

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 010**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/685 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01)
A61K 8/41 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2021** **PCT/IB2021/051573**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2021** **WO21171215**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2021** **E 21714664 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 4110288**

54 Título: **Composiciones tópicas diseñadas para mantener y/o restaurar la integridad de la mucosa y la epidermis dañadas**

30 Prioridad:
27.02.2020 IT 202000004069

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2024

73 Titular/es:
RICERFARMA S.R.L. (100.0%)
Via Egadi 7
20144 Milano, IT

72 Inventor/es:
CERINI, ROBERTO

74 Agente/Representante:
GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 010 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 tópicas diseñadas para mantener y/o restaurar la integridad de la mucosa y la epidermis dañadas

La invención se refiere a composiciones tópicas para el mantenimiento y/o restauración de la integridad de las membranas mucosas y epidermis dañadas.

5 **Técnica anterior**

La integridad del tejido cutáneo y de las mucosas puede verse afectada por diversas causas exógenas y endógenas, tales como carencias vitamínicas, alimentación incorrecta, higiene deficiente, infecciones bacterianas, víricas o fúngicas, disbiosis intestinal, alteraciones de la flora microbiana de las mucosas, desequilibrios endocrinos, enfermedades debilitantes, factores hereditarios, factores mecánicos, físicos, químicos y traumáticos, radiaciones, etc.

10 El documento EP2646036 desvela composiciones útiles para mantener y restaurar la integridad de las membranas mucosas y la epidermis, que comprenden alfoscerato de colina y ácido hialurónico.

El alfoscerato de colina es conocido como una sustancia nootrópica capaz de mejorar el trofismo de las células cerebrales (activando el riego sanguíneo y el metabolismo celular) y, en consecuencia, las funciones intelectuales. El documento WO93/19730 desvela su uso en la piel y el cabello con una acción hidratante, emoliente, elastizante, reparadora y de aumento de volumen.

15 Como se describe en el documento WO93/19730 el alfoscerato de colina carece prácticamente de toxicidad sistémica y presenta una marcada tolerabilidad tópica. Es conocido en el campo farmacéutico por su uso en composiciones inyectables y composiciones orales para el tratamiento de alteraciones de las funciones cognitivas, y como posible factor secretor de la hormona del crecimiento.

20 El ácido hialurónico, ampliamente presente en diversos tejidos corporales humanos y animales, posee una elevada viscoelasticidad y la capacidad de retener hasta 1000 veces su peso en agua. Se utiliza ampliamente, principalmente en forma de hialuronato sódico, en formulaciones cosméticas y farmacéuticas, por sus propiedades mucoadhesivas, antiinflamatorias y reparadoras.

25 El palmitato de ascorbilo (AP), una forma liposoluble de vitamina C, es útil para proteger los lípidos de la peroxidación y se utiliza principalmente en cosmética en concentraciones que oscilan entre el 1,0 y el 0,1% p/p con fines antioxidantes y antirradicales en tratamientos antienvjecimiento. Al igual que los lípidos, penetra fácilmente en la piel y las mucosas, en las que ejerce una acción antioxidante, previniendo el envejecimiento celular y la degeneración del colágeno. El palmitato de ascorbilo también se vende en forma de suplemento dietético, para favorecer la absorción del hierro, ayudar a la circulación sanguínea y potenciar la formación de colágeno, para de este modo contribuir a evitar la aparición de dolores articulares y reumatismo. También se utiliza como aditivo alimentario (E304) con fines antioxidantes. También se sabe que el ácido ascórbico y sus ésteres, en particular el palmitato de L-ascorbilo, tienen una actividad inhibidora significativa frente a las hialuronidasas, las enzimas responsables de la degradación del ácido hialurónico.

30 Se siente especialmente la necesidad de composiciones que sean útiles para mantener y restaurar la integridad de las membranas mucosas y adaptables a varios tipos de formulación para diferentes lugares de aplicación, y que tengan efectos sinérgicos entre los ingredientes y una estabilidad mejorada frente a las hialuronidasas.

Descripción de la invención

40 Ahora se ha descubierto que el uso tópico en las membranas mucosas y la epidermis dañadas de una combinación de ácido hialurónico de alto peso molecular, un éster de ácido ascórbico, es decir, palmitato de ascorbilo, en concentraciones entre 0,050% p/p y 0,0004% p/p, y alfoscerato de colina en una matriz bio/mucoadhesiva, mantiene y restaura la integridad del tejido mucoso y epidérmico con una eficacia y flexibilidad de aplicación superiores a las de las formulaciones conocidas.

La combinación de la invención es particularmente útil para el tratamiento de afecciones irritativas/inflamatorias de las membranas mucosas dañadas y la epidermis (quemaduras, llagas, sarpullido por calor, dermatitis y similares).

45 Por lo tanto, la invención proporciona composiciones mucoadhesivas tópicas que comprenden ácido hialurónico o una sal del mismo, alfoscerato de colina, palmitato de ascorbilo en una concentración que oscila entre 0,050% p/p y 0,0004% p/p, y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

50 El éster de ácido ascórbico, es decir, el palmitato de ascorbilo, está presente en las formulaciones de la invención en concentraciones inferiores a las empleadas habitualmente para su uso como agente antioxidante y antirradical (0,500-0,100% p/p) en formulaciones cosméticas y dermatológicas convencionales.

Se considera que el mejor equilibrio entre la eficacia antihialuronidasa y las propiedades mucoadhesivas de las formulaciones se consigue con las concentraciones indicadas de éster de ácido ascórbico.

El peso molecular medio del ácido hialurónico oscila preferentemente entre 800.000 y 4.000.000 Da. El ácido hialurónico puede estar presente en las formulaciones en forma de sal sódica en concentraciones que oscilan entre el 20,000% p/p y el 0,0005% p/p.

5 El alfoscerato de colina está presente en concentraciones comprendidas entre 0,0005 y 10,000% p/p, preferentemente entre 0,001% y 1,000% p/p.

10 Las composiciones de la invención también contienen uno o más agentes mucoadhesivos seleccionados entre betaglucono, betaglucono carboximetil sódico, quitosano, carboximetil quitosano, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carbómero, PVA (alcohol polivinílico), PVP (polivinilpirrolidona), policarbofilo (ácido poliacrílico reticulado con divinilglicol), copolímero PVM/MA (copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico) y copolímero VP/eicoseno (1-vinil-2-pirrolidinona - 1-eicoseno (1:1)).

De acuerdo con otro aspecto, las composiciones de la invención también pueden incluir otros ingredientes activos útiles para el tratamiento tópico de las membranas mucosas, tales como los descritos en Martindale, The Complete Drug Reference, 34ª Edition.

15 Las composiciones de la invención pueden formularse de forma adecuada para la administración tópica de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos, tales como los descritos en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition.

Excipientes o soportes conocidos, tales como agentes formadores de película, tales como los descritos en Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6ª edición, Pharmaceutical Press para optimizar el uso específico de las composiciones.

20 Ejemplos de formulaciones preferentes son geles, emulsiones de aceite en agua (o/w) y agua en aceite (w/o), cremas, ungüentos, aerosoles, polvos, lociones y espumas.

Las composiciones particularmente preferentes se presentan en forma de gel acuoso (hidrogel), que se puede obtener mediante el uso de un polímero farmacéuticamente aceptable capaz de absorber una cantidad considerable de agua y que de este modo se adhiere a las membranas mucosas (mucoadhesión).

25 La mucoadhesión de las composiciones de la invención asegura un tiempo de residencia adecuado en las mucosas, que está sujeto a la acción lixiviante de factores físicos y mecánicos que pueden reducir el tiempo de residencia del principio activo, por ejemplo en el caso de las mucosas orales.

30 Las composiciones de acuerdo con la invención, que son adecuadas para uso humano o veterinario, combinan la acción antiinflamatoria y reparadora de tejidos del ácido hialurónico con la acción formadora de película y protectora de las matrices de formulación bio/mucoadhesivas que contienen alfoscerato de colina y la acción antihialuronidasa del palmitato de ascorbilo a bajas concentraciones.

En las realizaciones preferentes, el ácido hialurónico y el éster de ácido ascórbico, es decir, el palmitato de ascorbilo, se encuentran en una proporción molar (relativa a la unidad disacárida del ácido hialurónico) que oscila entre 60:1 y 1:1. Más preferentemente, el ácido hialurónico y el palmitato de ascorbilo están en una proporción molar que oscila entre 20:1 y 1:1; la mejor actividad antihialuronidasa se obtiene en dichas proporciones.

35 De hecho, en presencia de hialuronidasa, el ácido hialurónico se degrada rápidamente hasta en un 95-97% después de sólo 5 horas. Como se verá en los Ejemplos siguientes, el palmitato de ascorbilo ha demostrado ser significativamente eficaz para ralentizar la cinética enzimática y, en consecuencia, para reducir la degradación indeseable del ácido hialurónico. De hecho, después de 5 horas, las composiciones que contenían palmitato de ascorbilo presentaban hasta un 50% menos de degradación del AH que la observada en las muestras de ácido hialurónico utilizadas solas o combinadas con alfoscerato de colina. Después de 24 horas, las composiciones que contenían palmitato de ascorbilo mostraron hasta un 27% menos de degradación del AH que la observada en las muestras de ácido hialurónico utilizadas solas o combinadas con alfoscerato de colina.

40 La actividad antihialuronidasa del palmitato de ascorbilo sinergiza con la acción del ácido hialurónico, ya sea endógeno del tejido o exógeno. La acción antihialuronidasa es de crucial importancia para aumentar la eficacia antiinflamatoria y reparadora tisular del ácido hialurónico, protegiéndolo frente a la acción enzimática de la hialuronidasa endógena y bacteriana y garantizando una residencia funcional prolongada *in situ* y, por tanto, una mayor eficacia combinada con una mayor biodisponibilidad e integridad estructural.

45 Además, la acción antihialuronidasa también ejerce una acción antibacteriana/antiinflamatoria; de hecho, muchas bacterias ejercen una acción inflamatoria produciendo hialuronidasas específicas que favorecen la colonización de los tejidos, para de este modo promover la aparición y propagación de infecciones/contaminación bacteriana a nivel local.

50 Sobre la base de las consideraciones expuestas anteriormente, la acción antiinflamatoria/reparadora tisular del AH está protegida y fuertemente potenciada por la acción antihialuronidasa y la presencia de la matriz formadora de película y bio/mucoadhesiva capaz de formar un entorno favorable para la protección y reparación tisular (cicatrización de heridas).

Las composiciones de la invención pueden aplicarse a las membranas mucosas externas, tales como las membranas mucosas de la boca y la cavidad oral en general, las membranas mucosas nasales, las membranas mucosas oculares, las membranas mucosas aurales, las membranas mucosas genitales, las membranas mucosas anales y rectales.

- 5 Las composiciones de la invención son útiles en la prevención y tratamiento de desórdenes inflamatorios y/o aquellos que involucran daño a las membranas mucosas orales, en la prevención y/o tratamiento de encías dañadas y/o inflamadas, y en el tratamiento de mucositis inducida por radiación.

- 10 Por inflamación y lesiones de las mucosas bucales se entiende, por ejemplo, gingivitis, mucositis (úlceras bucales, incluidas las úlceras bucales recurrentes), estomatitis, glositis, etc. Estos trastornos pueden tener diferentes etiologías; por ejemplo, pueden tener causas mecánicas, químicas o patológicas (infecciones, disbiosis de la cavidad bucal o disbiosis intestinal).

Los ejemplos siguientes ilustran mejor la invención. Los porcentajes se expresan en partes en peso (p/p) del volumen total de la composición.

Ejemplo 1 - Composición líquida para mucosas orales

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	1,000%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,300%
Palmitato de ascorbilo	0,005%
Policarbófilo	0,050%
Carboximetil quitosano	0,100%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,500%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Aromatizante	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 2 - Composición de gel para el tratamiento de úlceras bucales

Compuesto	Porcentaje
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,400%
Palmitato de ascorbilo	0,040%
Alfoscerato de colina	0,200%
Carboximetilcelulosa	1,000%
Policarbófilo	0,500%
PVP (polivinilpirrolidona)	1,000%
PVA (alcohol polivinílico)	0,500%
Xilitol	7,000%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Aromatizante	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 3 - Composición en gel para el tratamiento de la mucositis oral

Compuesto	Porcentaje
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,500%
Palmitato de ascorbilo	0,050%
Alfoscerato de colina	0,100%
Carboximetilcelulosa	1,000%
Policarbófilo	0,400%
Carboximetil quitosano	0.150%
PVP (polivinilpirrolidona)	1.500%
PVA (alcohol polivinílico)	0,500%
Xilitol	7,500%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Aromatizante	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 4 - Composición líquida para el tratamiento de la mucositis oral

Compuesto	Porcentaje
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,200%
Palmitato de ascorbilo	0,020%
Alfoscerato de colina	0,050%
Policarbófilo	0,050%
Carboximetil quitosano	0,050%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,200%
PVA (alcohol polivinílico)	0,100%
Xilitol	7,500%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Aromatizante	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 5 - Composición en gel para uso en las mucosas nasales

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,050%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,200%
Palmitato de ascorbilo	0,020%

ES 2 986 010 T3

Carboximetilcelulosa	4,500%
Policarbófilo	0,300%
Copolímero PVM/MA	0,150%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,500%
PVA (alcohol polivinílico)	0,100%
Agua destilada <i>de eufasia</i>	10,000%
Cloruro de sodio	0,800%
Fosfato sódico dibásico dodecahidratado	0,300%
Fosfato sódico monobásico monohidratado	0,030%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q. s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 6 - Composición líquida para uso en las mucosas oculares

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,010%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,150%
Palmitato de ascorbilo	0,005%
Policarbófilo	0,050%
Carboximetil quitosano	0,050%
Agua destilada de hamamelis	10,000%
Agua de manzanilla destilada	10,000%
Cloruro de sodio	0,800%
Fosfato sódico dibásico dodecahidratado	0,300%
Fosfato sódico monobásico monohidratado	0,030%
EDTA	0,050%
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 7 - Composición líquida para uso en las mucosas aurales

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,100%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,100%
Palmitato de ascorbilo	0,015%
Policarbófilo	0,050%
Copolímero PVM/MA	0,150%
Glicerol	50,000%

ES 2 986 010 T3

Agua desmineralizada	q.s. al 100%
----------------------	--------------

Ejemplo 8 - Composición líquida para uso en las mucosas vaginal y vulvar

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,050%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,200%
Palmitato de ascorbilo	0,010%
Polcarbófilo	0,100%
Copolímero PVM/MA	0,050%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,200%
PVA (alcohol polivinílico)	0,100%
Cloruro de sodio	0,800%
Conservante	q.s.
Perfume	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 9 - Composición en gel para uso en las mucosas vaginal y vulvar

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,025%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,150%
Palmitato de ascorbilo	0,040%
Sal sódica de carboximetilcelulosa	4,500%
Polcarbófilo	0,250%
Copolímero PVM/MA	0,150%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,500%
PVA (alcohol polivinílico)	0,100%
Cloruro de sodio	0,800%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Perfume	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 10 - composición en gel para uso en las membranas mucosas de los genitales masculinos

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,500%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,250%

ES 2 986 010 T3

Palmitato de ascorbilo	0,050%
Sal sódica de carboximetilcelulosa	4,500%
Policarbófilo	0,250%
Copolímero PVM/MA	0,150%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,500%
PVA (alcohol polivinílico)	0,100%
Cloruro de sodio	0,800%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 11 - composición en gel para uso en las mucosas anorrectales

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,500%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,250%
Palmitato de ascorbilo	0,015%
Sal sódica de carboximetilcelulosa	4,500%
Policarbófilo	0,250%
Carboximetil quitosano	0,150%
Copolímero PVM/MA	0,150%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,500%
PVA (alcohol polivinílico)	0,100%
Agua destilada de tomillo blanco	10,000%
Agua destilada de lavanda	10,000%
Agua destilada de aciano	10,000%
Cloruro de sodio	0,800%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 12 - composición en gel para el tratamiento de encías inflamadas

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,250%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,450%
Palmitato de ascorbilo	0,045%
Xilitol	7,500%

ES 2 986 010 T3

Sal sódica de carboximetilcelulosa	4,000%
Alcohol polivinílico	0,300%
Policarbófilo	0,300%
Copolímero VP/eicoseno	0,100%
Copolímero PVM/MA	0,150%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,500%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Aromatizante	q.s.
Colorear	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 13 - composición en gel para el tratamiento de encías dañadas

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,500%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,350%
Palmitato de ascorbilo	0,025%
Xilitol	7,500%
Sal sódica de carboximetilcelulosa	4,000%
Alcohol polivinílico	0,100%
Policarbófilo	0,100%
Copolímero VP/eicoseno	0,100%
Copolímero PVM/MA	0,150%
PVP (polivinilpirrolidona)	0,500%
Agente solubilizante	q.s.
Conservante	q.s.
Aromatizante	q.s.
Colorear	q.s.
Agua desmineralizada	q.s. a 100

Ejemplo 14 - Pesario vaginal

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,100%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,200%
Palmitato de ascorbilo	0,045%
Carboximetil quitosano	0,050%

Carboximetil beta glucano	0,050%
Gelatina	20,000%
Glicerol	70,000%
Agua desmineralizada	q.s. al 100%

Ejemplo 15 - Composición de enema anorrectal

Compuesto	Porcentaje
Alfoscerato de colina	0,300%
Hialuronato sódico (MW medio 1.500.000 Da)	0,300%
Palmitato de ascorbilo	0,050%
Dióxido de silicio coloidal	1,700%
Polivinilpirrolidona	0,840%
Carboximetilcelulosa	0,840%
Policarbófilo	0,100%
Carboximetil quitosano	0,050%
Benzoato de sodio	0,400%
Metabisulfito de potasio	0,250%
Ácido fosfórico	0,100%
Agua desmineralizada	q.s. a 100

Ejemplo 16. Estudio de la degradación enzimática del ácido hialurónico en formulaciones que contienen glicerofosfocolina y palmitato de ascorbilo

- 5 El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de la degradación enzimática de dos lotes diferentes de Ácidos Hialurónicos (AH) operada por Hialuronidasa, familia de enzimas que catalizan la degradación de este polisacárido, en formulaciones conteniendo diferentes ingredientes. La distribución del peso molecular de los ácidos degradados se analizará por medio de cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento acoplada a una matriz de detectores triples (HP-SEC-TDA).

La siguiente es la lista de reactivos y materiales utilizados:

- 10 – Ácido hialurónico (Mw 1.348.000 Da), Contipro a.s. (República Checa)
 – Ácido hialurónico (Mw 1.450.000 Da), Lehvoss Italia S.r.l. (Italia)
 – Glicerofosfocolina
 – Palmitato de ascorbilo
 – Ácido cítrico monohidratado, Sigma Aldrich
 15 – H₂O desionizado obtenido con un aparato Culligan;
 – Hialuronidasa de testículos bovinos Tipo I-S. 400-1000 unidades/mg. Sigma Aldrich;
 – NaNO₃. Sigma Aldrich;
 – NaN₃. Sigma Aldrich;
 – Vial Snap-it 0,3 ml, 11,6 x 32 mm. Thermo Scientific;
 20 – Tapón Snap-it 11 mm, Thermo Scientific;
 – Citrato sódico dihidratado, Sigma Aldrich.

Muestras preparadas y probadas:

- 25 HA Contipro (solución A): se disolvieron unos 50 mg de muestra de HA en 50 ml de tampón citrato (pH=6,06) y se agitó durante 16 horas a 38°C; la concentración de la solución de ácido hialurónico es de aproximadamente 1mg/ml. se hidrolizaron 10 ml de solución.

Levhoss HA (solución B): se disolvieron unos 50 mg de muestra de HA en 50 ml de tampón citrato (pH=6,06) y se agitó durante 16 horas a 38°C; la concentración de la solución de ácido hialurónico es de aproximadamente 1mg/ml. se hidrolizaron 10 ml de solución.

HA Contipro + GPC (solución C): 7.se añadieron 5 mg de glicerosfosfocolina a 10 ml de solución A.

5 HA Levhoss + GPC (solución D): 7.se añadieron 5 mg de glicerosfosfocolina a 10 ml de solución B.

HA Contipro + GPC + AP (solución E): se añadieron 5 mg de palmitato de ascorbilo y 7,5 mg de glicerosfosfocolina a 10 ml de solución A.

HA Levhoss + GPC + AP (solución F): se añadieron 5 mg de palmitato de ascorbilo y 7,5 mg de glicerosfosfocolina a 10 ml de solución B.

10 **Preparación de la solución tampón:**

Solución 1: se disolvieron 420 mg de ácido cítrico monohidratado en 100 ml de agua desionizada a temperatura ambiente durante 30'.

Solución 2: 9.se disolvieron 212 g de citrato de sodio dihidratado en 100 ml de agua desionizada a temperatura ambiente durante 30'.

15 Solución tampón: Se ha añadido la Solución 1 a la Solución 2 y se ha agitado a temperatura ambiente durante 30'. PH resultante=6,06.

Preparación de la solución enzimática:

Hialuronidasa: se disolvieron aproximadamente 10mg de hialuronidasa en aproximadamente 1ml de H₂O y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas (10mg/ml).

20 **Procedimiento de degradación enzimática:**

Las soluciones se agitaron a 38°C en un baño de aceite durante aproximadamente 1h antes de añadir 67µl de la solución enzimática (HA/Hialuronidasa 15/1 p/p).

25 Se recogieron diferentes alícuotas de soluciones a diferentes tiempos (1 hora; 2 horas; 3 horas; 4 horas; 5 horas; 6 horas, 24 horas) y se calentaron a 100°C durante 5 minutos mediante el uso de un termoagitador para desnaturalizar la enzima. Las soluciones se filtraron para eliminar la enzima precipitada (filtro LLG-Syringe CA de tamaño de poro 0,20 µm. Ø 13 mm). Antes de los análisis HP-SEC-TDA, las soluciones se diluyeron a 0,5 mg/ml de HA con fase móvil.

Análisis HP-SEC-TDA

Condiciones cromatográficas

Se utilizaron dos instrumentos HP-SEC-TDA equivalentes:

30 1) Se utilizó el sistema Viscotek modelo TDA305 equipado con detectores de índice de refracción, dispersión de luz en ángulo recto y bajo y viscosímetros, en las siguientes condiciones:

Columnas: 2 columnas TSKGMPWXI, 13 µm. 7 mm ID x 30 cm L. Tosoh Bioscience;
Fase móvil: 0,1 M NaNO₃ + NaN₃ 0,05 %;
Volumen de inyección: 100 µl;
35 Temperatura: 40 °C;
Caudal: 0,6 ml/min.

2) Se utilizó el sistema multidetector OmniSEC (Malvern Instruments Ltd. UK) equipado con detectores de índice de refracción, dispersión de luz en ángulo recto y bajo y viscosímetros, en las condiciones siguientes:

40 Columnas: 2 columnas TSKGMPWXI, 13 µm. 7 mm ID x 30 cm L. Tosoh Bioscience;
Fase móvil: 0,1 M NaNO₃ + NaN₃ 0,05 %;
Volumen de inyección: 100 µl;
Temperatura: 40 °C;
Caudal: 0,6 ml/min.

45 Los sistemas se calibraron con Pullulan estándar, con peso molecular índice de polidispersidad y viscosidad intrínseca certificados (PolyCAL-PullulanSTD-Malvern Panalytical).

Elaboración de cromatogramas

Los cromatogramas del TDA 305 fueron adquiridos y elaborados mediante el uso del software OmniSEC versión 4.6.2. mientras que los cromatogramas del Sistema Multidetector OmniSEC fueron adquiridos y elaborados mediante el uso del software OmniSEC versión 10.10.

Resultados

5 Evaluación de la distribución del peso molecular

- Inicio Preparación de la muestra

Se disolvieron unos 50 mg de ácido hialurónico en 50 ml de tampón citrato, se agitaron durante 16 h, se diluyeron a 0,5 mg/ml con fase móvil y se inyectaron una vez. A fin de evaluar la distribución del peso molecular del ácido hialurónico, se utilizó el valor 0,155 dn/dc conocido por la bibliografía (ref. Theisen A. Johann C. Deacon MP. Harding SE. Libro de datos sobre el incremento refractivo. Nottingham University Press. 2000).

La muestra de HA tiene un tiempo de elución entre 10 y 15 ml con un gran pico cromatográfico en forma de campana índice de un valor de índice de polidispersión bastante alto. Después del pico HA, se eluyen los perfiles de la fase móvil.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los análisis en términos de peso molecular medio en peso (Mw Da), peso molecular medio en número (Mn. Da), peso molecular pico (Mp. Da), e índice de polidispersión (Mw/Mn); además, gracias a la técnica TDA, valor de viscosidad intrínseca ([η], dl/g) radio hidrodinámico (Rh, nm) y % de recuperación. También se indican los valores de a y $\log k$, que representan respectivamente las constantes de pendiente e intercepción de la curva de Mark-Houwink; los resultados son la media de dos análisis diferentes y los valores de Mn y Mw están redondeados a los miles Da.

Tabla 1. Resultados HP-SEC-TDA HA de las muestras HA

Muestra	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	MH α	MH logk	[η] dl/g	Rh (nm)	Recuperación
HA Contipro	1,034 kDa	1,348 kDa	1,3	0,65	-2,68	19,32	72,72	84,38
HA Lehvoss	1,097 kDa	1,450 kDa	1,32	0,66	-2,74	20,07	75,49	81,72

Muestras de hidrólisis enzimática

La acción de la hialuronidasa sobre los ácidos hialurónicos ha sido ampliamente estudiada e informada; para estudiar la actividad enzimática de la hialuronidasa sobre las muestras preparadas, se monitorizó la cinética de la hidrólisis por medio de la técnica HP-SEC-TDA. La disminución porcentual del peso molecular (en términos de M_w) del componente del polisacárido se determinó por medio de la siguiente fórmula:

$$((M_{wt0} - M_{wtn}) * 100) / M_{wt0}$$

en la que M_{wt0} es el peso molecular medio ponderal (M_w) en el momento 0 y M_{wtn} es el M_w en el momento n.

HP-SEC-TDA Degradación de HA con hialuronidasa

Las muestras han sido hidrolizadas dos veces, para verificar la reproducibilidad. En las tablas siguientes se indican los valores medios del peso molecular (redondeados a la centena) y las correspondientes disminuciones porcentuales de ambos experimentos.

Tabla 2. HP-SEC-TDA Degradación de HA (solución A)

Tiempo	M_w (Da)	% de disminución de M_w
0	1.348.000	0
1h	267.700	63%
2h	140.850	90%
3h	104.000	92%
4h	76.610	94%
5h	64.590	95%

ES 2 986 010 T3

17h	23.620	98%
24h	23.920	98%

Tabla 3. HP-SEC-TDA Degradación de HA (solución B)

Tiempo	M _w (Da)	% de disminución de M _w
0	1.450.000	0
1h	213.500	86%
2h	107.595	93%
3h	74.920	95%
4h	59.620	96%
5h	50.480	97%
17h	18.200	99%
24h	24.980	98%

Tabla 4. HP-SEC-TDA Degradación de HA (solución C)

Tiempo	M _w (Da)	% de disminución de M _w
0	1.348.000	0%
1h	269.500	80%
2h	169.200	87%
3h	95.840	93%
4h	92.710	93%
5h	85.790	94%
24h	29.100	98%

Tabla 5. HP-SEC-TDA Degradación de HA (solución D)

Tiempo	M _w (Da)	% de disminución de M _w
0	1.450.000	0
1h	191.500	87%
2h	117.300	92%
3h	59.680	96%
4h	54.650	96%
5h	52.880	96%
24h	16.790	99%

Tabla 6. HP-SEC-TDA Degradación de HA (solución E)

Tiempo	M _w (Da)	% de disminución de M _w
0	1.348.000	0%

1h	716.200	47%
3h	698.900	48%
5h	692.100	49%
20h	394.500	71%
24h	382.000	72%

Tabla 7. HP-SEC-TDA Degradación de HA (solución F)

Tiempo	M _w (Da)	% de disminución de M _w
0	1.450.000	0%
1h	571.100	61%
3h	556.700	62%
5h	552.000	62%
20h	344.300	76%
24h	336.400	77%

Conclusiones

5 Ambas muestras de Ácido Hialurónico como tal, en presencia de Hialuronidasa, se degradan rápidamente hasta un 95-97% en 5 horas. El ácido hialurónico Lehvoss se degrada ligeramente más rápido que el ácido hialurónico Contipro, aunque después de 24 horas la disminución de Mw es bastante igual.

La glicerofosocolina no contribuye de ninguna manera a la cinética enzimática, tal como lo demuestran los resultados de las soluciones C y D.

Por el contrario, la adición de palmitato de ascorbilo ha demostrado ser significativamente eficaz para ralentizar la cinética enzimática y reducir la degradación indeseada de HA.

10 En efecto, después de 5 horas, todas las soluciones A a D han mostrado una degradación de la HA de hasta 97%, mientras que las soluciones E y F que contienen palmitato de ascorbilo han mostrado una degradación de la HA de 49% y 62%, respectivamente (en coherencia con las diferentes tasas de degradación observadas para los productos de HA como tales, es decir, la solución A y la solución B). Esto supone una mejora respecto a las soluciones sin palmitato de ascorbilo de hasta el 50%.

15 Después de 24 h, las soluciones E y F con palmitato de ascorbilo han mostrado una degradación de HA del 72% y 77%, respectivamente. Esto supone una mejora respecto a las soluciones sin palmitato de ascorbilo de hasta el 27%.

REIVINDICACIONES

1. Composiciones mucoadhesivas tópicas que comprenden ácido hialurónico o una sal del mismo, alfoscerato de colina, palmitato de ascorbilo en una concentración comprendida entre 0,050% p/p y 0,0004% p/p, y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. Composiciones de acuerdo con la reivindicación 1, en las que el ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un peso molecular que oscila entre 800.000 y 4.000.000 Da.
3. Composiciones de acuerdo con la reivindicación 2, en las que el ácido hialurónico está en forma de sal sódica en una concentración que oscila entre 20,000% p/p y 0,0005% p/p.
- 10 4. Composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las que la concentración de alfoscerato de colina está comprendida entre 0,0005% p/p y 10,000% p/p.
5. Composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que el excipiente o portador farmacéuticamente aceptable se selecciona entre beta-glucano, beta-glucano carboximetil sódico, quitosano, carboximetil quitosano, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carbómero, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, policarbofilo, copolímero PVM/MA (copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico) y copolímero VP/eicoseno (1-vinil-2-pirrolidinona - 1-eicoseno (1:1)).
- 15 6. Composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en forma de hidrogeles, lipogeles, geles anhidros, emulsiones O/W o W/O, soluciones o suspensiones.
7. Las composiciones de las reivindicaciones 1-5 para uso tópico para el mantenimiento y la restauración de la integridad de las membranas mucosas y la piel y para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias que las afectan.
- 20 8. Composiciones de uso de acuerdo con la reivindicación 7, en las que las mucosas comprenden la mucosa oral, gingival, nasal, ocular, aural, vaginal, vulvar, anorrectal y genital.