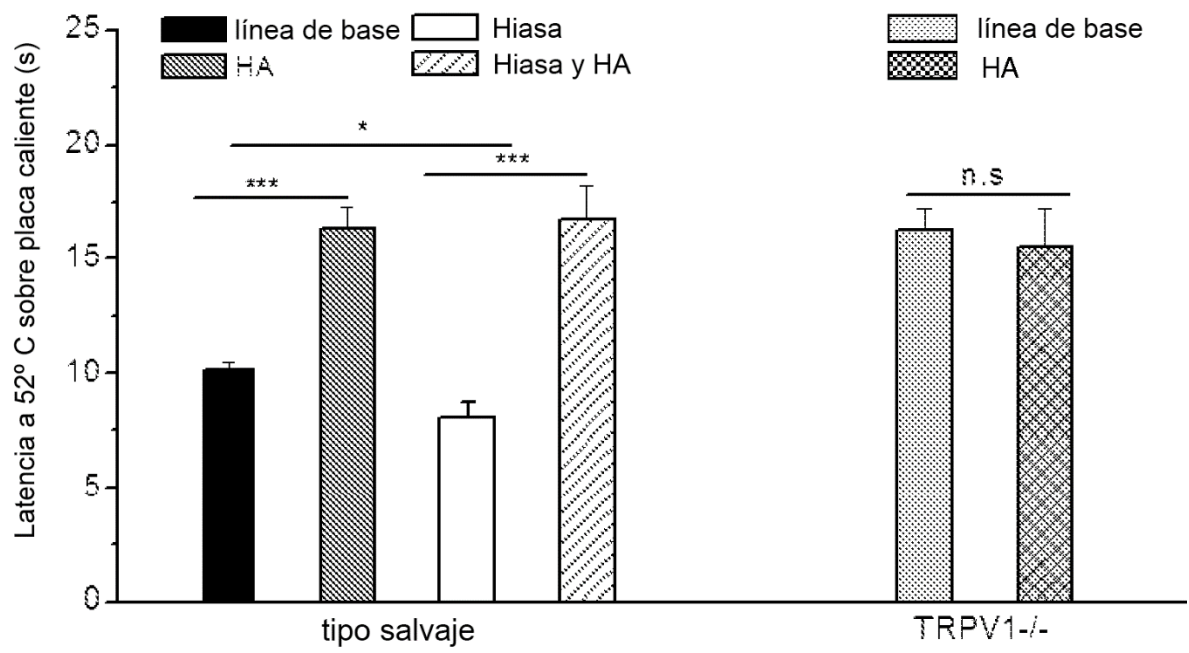


Figura 12

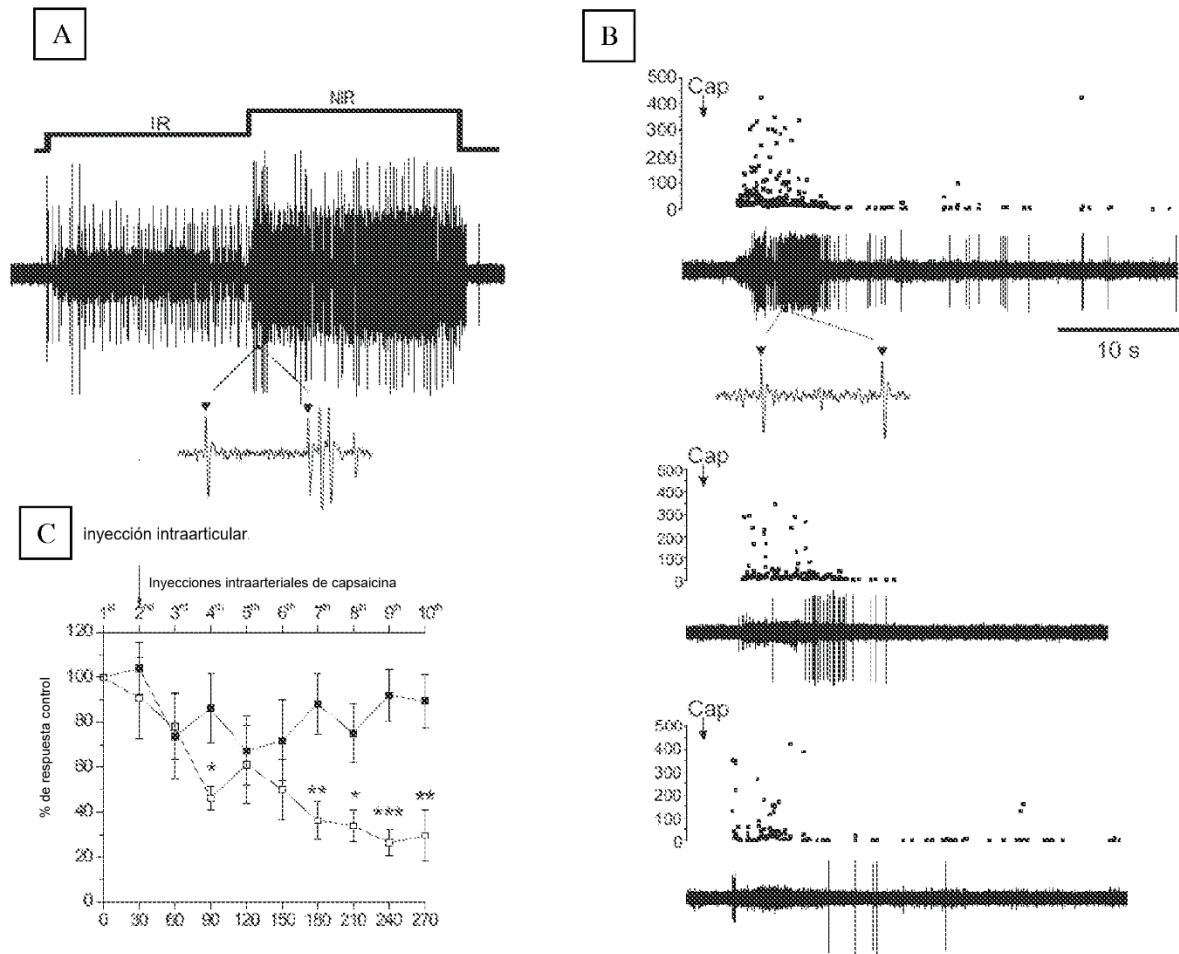


Figura 13

Diámetro	Promedio (Kg)	p.e.e.
30G	4,43	2,560
26G	2,43	1,405
25G	2,03	1,174
23G	1,83	1,058
20G	1,43	0,828
18G	1,37	0,789

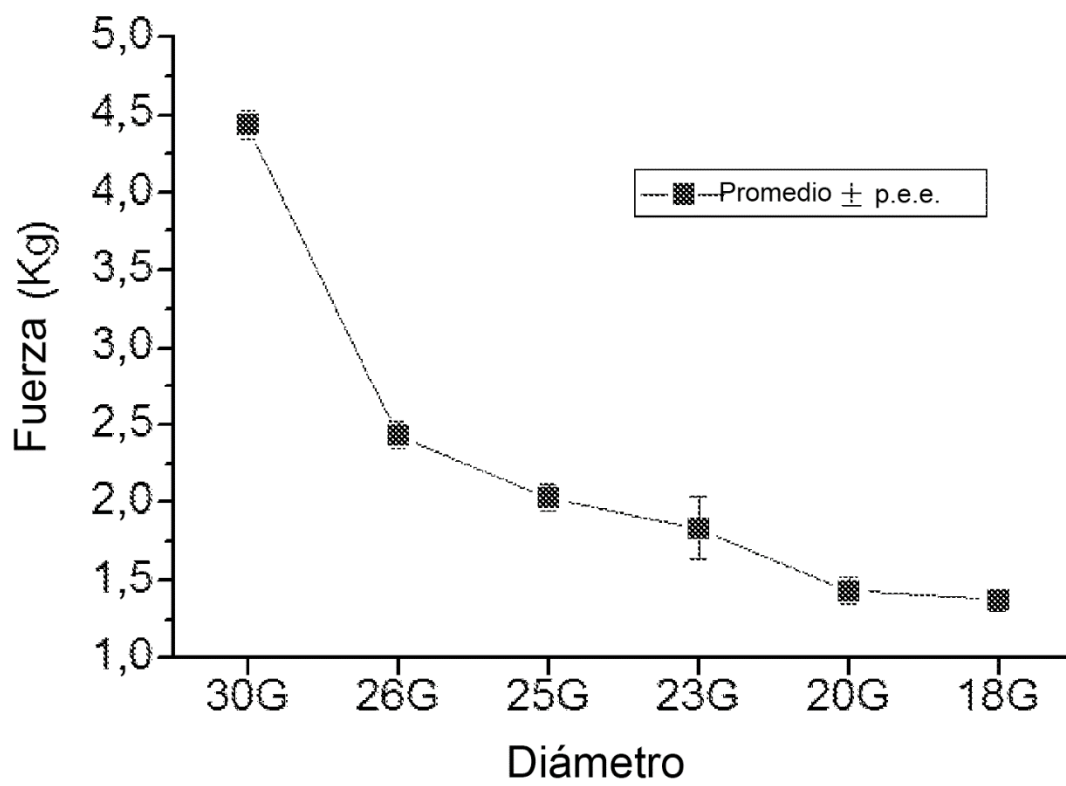


Figura 14