

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 871 199**

51 Int. Cl.:

A61K 31/728 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2016 PCT/US2016/052743**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017 WO17053339**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2016 E 16778947 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 3352766**

54 Título: **Composiciones de hialuronano de alta elasticidad y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

24.09.2015 US 201562232364 P

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

28.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BELMONTE, CARLOS y
DENLINGER, JANET L.**

74 Agente/Representante:

TORO GORDILLO, Ignacio

ES 2 871 199 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 de alta elasticidad y métodos de uso de las mismas

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos N.º de Serie 62/232.364, presentada el 24 de septiembre de 2015.

10 **Antecedentes de la invención**

El hialuronano o ácido hialurónico (AH) es un polisacárido lineal de alto peso molecular promedio que se distribuye ampliamente en los tejidos conjuntivos, epiteliales y neuronales. El AH se encuentra principalmente en la matriz extracelular y pericelular, pero también se ha demostrado que aparece intracelularmente. Las funciones biológicas del AH incluyen el mantenimiento de la elastoviscosidad de los tejidos conjuntivos fluidos, tales como el líquido sinovial en las articulaciones y el humor vítreo del ojo, del control de la hidratación de los tejidos y del transporte de agua, del ensamblaje supramolecular de proteoglucanos en la matriz extracelular, y de numerosas funciones mediadas por receptores en la separación, mitosis y migración celular y desarrollo de tumores.

Algunos de los usos conocidos del AH incluyen el tratamiento de afecciones relacionadas con la xeroftalmia (también denominada queratoconjuntivitis seca o sequedad ocular), en el cuidado de la piel como rellenos dérmicos y para promover la cicatrización. Frecuentemente, las afecciones relacionadas con la xeroftalmia, el cuidado de la piel/procedimientos dermatológicos y la cicatrización, están asociados a dolor y malestar que normalmente requieren una administración distinta de un medicamento analgésico. Las formulaciones de AH que se usan actualmente para tratar las afecciones anteriores no son eficaces para tratar el dolor tópico. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de métodos para tratar, de una manera eficaz, afecciones relacionadas con la xeroftalmia, para minimizar las imperfecciones de la piel con dispositivos de aumento inyectables y para promover la cicatrización al mismo tiempo que se alivia el dolor asociado a estas afecciones.

30 **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 AH, por ejemplo, composiciones que tienen concentraciones de AH de aproximadamente 30 mg/ml (aproximadamente 3 % en peso/volumen) o mayores, se pueden usar de una manera eficaz para aliviar el dolor y el malestar asociados a afecciones relacionadas con la xeroftalmia.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría específica, se cree que la eficacia de las composiciones de AH de la invención, que comprenden altas concentraciones de AH para tratar el dolor y el malestar, está determinada por su alta elasticidad, tal cual demuestra el alto valor del módulo de elasticidad G' . También se cree, sin desear quedar ligado a ninguna teoría específica, que la eficacia de las composiciones de AH de la invención, está determinada por una probabilidad relativamente alta de interacción de las moléculas de AH con canales transductores del dolor, tal como TRPV1, reduciendo así la excitabilidad de nociceptores.

Por consiguiente, la presente invención proporciona las composiciones de AH reivindicadas para su uso en un método para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia en un sujeto que lo necesite. El método comprende administrar al ojo del sujeto una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende hialuronano, en donde: el hialuronano está presente en la composición a una concentración superior a aproximadamente 30 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 35 mg/ml o mayor, aproximadamente 40 mg/ml o mayor, aproximadamente 45 mg/ml o mayor, aproximadamente 50 mg/ml o mayor, aproximadamente 55 mg/ml o mayor, aproximadamente 60 mg/ml o mayor, aproximadamente 65 mg/ml o mayor, aproximadamente 70 mg/ml o mayor, aproximadamente 75 mg/ml o mayor, aproximadamente 80 mg/ml o mayor, aproximadamente 85 mg/ml o mayor, aproximadamente 90 mg/ml o mayor, aproximadamente 95 mg/ml o mayor o aproximadamente 100 mg/ml o mayor; el hialuronano tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 millones; y el hialuronano no está reticulado y/o carece de modificaciones químicas, aliviando así el dolor y el malestar en el sujeto.

En otro aspecto, el hialuronano está presente en la composición a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml.

En algunas realizaciones, la presente invención también proporciona las composiciones de AH reivindicadas para su uso en un método para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al ojo del sujeto una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende hialuronano, en donde: el hialuronano está presente en la composición a una concentración de al menos aproximadamente 40 mg/ml; el hialuronano tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 millones; y el hialuronano no está reticulado y/o carece de modificaciones

químicas, aliviando así el dolor y el malestar en el sujeto.

En algunas realizaciones, la composición carece de otras sustancias farmacéuticamente activas.

- 5 En determinados aspectos, la composición no comprende un poliglicol.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un tampón, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS, siglas del inglés *phosphate buffered saline*).

- 10 En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos aproximadamente 200 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; de al menos aproximadamente 1000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; de al menos aproximadamente 2000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; o de al menos aproximadamente 4000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.

- 15 En algunas realizaciones, la composición está en forma de un gel, una pomada, un linimento, una loción o una crema.

En algunos aspectos, la composición se administra en la superficie ocular, tal como debajo del párpado, por ejemplo, debajo del párpado superior o inferior, del sujeto o en la interfaz córnea-párpado.

- 20 En determinadas realizaciones, la composición se administra al sujeto inmediatamente antes de descansar o dormir.

En algunos aspectos, la composición se administra sin que el sujeto reciba una inyección en el ojo.

- 25 En algunos aspectos, la composición se administra usando un envase, por ejemplo, un envase de dosis única, tal como un frasco, un tubo, un tubo sin aire de plástico blando, una copa, un gotero o un cartucho ocular.

- 30 En algunas realizaciones, la afección relacionada con la xeroftalmia está asociada a uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en sequedad ocular; disminución de la producción, del volumen y del flujo lagrimal; composición lagrimal anómala; aumento de la osmolaridad lagrimal; queratitis; coloración de la conjuntiva y la córnea; enrojecimiento; visión borrosa; disminución del tiempo de rotura de la película lagrimal; aumento del enrojecimiento de la conjuntiva; exceso de suciedad en la película lagrimal, arenilla ocular; ardor ocular; sensación de cuerpo extraño en el ojo; lagrimeo excesivo; fofobia; escozor ocular; deterioro refractivo; sensibilidad ocular; e irritación ocular. En otras realizaciones, la afección relacionada con la xeroftalmia está asociada a una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno autoinmunitario; una cirugía ocular; ingestión de un medicamento; condiciones ambientales secas; uso prolongado de ordenador; cansancio ocular; uso prolongado de lentillas, sensibilidad en la córnea; cierre parcial del párpado; irregularidades en la superficie; irregularidades en el párpado; y una afección asociada a dolor nociceptivo en la córnea asociado a lesión en la córnea o una afección asociada a dolor neuropático. En una realización adicional, la afección relacionada con la xeroftalmia está asociada a una cirugía ocular, y la cirugía ocular se selecciona del grupo que consiste en cirugía fotorrefractiva, tal como queratectomía fotorrefractiva (PRK, por sus siglas en inglés *photorefractive keratectomy*), cirugía de cataratas, cirugía de desprendimiento de retina, queratomileusis *in situ* asistida por láser (LASIK, *laser-assisted in situ keratomileusis*) y cualquier procedimiento quirúrgico de la córnea que implique daño a los nervios sensoriales de la córnea. En una realización adicional, la afección relacionada con la xeroftalmia está asociada a una afección asociada a dolor neuropático, por ejemplo, una catarata o un desprendimiento de retina, o una cirugía diseñada para tratar una catarata o un desprendimiento de retina.

- 50 En algunos aspectos, la composición se administra diariamente durante 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas o 10 semanas. En otros aspectos, se consigue una mejoría de larga duración, por ejemplo, de 8 horas, 12 horas, 24 horas, 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 14 días o 28 días, del dolor y malestar en el sujeto.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

- 55 En algunas realizaciones, la otra sustancia farmacéuticamente activa es un anestésico local, por ejemplo, lidocaína o bupivacaína.

En determinados aspectos, la composición también comprende un tampón, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS).

- 60 En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos aproximadamente 200 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; de al menos aproximadamente 1000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; de al menos aproximadamente 2000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; o de al menos aproximadamente 4000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.

- 65 En algunos aspectos, la composición es estéril.

En algunos aspectos, la composición se administra mediante una inyección usando una jeringa precargada, por ejemplo, una jeringa precargada de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ml. En un aspecto adicional, la jeringa precargada está esterilizada.

- 5 En algunos aspectos, la composición carece sustancialmente de otras sustancias farmacéuticamente activas, tales como anestésicos locales, por ejemplo, lidocaína o bupivacaína.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un tampón, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS).

- 10 En algunos aspectos, la composición tiene una elasticidad de al menos aproximadamente 200 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; de al menos aproximadamente 1000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; de al menos aproximadamente 2000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; o de al menos aproximadamente 4000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.

- 15 En algunas realizaciones, la composición es estéril.

En determinadas realizaciones, la composición se administra por vía tópica.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un gráfico que muestra la presión necesaria para eyectar una solución de AH al 4 % a través de agujas de diferentes tamaños.

25 **Descripción detallada de la invención**

- La presente invención proporciona las composiciones de AH reivindicadas para su uso en métodos para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia. Los métodos actualmente reivindicados comprenden administrar composiciones de AH que comprenden altas concentraciones de hialuronano (AH), por ejemplo, superior a aproximadamente 30 mg/ml o mayor. Se determinó que dichas composiciones tenían alta elasticidad, por ejemplo, alto módulo de elasticidad G' , cuando se medía a frecuencias de 0,1 a 10 Hz. Las composiciones de AH caracterizadas por una alta elasticidad, por ejemplo, composiciones que comprenden altas concentraciones de AH, son inesperadamente eficaces para aliviar el dolor y el malestar resultantes de una afección relacionada con la xeroftalmia. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría específica, se cree que la eficacia de las composiciones de AH de la invención que comprenden altas concentraciones de AH para tratar el dolor y el malestar, está determinada por su alta elasticidad, tal cual demuestra el alto valor del módulo de elasticidad G' . También se cree, sin desear quedar ligado a ninguna teoría específica, que la eficacia de las composiciones de AH de la invención, está determinada por una probabilidad relativamente alta de interacción de las moléculas de AH con canales transductores del dolor, tal como TRPV1, reduciendo así la excitabilidad de nociceptores. El peso molecular medio del AH usado en los métodos de la invención puede ser de 2 millones o inferior, por ejemplo, entre aproximadamente 1-2 millones.

1. Composiciones de hialuronano para su uso en los métodos de la invención

- 45 La presente invención proporciona métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite composiciones que comprenden hialuronano (AH). En algunas realizaciones, la composición comprende hialuronano, en donde el hialuronano está presente en la composición a una concentración superior a aproximadamente 30 mg/ml (o superior a aproximadamente 3 % peso/volumen); el hialuronano tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 millones; y el hialuronano no está reticulado y/o carece de modificaciones químicas.

- 50 Por ejemplo, la concentración de hialuronano en la composición puede ser de aproximadamente 30 mg/ml (o de aproximadamente 3 % p/v), de aproximadamente 35 mg/ml (o de aproximadamente 3,5 % p/v), de aproximadamente 40 mg/ml (o de aproximadamente 4 % p/v), de aproximadamente 45 mg/ml (o de aproximadamente 4,5 % p/v), de aproximadamente 50 mg/ml (o de aproximadamente 5 % p/v), de aproximadamente 55 mg/ml (o de aproximadamente 5,5 % p/v), de aproximadamente 60 mg/ml (o de aproximadamente 6 % p/v), de aproximadamente 65 mg/ml (o de aproximadamente 6,5 % p/v), de aproximadamente 70 mg/ml (o de aproximadamente 7 % p/v), de aproximadamente 75 mg/ml (o de aproximadamente 7,5 % p/v), de aproximadamente 80 mg/ml (o de aproximadamente 8 % p/v), de aproximadamente 85 mg/ml (o de aproximadamente 8,5 % p/v), de aproximadamente 90 mg/ml (o de aproximadamente 9 % p/v), de aproximadamente 95 mg/ml (o de aproximadamente 9,5 % p/v), de aproximadamente 100 mg/ml (o de aproximadamente 10 % p/v), de aproximadamente 105 mg/ml (o de aproximadamente 10,5 % p/v), de aproximadamente 110 mg/ml (o de aproximadamente 11 % p/v), de aproximadamente 115 mg/ml (o de aproximadamente 11,5 % p/v), de aproximadamente 120 mg/ml (o de aproximadamente 12 % p/v), de aproximadamente 125 mg/ml (o de aproximadamente 12,5 % p/v), de aproximadamente 130 mg/ml (o de aproximadamente 13 % p/v), de aproximadamente 135 mg/ml (o de aproximadamente 13,5 % p/v), de aproximadamente 140 mg/ml (o de aproximadamente 14 % p/v), de

aproximadamente 145 mg/ml (o de aproximadamente 14,5 % p/v) o aproximadamente 150 mg/ml (o de aproximadamente 15 % p/v). En una realización específica, el AH está presente en la composición a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml (o de aproximadamente 4 % p/v). En otras realizaciones específicas, el AH está presente en la composición de la invención a una concentración de aproximadamente 41 mg/ml (o de aproximadamente 4,1 % p/v), de aproximadamente 42 mg/ml (o de aproximadamente 4,2 % p/v), de aproximadamente 43 mg/ml (o de aproximadamente 4,3 % p/v), de aproximadamente 44 mg/ml (o de aproximadamente 4,4 % p/v), de aproximadamente 45 mg/ml (o de aproximadamente 4,5 % p/v), de aproximadamente 46 mg/ml (o de aproximadamente 4,6 % p/v), de aproximadamente 47 mg/ml (o de aproximadamente 4,7 % p/v), de aproximadamente 48 mg/ml (o de aproximadamente 4,8 % p/v), de aproximadamente 49 mg/ml (o de aproximadamente 4,9 % p/v), de aproximadamente 50 mg/ml (o de aproximadamente 5,0 % p/v), de aproximadamente 51 mg/ml (o de aproximadamente 5,1 % p/v), de aproximadamente 52 mg/ml (o de aproximadamente 5,2 % p/v), de aproximadamente 53 mg/ml (o de aproximadamente 5,3 % p/v), de aproximadamente 54 mg/ml (o de aproximadamente 5,4 % p/v), de aproximadamente 55 mg/ml (o de aproximadamente 5,5 % p/v), de aproximadamente 56 mg/ml (o de aproximadamente 5,6 % p/v), de aproximadamente 57 mg/ml (o de aproximadamente 5,7 % p/v), de aproximadamente 58 mg/ml (o de aproximadamente 5,8 % p/v), de 59 mg/ml (o de aproximadamente 5,9 % p/v) o de aproximadamente 60 mg/ml (o de aproximadamente 6 % p/v).

En algunos ejemplos, la concentración de hialuronano en la composición puede ser superior a aproximadamente 30 mg/ml (o de aproximadamente 3 % p/v), por ejemplo, superior a aproximadamente 31 mg/ml (o de aproximadamente 3,1 %), superior a aproximadamente 32 mg/ml (o de aproximadamente 3,2 %), superior a aproximadamente 33 mg/ml (o de aproximadamente 3,3 %), superior a aproximadamente 34 mg/ml (o de aproximadamente 3,4 %), superior a aproximadamente 35 mg/ml (o de aproximadamente 3,5 %), superior a aproximadamente 36 mg/ml (o de aproximadamente 3,6 %), superior a aproximadamente 37 mg/ml (o de aproximadamente 3,7 %), superior a aproximadamente 38 mg/ml (o de aproximadamente 3,8 %) o superior a aproximadamente 39 mg/ml (o de aproximadamente 3,9 %).

En algunos ejemplos, la concentración de hialuronano en la composición puede tener un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 millones; por ejemplo, entre aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2 millones, entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2 millones, entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 2 millones, entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 2 millones, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2 millones o entre aproximadamente 1,6 y aproximadamente 2 millones.

En determinadas realizaciones, el hialuronano usado en las composiciones no está reticulado y/o carece de modificaciones químicas. Por ejemplo, el hialuronano usado en las composiciones carece amidación que puede formarse por una reacción entre el grupo carboxilo del AH 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 también puede carecer 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 Estados Unidos N.º 8.323.617. En algunos casos, el hialuronano usado en las composiciones también puede carecer de acrilatos, por ejemplo, metacrilatos, como se describe en la publicación de Estados Unidos N.º 2010/0048755; sulfatos, como se describe, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos N.º 2013/0209531; y deuterio, como se describe, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos N.º 2015/0148310.

En algunas realizaciones, las composiciones de AH de la invención carecen de otras sustancias farmacéuticamente activas. Como se usa en el presente documento, una "sustancia farmacéuticamente activa" es una sustancia que es capaz de ejercer un efecto biológico en un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano o animal. La expresión "sustancia farmacéuticamente activa" también comprende sustancias que pueden modular el efecto biológico de una composición de AH cuando la composición se administra a un sujeto, por ejemplo, aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xerofthalmia; un cuidado de la piel/tratamiento dermatológico o una cicatrización. En determinadas realizaciones, la sustancia farmacéuticamente activa es una proteína, por ejemplo, una proteína morfogenética ósea (BMP, siglas del inglés *bone morphogenic protein*), tal como rhGDF-5. En determinadas realizaciones, la sustancia farmacéuticamente activa es un glucosaminoglucano (GAG) que es diferente del AH, 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 algunos casos, la sustancia farmacéuticamente activa es un agonista de receptores purinérgicos, por ejemplo, un agonista del receptor P2Y₂.

En determinadas realizaciones, las composiciones de AH de la invención carecen de moléculas capaces de eliminar radicales libres, tales como un poliol, por ejemplo, sorbitol, maltitol, xilitol o isomalt. En otras realizaciones, las composiciones de AH usadas en los métodos de la invención carecen de moléculas que disminuyen la elasticidad del AH, por ejemplo, dextrano o sacarosa.

En algunos casos, las composiciones de AH usadas en los métodos de la invención carecen de poliglicol, por ejemplo, polietilenglicol.

- Una composición de AH puede consistir esencialmente en AH presente a una concentración superior a aproximadamente 30 mg/ml (aproximadamente 3 % p/v) o aproximadamente 40 mg/ml (aproximadamente 4 % p/v) en un tampón fisiológico, por ejemplo, un tampón de fosfato o un tampón de bicarbonato y tener un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 millón y aproximadamente 2 millones.
- 5 usada en los métodos de la invención consiste esencialmente en AH presente a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml (o aproximadamente 4 % p/v) y tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 millón y aproximadamente 2 millones.
- 10 El hialuronano presente en las composiciones usadas en los métodos de la invención puede tener una elasticidad de al menos 100 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz o una elasticidad de al menos 400 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz o una elasticidad de al menos 1000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz o una elasticidad de al menos 2000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz o una elasticidad de al menos 4000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz o una elasticidad de entre 400 y 5000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.
- 15 Debe apreciarse que, para medir la elasticidad de un biopolímero, tal como hialuronano, se dispone de una variedad de métodos. En una realización, la elasticidad de las composiciones que comprenden hialuronano se mide como presión (expresada en pascales) a una frecuencia específica (expresada en hercios). Por ejemplo, las frecuencias que pueden usarse para evaluar la elasticidad de las composiciones de hialuronano proporcionadas en el presente documento, pueden medirse a 0,5 Hz, 2,5 Hz o 5,0 Hz.
- 20 Debe apreciarse además que la elasticidad puede expresarse en cualquier frecuencia relevante. Por tanto, por ejemplo, en una realización, la elasticidad se expresa basándose en una frecuencia 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 basándose en una frecuencia 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.
- 25 En una realización, una composición que comprende hialuronano para su uso en los métodos actualmente reivindicados tiene una elasticidad de al menos 100 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 300 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 350 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz.
- 30 En una realización adicional, una composición que comprende hialuronano tiene una elasticidad de al menos 400 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 750 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de al menos 900 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz.
- 35 En otra realización, una composición que comprende hialuronano 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.
- 40 En otra realización adicional, una composición que comprende hialuronano 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.
- 45 En una realización, una composición que comprende hialuronano 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.
- 50 En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 100 y 10 000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 400 y 5000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 1000 y 2000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.
- 55 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 6000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 1500 y 4000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 2,5 Hz.
- 60 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
- 65

7000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz. En algunas realizaciones, la composición tiene una elasticidad de entre 2000 y 5000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 5,0 Hz.

En algunas realizaciones, la elasticidad puede medirse usando un dispositivo adecuado (por ejemplo, un reómetro). Por ejemplo, la elasticidad puede medirse usando un reómetro Stresstech para investigación a alta resolución (Reologica Instruments AB). Normalmente, la elasticidad se determina a temperatura y presión ambiental; sin embargo, debería apreciarse que la elasticidad también puede medirse a temperatura y/o presión no ambiental. Debe apreciarse además que un experto habitual 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 ambiental.

Se pueden preparar composiciones de hialuronano de alta elasticidad aumentando la concentración de hialuronano en la composición. Por tanto, en un aspecto, los métodos actualmente reivindicados utilizan composiciones que tienen alta elasticidad que comprenden un alto porcentaje de hialuronano. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender al menos 3,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 3,5 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 4,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 4,5 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 5,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 5,5 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 6,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 6,5 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 7,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 7,5 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 8,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 8,5 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 8,9 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 9,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 10,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 11,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 12,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 13,0 % de hialuronano (peso por volumen), al menos 14,0 % de hialuronano (peso por volumen) o al menos 15,0 %, o más, de hialuronano (peso por volumen).

También se pretende que los intervalos intermedios a los valores enumerados se incluyan en las composiciones para su uso en los métodos de esta invención. Por ejemplo, el contenido de hialuronano en las composiciones puede ser de entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 15 % (peso/volumen), entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 10 % (peso/volumen), aproximadamente 3,5 % y aproximadamente 9 % (peso/volumen), aproximadamente 4 % y aproximadamente 8 % (peso/volumen) o aproximadamente 5 % y aproximadamente 7 % (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 habitual en la técnica sabría cómo convertir los diversos medios para expresar la cantidad de hialuronano en un volumen particular.

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, por ejemplo, dolor asociado a una afección relacionada con la xerofthalmia, un tratamiento cosmético o una cicatrización. Por tanto, el hialuronano comprendido en las composiciones de AH descritas en el presente documento puede tener un peso molecular promedio que se encuentre en el intervalo de entre 1 y 2 millones y que también sea inferior a 2 millones, inferior a 1,9 millones, inferior a 1,8 millones, inferior a 1,7 millones, inferior a 1,6 millones, inferior a 1,5 millones, inferior a 1,4 millones, inferior a 1,3 millones, inferior a 1,2 millones, inferior a 1,1 millones, inferior a 1 millón, inferior a 0,9 millones, inferior a 0,8 millones, inferior a 0,7 millones, inferior a 0,6 millones o inferior a 0,5 millones. En otros casos, el hialuronano comprendido en las composiciones de AH descritas en el presente documento puede tener un peso molecular promedio que se encuentre en el intervalo de entre 1 y 2 millones y que también sea superior a 0,1 millones, superior a 0,2 millones, superior a 0,3 millones, superior a 0,4 millones, superior a 0,5 millones, superior a 0,6 millones, superior a 0,7 millones, superior a 0,8 millones, superior a 0,9 millones, superior a 1 millón, superior a 1,1 millones, superior a 1,2 millones, superior a 1,3 millones, superior a 1,4 millones, superior a 1,5 millones, superior a 1,6 millones, superior a 1,7 millones, superior a 1,8 millones o superior a 1,9 millones.

También se pretende que los rangos intermedios a los valores enumerados sean parte de esta invención. Por ejemplo, en las composiciones de hialuronano proporcionadas en el presente documento, el peso molecular promedio del hialuronano está comprendido 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 descritas en el presente documento, la mayoría del hialuronano presente en la composición se encuentra dentro del intervalo de peso molecular promedio descrito en el presente documento. Por tanto, 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 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 el presente documento se encuentra en el intervalo de peso molecular promedio mencionado. En algunas realizaciones, al menos el 60 % del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en el presente documento se encuentra en el intervalo de peso molecular promedio mencionado. En algunas realizaciones, al menos el 70 % del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en el presente documento se encuentra en el intervalo de peso molecular promedio mencionado. En algunas

realizaciones, al menos el 80 % del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en el presente documento se encuentra en el intervalo de peso molecular promedio mencionado. En algunas realizaciones, al menos el 90 % del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en el presente documento se encuentra en el intervalo de peso molecular promedio mencionado. En algunas realizaciones, al menos el 95 % del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en el presente documento se encuentra en el intervalo de peso molecular promedio mencionado. En algunas realizaciones, al menos el 98 % del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en el presente documento se encuentra en el intervalo de peso molecular promedio mencionado. En algunas realizaciones, al menos el 99 % del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en el presente documento se encuentra en el intervalo de peso molecular promedio mencionado. En algunas realizaciones, al menos el 99,9 % del hialuronano presente en las composiciones proporcionadas en el presente documento se encuentra dentro del intervalo de peso molecular promedio mencionado.

II. Fuentes de hialuronano

El hialuronano usado en las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede obtenerse de cualquier fuente. En general, el hialuronano tiene la misma estructura química, independientemente de su origen (por ejemplo, cresta de pollo o de gallo, tejido humano o pared celular bacteriana). Se puede obtener hialuronano, por ejemplo, de cresta de pollo o de gallo, de las paredes de células bacterianas y de tejido humano (cordón umbilical, de humor vítreo del ojo, de líquido sinovial de las articulaciones, etc.). En algunas realizaciones, el hialuronano se aísla de crestas de pollo. En algunas realizaciones, el hialuronano se aísla de tejido humano, por ejemplo, de cordón umbilical, de humor vítreo del ojo, de líquido sinovial de las articulaciones. En algunas realizaciones, el hialuronano se aísla de cultivo celular. En algunas realizaciones, el hialuronano se aísla de las paredes de células bacterianas. Un experto habitual en la técnica sabe cómo aislar hialuronano de diversas fuentes. Por ejemplo, la recogida y purificación de hialuronano de crestas de gallo se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 4.141.973, mientras que la recogida y purificación de hialuronano de fuentes bacterianas se describe en la Patente de Estados Unidos 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 carecerá de proteínas o glucosaminoglucanos distintos del hialuronano.

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

En un aspecto, el hialuronano con alta elasticidad desvelado en el presente documento, es hialuronano no modificado. Sin embargo, se apreciará que, en algunas realizaciones, el hialuronano puede modificarse químicamente. Por ejemplo, el hialuronano puede modificarse químicamente para aumentar su elasticidad.

III. Esterilización de las composiciones de hialuronano

En algunas realizaciones, las composiciones de AH descritas en el presente documento y usadas en los métodos de la invención son estériles. Una "composición estéril", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que es segura para administrar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. Por tanto, una composición estéril solo tendrá un número mínimo de agentes que puedan causar efectos secundarios no deseados, tales como una respuesta tisular, una respuesta inmunitaria, una inflamación o una infección no deseadas.

En la técnica se conocen métodos para esterilizar composiciones de hialuronano e incluyen, por ejemplo, esterilización por calor o vapor, por ejemplo, mediante autoclave. En algunas realizaciones, las composiciones de AH de la invención se esterilizan calentando las composiciones. En algunas realizaciones, las composiciones de AH de la invención se esterilizan incluyendo la composición de AH en una jeringa y esterilizando en autoclave la jeringa que contiene el AH a 131 °C durante 2 minutos o a 121 °C durante 15 minutos seguido de enfriamiento inmediato.

IV. Componentes adicionales para las composiciones de hialuronano

Las composiciones de AH descritas en el presente documento pueden incluir componentes adicionales que pueden estabilizar el hialuronano y/o hacer que la composición sea más adecuada para su administración a un sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones de AH de la invención pueden incluir un tampón. Los tampones se añaden para permitir un pH estable. Los tampones adecuados para su uso en la presente invención incluyen tampones de fosfato y tampones de bicarbonato. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón de 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 del tampón es inferior a 1 mM. En algunas realizaciones, la concentración del tampón es superior a 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración del tampón es de 10 mM. Debe apreciarse que la concentración del tampón depende de la naturaleza del tampón que se esté usando. En algunas realizaciones, el pH de la composición está comprendido entre un pH de 7 y 9 o entre un pH de 7,5 y 8,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación es de 8,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación es de 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la formulación es de 8,5. Si fuese necesario, a la composición se

puede añadir un ácido (tal como HCL) o una base (como NaOH) para alcanzar el pH apropiado.

Por ejemplo, la composición de AH puede incluir un tampón, por ejemplo, un tampón fisiológicamente compatible, pero no incluir ningún componente adicional.

5 Las composiciones de AH también pueden incluir un excipiente estabilizador, tal como un 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 o una sal de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido carboxílico es citrato de sodio. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido tricarboxílico (TCA, *tricarboxylic acid*) y/o una sal del mismo. En algunas realizaciones, la composición incluye un ácido nitrilotriacético y/o ácido nitrilotriacético de sodio. 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 de sodio. 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 de sodio. Los ácidos carboxílicos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, 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 the *Journal of Biological Chemistry* volumen 256, número 23, págs. 12140-1210-12147, 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 de 300 mM. En algunas realizaciones, la concentración del excipiente estabilizador es inferior a 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración del excipiente estabilizador es superior a 600 mM.

25 En algunas realizaciones, las composiciones de AH descritas en el presente documento pueden incluir sales. Las sales que se pueden usar en las composiciones incluyen cloruro de sodio y otras sales fisiológicamente compatibles. En algunas realizaciones, la concentración de sal presente en las composiciones de AH descritas en el presente documento es de entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 70 mM, entre aproximadamente 45 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 125 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 250 mM, o entre aproximadamente 190 mM y aproximadamente 250 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal es de 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal es inferior a 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración de sal es superior a 250 mM. En una realización específica, la concentración de sal es de entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 200 mM.

40 En algunas realizaciones, las composiciones de AH de la invención pueden tener una osmolaridad normal, por ejemplo, de aproximadamente 310 mOsm/l. En otras realizaciones, las composiciones de AH de la invención pueden tener una osmolaridad por debajo de la osmolaridad normal, por ejemplo, por debajo de 310 mOsm/l. Por ejemplo, las composiciones de AH de la invención pueden tener una osmolaridad de entre aproximadamente 20 mOsm/l y aproximadamente 500 mOsm/l, por ejemplo, entre aproximadamente 150 y aproximadamente 310 mOsm/l, entre aproximadamente 150 y aproximadamente 200 mOsm/l, entre aproximadamente 160 y aproximadamente 220 mOsm/l, entre aproximadamente 180 y aproximadamente 250 mOsm/l, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 300 mOsm/l, entre aproximadamente 250 y aproximadamente 310 mOsm/l, entre aproximadamente 290 y aproximadamente 310 mOsm/l, entre aproximadamente 250 y aproximadamente 290 mOsm/l o entre aproximadamente 270 y aproximadamente 300 mOsm/l. En algunas realizaciones, la osmolaridad de las composiciones de AH de la invención puede ser de aproximadamente 150 mOsm/l, aproximadamente 155 mOsm/l, aproximadamente 160 mOsm/l, aproximadamente 165 mOsm/l, aproximadamente 170 mOsm/l, aproximadamente 175 mOsm/l, aproximadamente 180 mOsm/l, aproximadamente 185 mOsm/l, aproximadamente 190 mOsm/l, aproximadamente 195 mOsm/l, aproximadamente 200 mOsm/l, aproximadamente 205 mOsm/l, aproximadamente 210 mOsm/l, aproximadamente 215 mOsm/l, aproximadamente 220 mOsm/l, aproximadamente 225 mOsm/l, aproximadamente 230 mOsm/l, aproximadamente 235 mOsm/l, aproximadamente 240 mOsm/l, aproximadamente 245 mOsm/l, aproximadamente 250 mOsm/l, aproximadamente 255 mOsm/l, aproximadamente 260 mOsm/l, aproximadamente 265 mOsm/l, aproximadamente 270 mOsm/l, aproximadamente 275 mOsm/l, aproximadamente 280 mOsm/l, aproximadamente 285 mOsm/l, aproximadamente 290 mOsm/l, aproximadamente 295 mOsm/l, aproximadamente 300 mOsm/l, aproximadamente 305 mOsm/l o de aproximadamente 310 mOsm/l. En una realización específica, la osmolaridad de las composiciones de AH de la invención está entre aproximadamente 100 mOsm/l y aproximadamente 400 mOsm/l, por ejemplo, aproximadamente 100 mOsm/l, aproximadamente 110 mOsm/l, aproximadamente 120 mOsm/l, aproximadamente 130 mOsm/l, aproximadamente 140 mOsm/l o aproximadamente 150 mOsm/l.

65 En algunas realizaciones, las composiciones de AH descritas en el presente documento 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 de ácido ascórbico (por ejemplo, palmitato de ascórbilo, estearato de ascórbilo, 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. Dichos materiales se añaden normalmente en intervalos del 0,01 al 2,0 %.

5 En algunas realizaciones, las composiciones de AH pueden incluir uno o más agentes de isotonicidad. Esta expresión se usa en la técnica de manera intercambiable con la de agente isoosmótico, y se conoce como un compuesto que se puede añadir a una composición para aumentar la presión osmótica, tal como una presión osmótica de una solución de cloruro de sodio al 0,9 %, que es isoosmótica con los líquidos extracelulares humanos, tal como plasma. Los agentes de isotonicidad preferidos que se pueden usar en las composiciones de AH incluyen cloruro de sodio, manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa y glicerol.

10 En algunas realizaciones, las composiciones de AH de la invención pueden incluir uno o más conservantes. Los conservantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa: clorobutanol (0,3 - 0,9 % p/v), parabenos (0,01 - 5,0 %), timerosal (0,004 - 0,2 %), alcohol bencílico (0,5 - 5 %), fenol (0,1 - 1,0 %) y similares.

15 En algunas realizaciones, las composiciones de AH pueden incluir componentes que sean adecuados para uso oftálmico.

20 En algunas realizaciones, las composiciones de AH pueden incluir uno o más componentes que minimicen los efectos secundarios no deseados durante la inyección de la composición.

V. Composiciones de hialuronano para usos oftálmicos

25 La presente invención proporciona las composiciones de AH reivindicadas para su uso en métodos para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia, administrando en el ojo de un sujeto, composiciones que contienen AH.

30 En las composiciones de AH para uso oftálmico se puede usar cualquiera de una variedad de transportadores, incluyendo agua, mezclas de agua y solventes miscibles en agua, tales como alcanoles C1 a C7, aceites vegetales o aceites minerales que comprenden polímeros solubles en agua no tóxicos del 0,5 al 5 %, productos naturales, tales como gelatina, alginatos, pectinas, tragacanto, goma karaya, goma xantana, carragenina, agar y o goma arábica, derivados de almidón, tales como acetato de almidón e hidroxipropil almidón, y también otros productos sintéticos, tales como alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polivinil metil éter, óxido de polietileno, preferentemente ácido poliacrílico reticulado, tal como Carbopol neutro, o mezclas de esos polímeros. La concentración del transportador es, normalmente, de 1 a 100 000 veces la concentración del principio activo.

35 Los principios adicionales que pueden incluirse en las composiciones de AH para uso oftálmico incluyen potenciadores de tonicidad, conservantes, solubilizantes, excipientes no tóxicos, emolientes, secuestrantes, ajustadores de pH, codisolventes y agentes formadores de viscosidad.

40 Para ajustar el pH, preferentemente a un pH fisiológico, los tampones pueden ser especialmente útiles. El pH de las composiciones de hialuronano adecuadas para la administración en el ojo, debe mantenerse en el intervalo de 4,0 a 8,0, más preferentemente de aproximadamente 4,0 a 6,0, más preferentemente de aproximadamente 6,5 a 7,8. Pueden añadirse tampones adecuados, tales como ácido bórico, borato de sodio, citrato de potasio, ácido cítrico, bicarbonato de sodio, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y diferentes tampones de fosfato mixtos (incluidas combinaciones de Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 y KH_2PO_4) y mezclas de los mismos. Generalmente, los tampones se usarán en cantidades que varían de aproximadamente el 0,05 al 2,5 por ciento en peso, y preferentemente, del 0,1 al 1,5 por ciento.

50 La tonicidad se ajusta, si fuese necesario, normalmente mediante agentes potenciadores de la tonicidad. Dichos agentes pueden ser, por ejemplo, de tipo iónico y/o no iónico. Como ejemplos de potenciadores de tonicidad de tipo iónico se incluyen haluros de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como, por ejemplo, CaCl_2 , KBr , KCl , LiCl , NaI , NaBr o NaCl , Na_2SO_4 o ácido bórico. Como agentes potenciadores de tonicidad de tipo no iónico se incluyen, por ejemplo, urea, glicerol, sorbitol, manitol, propilenglicol o dextrosa. La osmolaridad de las composiciones de hialuronano usadas en los métodos de la presente invención puede ajustarse con agentes de tonicidad para aproximarse a la presión osmótica de los líquidos lagrimales normales que es equivalente a una solución de cloruro de sodio al 0,9 % o a una solución de glicerol al 2,5 %. En algunos ejemplos, se prefiere una osmolaridad de entre aproximadamente 100 mOsm/l y aproximadamente 150 mOsm/l, por ejemplo, 100 mOsm/l, 110 mOsm/l, 120 mOsm/l, 130 mOsm/l, 140 mOsm/l o 150 mOsm/l. En otros ejemplos, se prefiere una osmolalidad de entre aproximadamente 225 y 400 mOsm/l, por ejemplo, entre aproximadamente 280 y aproximadamente 320 mOsm/l o entre aproximadamente 297 y aproximadamente 318 mOsm/l. En algunos casos, la osmolaridad promedio puede fluctuar entre aproximadamente 303,7 y aproximadamente 306,7 mOsm/l.

65 En determinadas realizaciones, las composiciones de AH para uso oftálmico pueden comprender adicionalmente un conservante. Normalmente, un conservante puede seleccionarse de un compuesto de amonio cuaternario, tal como

cloruro de benzalconio (cloruro de N-bencil-N-(alquil C8-C18)-N,N-dimetilamonio), cloruro de benzoxonio o similares. Como ejemplos de otros conservantes adecuados se incluyen sales de alquilmercurio de ácido tiosalicílico, tales como, por ejemplo, tiomersal; nitrato fenilmercúrico, acetato fenilmercúrico o borato fenilmercúrico; perborato de sodio; clorito de sodio; parabenos, tales como, por ejemplo, metilparabeno o propilparabeno; alcoholes, tales como, por ejemplo, clorobutanol, alcohol bencílico o fenil etanol; derivados de guanidina, tales como, por ejemplo, clorohexidina o polihexametilen biguanida; imidazolidinil urea (Germall™) o ácido sórbico. Los conservantes preferidos son compuestos de amonio cuaternario, en particular, cloruro de benzalconio o su derivado tal como Polyquad (véase la patente de Estados Unidos N.º 4 407 791), sales de alquilmercurio y parabenos. Cuando sea adecuado, para garantizar una protección contra contaminaciones secundarias durante el uso causadas por bacterias y hongos, se añade una cantidad suficiente de conservante a la composición oftálmica.

En otra realización, las composiciones de AH para uso oftálmico no incluyen conservantes. Dichas composiciones serían útiles en pacientes que usan lentillas, o en los que se ponen varias gotas oftálmicas tópicas y/o para los que ya tienen una superficie ocular comprometida (por ejemplo, xeroftalmia), en donde limitar la exposición a un conservante puede ser más deseable.

Las composiciones de AH para uso oftálmico pueden requerir adicionalmente la presencia de un solubilizante, en particular, si los principios activos o inactivos tienden a formar una suspensión o una emulsión. Los solubilizantes adecuados para las composiciones de hialuronano usadas en los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, tiloxapol, ésteres polietilenglicol glicerol de ácido graso, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol, polietilenglicoles, éteres de glicerol, una ciclodextrina (por ejemplo alfa-, beta- o gamma-ciclodextrina, por ejemplo, derivados alquilados, hidroxialquilados, carboxialquilados o alquiloxicarbonil-alquilados, o mono- o diglicosil-alfa-, beta- o gamma-ciclodextrina, mono- o dimaltosil-alfa-, beta- o gamma-ciclodextrina o panosil-ciclodextrina), polisorbato 20, polisorbato 80 o mezclas de estos compuestos. Un solubilizante preferido puede ser un producto de reacción de aceite de ricino y óxido de etileno, por ejemplo, los productos comerciales Cremophor EL® o Cremophor RH40®. Los productos de reacción de aceite de ricino y óxido de etileno han demostrado ser solubilizantes particularmente buenos que son extremadamente bien tolerados por el ojo. Otro solubilizante preferido puede ser tiloxapol o ciclodextrina. La concentración usada depende especialmente de la concentración de hialuronano presente en la composición. La cantidad añadida suele ser suficiente para solubilizar el hialuronano presente en la composición. Por ejemplo, la concentración del solubilizante es de 0,1 a 5000 veces la concentración del hialuronano presente en la composición.

Las composiciones de AH para uso oftálmico también pueden comprender otros excipientes no tóxicos, tales como, por ejemplo, emulsionantes, humectantes o rellenos, tales como, por ejemplo, los denominados polietilenglicoles 200, 300, 400 y 600 o Carboceras 1000, 1500, 4000, 6000 y 10000. La cantidad y el tipo de excipiente añadido depende de las necesidades particulares y generalmente está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 90 % en peso.

Para aumentar la viscosidad del transportador, también pueden añadirse otros compuestos a las formulaciones de la presente invención. Como ejemplos de agentes potenciadores de viscosidad se incluyen, aunque no de forma limitativa, polisacáridos, tales como condroitín sulfato y sus sales, dextranos, varios polímeros de la familia de la celulosa; polímeros de vinilo; y polímeros de ácido acrílico.

En una realización, las composiciones de hialuronano destinadas al uso oftálmico, además de AH, se pueden administrar junto con principios adicionales que normalmente se encuentran en las composiciones oftálmicas. Como ejemplos de dichos componentes pueden incluirse otros principios activos, incluyendo, pero sin limitación, vasoconstrictores, agentes antialérgicos, antiinfecciosos, esteroides, anestésicos, antiinflamatorios, analgésicos, agentes xeroftálmicos (por ejemplo, secretagogos, mucomiméticos, polímeros, lípidos, antioxidantes), o administrarse (simultánea o secuencialmente) junto con composiciones que comprenden otros principios activos, incluyendo, pero sin limitación, vasoconstrictores, agentes antialérgicos, antiinfecciosos, esteroides, anestésicos, antiinflamatorios, analgésicos o agentes xeroftálmicos (por ejemplo, secretagogos, mucomiméticos, polímeros, lípidos, antioxidantes).

En algunas realizaciones, las composiciones de hialuronano de la invención se administran a la superficie ocular de un sujeto, tal como debajo del párpado, por ejemplo, debajo del párpado superior o inferior, del sujeto o en la interfaz córnea-párpado del sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones de hialuronano de la invención no son adecuadas para su uso, o no se usan, como una herramienta o un dispositivo viscoquirúrgico, durante una cirugía oftálmica, es decir, no son adecuadas para inyectar, o no se inyectan, en el ojo durante una cirugía ocular.

En un ejemplo, las composiciones de hialuronano de la invención se administran a un sujeto inmediatamente antes de descansar o dormir.

VI. *Métodos para aliviar el dolor y el malestar asociados a xeroftalmia*

La xeroftalmia es una enfermedad ocular que afecta aproximadamente a un 10-20 % de la población. Puede estar asociada a una afección patológica, tal como cataratas o un trastorno autoinmunitario, o, en ausencia de una

afección patológica, en determinadas circunstancias puede producirse, tal como realizando tareas visuales prolongadas, trabajando con un ordenador, permaneciendo en un ambiente seco, usando lentillas o exponiéndose a medicamentos que ocasionen sequedad en la superficie del ojo.

5 En personas que padecen xeroftalmia, el reflejo que ocasiona el parpadeo y la secreción de sustancias lagrimales complementarias se ve comprometido. Los signos y síntomas de la xeroftalmia incluyen sequedad ocular; disminución de la producción, del volumen y del flujo lagrimal; composición lagrimal anómala; aumento de la osmolaridad lagrimal; queratitis, coloración de la conjuntiva y la córnea; enrojecimiento; visión borrosa; disminución del tiempo de rotura de la película lagrimal; aumento del enrojecimiento de la conjuntiva; exceso de suciedad en la
10 película lagrimal; arenilla ocular; ardor ocular; sensación de cuerpo extraño en el ojo; lagrimeo excesivo; fotofobia; escozor ocular; deterioro refractivo; sensibilidad ocular; irritación y malestar ocular resultantes del uso prolongado de lentillas. La respuesta del exceso de lagrimeo puede parecer contradictoria, pero es una respuesta refleja natural a la irritación y sensación de cuerpo extraño causada por la xeroftalmia. Algunas personas también pueden padecer prurito ocular debido a una combinación de síntomas de alergia ocular y xeroftalmia.

15 Hay muchas variables posibles que también pueden influir en los síntomas de la xeroftalmia de una persona, incluidos los niveles de hormonas circulantes, varias enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, síndrome de Sjorgren y lupus eritematoso sistémico), cirugías oculares, incluyendo PRK o LASIK, muchos medicamentos, condiciones ambientales, tareas visuales tales como el uso de ordenador, cansancio ocular, el uso de lentillas e influencias mecánicas, tales como sensibilidad en la córnea, cierre parcial del párpado, irregularidades de la superficie (por ejemplo, pterigión) e irregularidades del párpado (por ejemplo, ptosis, entropión/ectropión, pinguécula). Los ambientes con baja humedad, por ejemplo, los que provocan deshidratación, pueden agravar los
20 síntomas de la xeroftalmia o producirla, como sentarse en un avión o un automóvil con el antivaho encendido o vivir en una zona de clima seco. Adicionalmente, la tarea visual también puede agravar los síntomas. Las tareas que pueden influir enormemente en los síntomas incluyen ver la televisión o usar el ordenador durante largos períodos de tiempo, en los que disminuye la frecuencia de parpadeo.

Las composiciones que contienen AH se han usado anteriormente para el tratamiento de afecciones relacionadas con la xeroftalmia. Los colirios que contienen AH están disponibles en el comercio y normalmente contienen AH a una concentración inferior al 1 %. Como ejemplos de colirios disponibles en el comercio, que contienen AH, se incluyen los colirios Opticalm (AH al 0,2 %); gotas humectantes Aquify (AH al 0,1 %); Blink (AH al 0,15 %); gotas Hyal (AH al 0,2 %); Hycosan (AH al 0,1 %); Oxyal (AH al 0,15 %); y Vismed (AH al 0,18 % y 0,8 %).

Los solicitantes han descubierto inesperadamente que las composiciones de AH sumamente concentradas que comprenden AH a una concentración superior a aproximadamente 30 mg/ml (o AH al 3 %), por ejemplo, 40 mg/ml (o AH al 4 %), se pueden administrar de una manera eficaz en el ojo de un sujeto para el tratamiento de una afección relacionada con la xeroftalmia. Dichas composiciones de AH sumamente concentradas, no se han usado anteriormente para el tratamiento de la xeroftalmia, ya que se consideró que estas composiciones eran demasiado viscosas como para administrarse en el ojo de una manera eficaz.

Los solicitantes también han descubierto inesperadamente que, una vez administradas en un ojo, las composiciones concentradas de AH son inesperadamente eficaces para tratar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría específica, se cree que el dolor asociado a una afección relacionada con la xeroftalmia puede modularse a través de canales TRPV1 de nociceptores, y que las moléculas de AH en composiciones de AH sumamente concentradas interaccionan con los canales TRPV1 presentes en los nervios sensoriales oculares y en las células de la córnea, reduciendo así la reactividad de los nociceptores a estímulos nocivos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia se modulan a través de canales del receptor de potencial transitorio de tipo vainilloide subtipo 1 (TRPV1, *transient receptor potential vanilloid 1*). Así mismo, las propiedades elastoviscosas características del AH concentrado, reducen la eliminación por lagrimeo y parpadeo normales de la solución aplicada en la superficie del ojo, prolongando así los efectos protectores de la solución de AH.

La presente invención proporciona la composición de AH reivindicada para su uso en un método para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al ojo del sujeto una composición que comprende hialuronano, en donde el hialuronano está presente en la composición a una concentración superior a aproximadamente 30 mg/ml; el hialuronano tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 millones; y el hialuronano no está reticulado y/o carece sustancialmente de modificaciones químicas, aliviando así dicho dolor y malestar en dicho sujeto.

60 En algunos casos, las composiciones de AH destinadas a uso oftálmico están en forma de un gel, una pomada, un linimento, una loción o una crema. En determinados aspectos, esta composición de AH no está en forma de lente o microesfera.

Las composiciones de AH destinadas a uso oftálmico se pueden administrar a la superficie ocular, tal como debajo del párpado, por ejemplo, debajo del párpado superior o inferior, o en la interfaz córnea-párpado. En un aspecto, las composiciones de AH no se inyectan en el ojo del sujeto. Dado que la capacidad del sujeto para ver con claridad

puede verse comprometida inmediatamente después de la administración de las composiciones de AH debido a su alta viscosidad, estas composiciones pueden administrarse al ojo del sujeto inmediatamente antes de descansar o dormir.

5 Un experto habitual en la técnica sería capaz de determinar el programa de administración apropiado para las composiciones oftálmicas de AH descritas en el presente documento para conseguir aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia. Por ejemplo, las composiciones de AH se pueden administrar diariamente durante aproximadamente 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, etc., o durante cualquier período de tiempo hasta conseguir aliviar el dolor y el malestar
10 asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia. En algunas realizaciones, dicho alivio del dolor y malestar puede ser de larga duración, por ejemplo, una duración de aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 3 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 14 días o de aproximadamente 28 días.

15 La expresión "afección relacionada con la xeroftalmia" incluye, pero sin limitación, una afección relacionada con la xeroftalmia asociada a uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en sequedad ocular; disminución del tiempo de rotura de la película lagrimal; disminución de la producción, del volumen y del flujo lagrimal; composición lagrimal anómala; aumento de la osmolaridad lagrimal; queratitis; coloración de la conjuntiva y la córnea; enrojecimiento; visión borrosa; aumento del enrojecimiento de la conjuntiva; exceso de suciedad en la
20 película lagrimal, arenilla ocular; ardor ocular; sensación de cuerpo extraño en el ojo; lagrimeo excesivo; fotofobia; escozor ocular; deterioro refractivo; sensibilidad ocular; irritación y malestar ocular resultantes del uso prolongado de lentillas.

La afección relacionada con la xeroftalmia también puede estar asociada a una afección seleccionada del grupo que
25 consiste en un trastorno autoinmunitario; una cirugía ocular; ingestión de un medicamento; condiciones ambientales secas; uso prolongado de ordenador; cansancio ocular; uso de lentillas, sensibilidad en la córnea; cierre parcial del párpado; irregularidades en la superficie; irregularidades en el párpado; y a una afección asociada a dolor neuropático, tal como cataratas o desprendimiento de retina. En un ejemplo, la afección relacionada con la xeroftalmia puede estar asociada a una cirugía ocular, tal como cirugía fotorrefractiva, por ejemplo, queratectomía
30 fotorrefractiva (PRK), cirugía de cataratas, cirugía de desprendimiento de retina, queratomileusis *in situ* asistida por láser (LASIK) o cualquier procedimiento quirúrgico de la córnea que implique daño en los nervios sensoriales de la córnea.

Un efecto de tratamiento, preventivo o de alivio, es evidente cuando hay una mejora estadísticamente significativa
35 en uno o más parámetros del estado de la enfermedad o de una afección patológica, por ejemplo, dolor y malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia. Un efecto de tratamiento, preventivo o de alivio, también es evidente cuando no hay un empeoramiento o desarrollo de los síntomas donde de otro modo se esperarían. Como ejemplo, un cambio favorable de al menos un 10 % en un parámetro medible de enfermedad o afección, por ejemplo, dolor y malestar, y, preferentemente, de al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50% o mayor, puede ser indicativo
40 de un tratamiento eficaz. Los términos "prevenir" o "prevención", como se usan en el presente documento, comprenden, por ejemplo, la prevención de la reaparición del dolor y malestar en un sujeto que anteriormente ha padecido el dolor.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "reducir al menos un síntoma" comprende disminuir, mejorar o
50 eliminar al menos un síntoma asociado a dolor y malestar. Esta expresión también comprende reducir el grado de activación de los canales iónicos, tales como los canales TRPV1, que intervienen en el proceso de transducción del dolor en las neuronas, después de la administración de una composición de AH de la invención. La activación de dichos canales puede medirse, por ejemplo, midiendo el cambio de Ca^{2+} intracelular en neuronas después de un impulso nociceptivo, o midiendo corrientes de células completas en neuronas, después de la administración de una
55 composición de AH de la invención. Asimismo, la expresión "reducir al menos un síntoma" también comprende disminuir el disparo nociceptivo de las neuronas después de la administración de una composición de AH de la invención.

En algunas realizaciones, los métodos para reducir el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con
60 la xeroftalmia, comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, pretende incluir una cantidad de una composición de AH de la invención que, cuando se administra a un ser humano que lo necesita, es suficiente para tratar, prevenir, reducir o aliviar el dolor y el malestar. Un experto habitual en la técnica, por ejemplo, un médico, podrá determinar fácilmente la cantidad de composición
65 de AH que sería terapéuticamente eficaz. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición está entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg, p. ej., 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,
 5 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,
 10 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.

15 Los métodos desvelados en el presente documento abarcan una variedad de regímenes de tratamiento. Por ejemplo, un sujeto puede recibir una primera dosis de las composiciones de AH desveladas en el presente documento seguida de dosis adicionales. En algunas realizaciones, se administra una primera dosis seguida de una segunda dosis a 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
 20 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 en función de la reducción del dolor y del malestar que padece 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
 25 meses, cada diez meses, cada once meses, o cada doce meses.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

30 A menos que se disponga lo contrario, el hialuronano (AH) usado en las composiciones descritas en el presente documento se obtiene de fuentes de origen animal, humano o bacteriano. A menos que se disponga lo contrario, las composiciones que se usan en el presente documento están en tampones fisiológicos.

35 Ejemplo 1. Reducción de la actividad de impulso en las fibras nerviosas sensoriales de la córnea mediante la aplicación tópica de hialuronano de sodio al 4 % en la córnea

La excitación de los nociceptores es la primera etapa en la producción de sensaciones de dolor. Para el dolor agudo, la magnitud de la sensación de dolor se correlaciona bien con la frecuencia de disparo de las fibras nociceptivas y con el número de fibras reclutadas por el estímulo (Acosta *et al.*, 2001, J. Physiol. 534(2), 511-525). Además, el dolor sostenido después de una lesión periférica se asocia a la actividad en curso de los nociceptores (Belmonte *et al.*, 2004, Ocular Surface, 2, 248-253).
 40

La actividad aumentada del impulso nervioso sensorial en los nervios de la córnea es la primera etapa en la generación de malestar ocular y sensaciones de dolor. En la superficie ocular, los estímulos nocivos son detectados por nociceptores polimodales y mecanonociceptores que inervan la córnea y la conjuntiva (Belmonte & Giraldez, 1981, J. Physiol., 437, 709-725; Gallar *et al.*, 1993, J. Physiol., 468, 609-622). Cuando se produce inflamación, los nociceptores polimodales se sensibilizan y descargan continuamente, suscitando sensaciones de dolor sostenidas. Por otra parte, la actividad en los termorreceptores de frío de la córnea se ha asociado a la evaporación de la superficie ocular y posiblemente también contribuye a las sensaciones conscientes de sequedad de la superficie ocular (Gallar *et al.*, 1993, J. Physiol., 468, 609-622; Parra *et al.*, 2010, Nature Medicine, 16, 1396-1399; Kovacs *et al.*, 2016, Pain, 157, 399-417).
 50

El objetivo de los experimentos que se describen a continuación era comprobar la capacidad del hialuronano a una concentración del 4 % (HA al 4 %) con un peso molecular promedio de 1-2 millones para modificar las descargas de los impulsos nerviosos espontáneos y suscitadas por el estímulo en las fibras receptoras sensoriales (mecanonociceptores, nociceptores polimodales, termorreceptores del frío) que inervan la córnea de cobayas.
 55

Un medio eficaz para producir una estimulación química de los nociceptores polimodales de la córnea es la aplicación de CO₂ al 98,5 %, debido a la acidificación provocada por la formación local de ácido carbónico (Chen *et al.*, 1995, Eur. J. Neurosci. 7, 1154-1163). Se ha comprobado que la aplicación de un pulso similar de CO₂ en la córnea humana suscita en todos los casos una sensación inmediata e intensa de dolor (Chen *et al.*, 1995, Eur. J. Neurosci. 7, 1154-1163; Acosta *et al.*, 2001, J. Physiol. 534(2), 511-525). Dado que se forman protones rápidamente en los alrededores de las terminales nerviosas, el efecto estimulante de H⁺ es presumiblemente directo y se produce a través de la activación de un canal iónico activado por protones que despolariza el nervio, posiblemente el 'canal de capsaicina' TRPV1 y/o los canales ASIC (siglas del inglés *Acid Sensing Ion Channels*, canales iónicos sensibles a
 60
 65

ácido). Así mismo, una disminución del pH intracelular en las células epiteliales de la córnea sometidas a estimulación con CO₂ también puede conducir a la formación y liberación de mediadores inflamatorios (por ejemplo, prostaglandinas), que pueden sensibilizar a los nociceptores polimodales de la córnea, provocando una descarga de fondo y un aumento de las respuestas de impulso a la estimulación ácida directa.

En el caso de los termorreceptores de frío en la córnea, estas fibras muestran una actividad de impulso de fondo y regular a la temperatura basal de 34 °C en la córnea y aumentan su frecuencia de disparo con reducciones de temperatura muy pequeñas, por ejemplo, las que se producen durante la evaporación de las lágrimas (Belmonte *et al.*, 2015, *Curr. Ophthalmol. Rep.* 3, 111-121).

Métodos

En los experimentos se usaron cobayas Dunkin Hartley de ambos sexos que pesaban entre 200 y 300 g. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Guía de los NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio y la Directiva de la Unión Europea (2010/63/UE) y la normativa española sobre la protección de los animales utilizados para la investigación, y siguió un protocolo aprobado y supervisado por los Comités de Ética de la Universidad Miguel Hernández.

Registros electrofisiológicos

Se registró la actividad de impulso de diferentes tipos funcionales de receptores periféricos en la córnea. Para ello, los animales se sacrificaron con una inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de pentobarbitona sódica, y los dos ojos se enuclearon inmediatamente junto con la conjuntiva bulbar y tarsal y los nervios ópticos y ciliares, y se colocaron en solución salina fría (4 °C).

El tejido conectivo y los músculos extraoculares se retiraron cuidadosamente del globo ocular extirpado para exponer la parte posterior del ojo con los nervios ciliares alrededor del nervio óptico. Después, el ojo se colocó en una cámara doble especialmente diseñada para mantener el segmento anterior del ojo con la conjuntiva separada del polo posterior y los nervios ciliares. En la parte delantera de la cámara, la conjuntiva se sujetó a la pared de separación para aislar ambos compartimentos, que se perfundieron por separado. El compartimento anterior se perfundió con solución salina tibia (34 °C), que caía continuamente sobre el borde córneo escleral superior. En el compartimento trasero de la cámara, relleno con aceite mineral calentado, los filamentos nerviosos se separaron de los nervios ciliares y se colocaron en un electrodo de Ag-AgCl para el registro monopolar de la actividad de impulso de una sola unidad usando equipo electrofisiológico convencional. Las señales eléctricas se registraron con respecto a un sedimento de Ag/AgCl en el compartimento posterior. Las señales eléctricas se transfirieron a un PC con una interfaz CED y se analizaron con el programa informático apropiado. La actividad espontánea de la unidad seleccionada se registró durante 1 minuto antes de cualquier estimulación prevista. El umbral mecánico se determinó posteriormente usando filamentos de von Frey calibrados (intervalo de 0,25-4,00 mN). Los campos receptivos de las fibras aferentes de la córnea se localizaron usando estimulación mecánica con un pincel fino y se cartografiaron posteriormente usando un filamento de von Frey supraumbral. Para la estimulación química, se aplicó un chorro de gas que contenía CO₂ al 98,5 % sobre el campo receptivo de la córnea durante 30 segundos. La estimulación térmica se realizó enfriando (hasta 20 °C) la solución de perfusión mediante un dispositivo Peltier personalizado.

Análisis de los datos

En los registros de fibras polimodales de una sola fibra, se analizó el disparo de impulso de unidades individuales discriminado acorde a su modalidad, amplitud y forma de estímulo. La *actividad de los impulsos en curso* se expresó como la frecuencia media de impulsos (en impulsos/s) medida durante 30 segundos al inicio del registro y durante los períodos entre estímulos. Las respuestas al CO₂ se cuantificaron midiendo los siguientes parámetros: *latencia*: demora entre la aparición del pulso de CO₂ y el primer impulso dado por la unidad; *tasa de descarga media*: número medio de impulsos por segundo (imp/s) a lo largo del pulso de CO₂; *posdescarga*: frecuencia media de disparo (imp/s) durante 30 segundos inmediatamente después del pulso de CO₂.

En los registros de fibras nerviosas de frío, se calcularon los siguientes parámetros adicionales del patrón de disparo: *frecuencia media de disparo*: número promedio de impulsos registrados por segundo (impulsos/s); *umbral de enfriamiento*: temperatura durante la rampa de enfriamiento en la que se obtuvo un aumento del 25 % de la frecuencia media de los impulsos nerviosos a la temperatura basal; *respuesta máxima*: valor máximo de impulso/s de la frecuencia de impulso durante la rampa de enfriamiento; *temperatura en el pico de respuesta*: valor de temperatura (°C) al que se alcanzó la frecuencia máxima.

Protocolo experimental

Se siguió la siguiente secuencia experimental:

Identificación de fibras nociceptivas polimodales

Con un pincel fino y húmedo aplicado a la superficie corneal, se identificó un filamento que contenía fibras que inervaban la córnea y que respondían a la estimulación mecánica. Después de dividir el filamento nervioso, se realizó la localización de una sola unidad nociceptiva en la córnea mediante estimulación mecánica. Para una caracterización adicional (determinación de la polimodalidad) de cada unidad individual aislada, se realizó la siguiente rutina:

1. cartografiado de los bordes del campo receptivo y determinación del umbral mecánico con los filamentos de von Frey;
2. medición de una respuesta a un pulso de 30 segundos de CO₂ al 98,5 %. Si no se detectaba ninguna respuesta, se investigaba una nueva fibra.

Efecto de HA al 4 % en nociceptores polimodales

Se aplicó una solución de AH al 4% en la superficie de la córnea. La córnea recibió regularmente una gota de solución salina para mantener la humedad. Después de la instilación de AH al 4 %, se aplicó un pulso de CO₂ de 30 segundos en la superficie de la córnea en momentos sucesivos (5, 20, 35, 50, 65 y 80 min después de la aplicación de AH al 4 %). Después, la córnea se lavó ininterrumpidamente durante 5 minutos con solución salina y se midió la respuesta al CO₂ 15 minutos y 20 minutos después del lavado. El umbral eléctrico se midió al final del protocolo para confirmar la reactividad de la fibra. Se midió la presencia de actividad espontánea durante todo el procedimiento experimental y la magnitud de la respuesta de impulso a los estímulos de CO₂.

Identificación de fibras termosensibles al frío

Aplicando una gota de solución salina fría en la córnea, se identificó un filamento que contenía fibras termosensibles al frío que inervaban la córnea. Después de separar la fibra, la localización del filamento que contenía una sola unidad de frío en la córnea se realizó usando una barrita metálica enfriada con hielo (diámetro de la punta de 1 mm de diámetro) aplicada sobre la córnea para cartografiar el campo receptivo.

Se registró la actividad de los impulsos en curso mostrada por una sola terminal nerviosa sensible al frío a 34 °C. Se realizaron rampas de enfriamiento de 34 °C a 15 °C cambiando la temperatura del campo receptivo con un dispositivo Peltier.

Efecto de AH al 4 % sobre la actividad del nervio termorreceptor al frío

Se aplicó AH al 4 % sobre la superficie ocular expuesta en el compartimento frontal de la cámara, y se exploró el efecto sobre la actividad en curso del termorreceptor de frío a 34 °C y sobre la respuesta a las rampas de enfriamiento 5, 20, 35, 50, 65 y 80 minutos después de la aplicación de AH, así como 15 y 20 minutos después del lavado de la córnea.

Se determinó la actividad media en curso a la temperatura de reposo de 34 °C, el umbral térmico y el aumento de la actividad del impulso nervioso durante las rampas de enfriamiento.

Resultados

En la córnea intacta, las fibras aferentes sensoriales identificadas como fibras nociceptoras polimodales presentaban campos receptivos en la córnea que normalmente se extendían hasta 1 mm en la esclerótica adyacente. Las fibras nociceptoras polimodales eran silenciosas en reposo, respondiendo a la estimulación mecánica y también a un porcentaje de CO₂ del 98,5 %.

Los efectos del AH al 4 % sobre la actividad en curso y la respuesta de disparo al CO₂ se midieron en 2 unidades polimodales sencillas y 2 unidades sensibles al frío. Los efectos del CO₂ se analizaron antes y después de la aplicación de AH al 4 % en la superficie de la córnea. Como se muestra en la Tabla 1 más adelante, los nociceptores polimodales eran silenciosos en reposo, sin actividad en curso durante un período de registro de 2 minutos. Respondieron en aproximadamente 2,5 segundos a un pulso de CO₂ de 30 segundos con una frecuencia media de la descarga de impulso de aproximadamente 6 impulsos por segundo. Durante los primeros 35 minutos después de aplicar AH al 4 % en la córnea, la respuesta al CO₂ parecía disminuir notablemente y cesaba después. El lavado después de 80 minutos de tratamiento con AH al 4 %, recuperó gradualmente la respuesta al CO₂.

Tabla 1. La actividad en curso, las respuestas al CO₂ y los valores postdescarga de los nociceptores polimodales de la córnea se expresan en impulsos por segundo; latencia en segundos. En el caso de los termorreceptores de frío, la actividad espontánea, las respuestas de rampa de enfriamiento y los valores de frecuencia máxima se expresaron en impulsos por segundo. El umbral y la temperatura a la frecuencia pico, en °C; n.r.: actividad de impulso, ausente.

	NOCICEPTORES POLIMODALES				TERMORRECEPTORES DE FRÍO				
	Actividad en curso	Latencia	Respuesta al CO ₂	Posdescarga	Actividad espontánea	Umbral	Respuesta de rampa de enfriamiento	Frecuencia pico	Temp, en el pico
	0	2,4±3,3	5,8±4,1	1,3±0,8	0,3	17,8	3,3	5,0	17,4
					CONTROL				
					HA al 4 %				
5 min	0	0	0	0	0	16,0	0,5	3,0	15,7
20 min	0	9,6±0	0,03±0,04	0,02±0,02	0	18,7	1,2	4,0	15,7
35 min	0	23,9±7,2	0,3±0,2	0,6±0,02	0	20,7	0,4	2,0	17,8
50 min	0	0	0	0	0,8	16,9	1,2	3,0	16,6
65 min	0	0	0	0	0,2	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
80 min	0	0	0	0	0,3	15,8	0,5	1,0	15,8
					LAVADO				
15 min	0	8,4±6,4	0,4±0,1	0,8±0,2	0,15	18,2	1,1	4,0	18,0
20 min	0	14,8±5,8	4,5±3,2	3,1 ±1,9	0,0	21,0	1,5	8,0	17,3

5 También se registró la actividad de los impulsos en las fibras termorreceptoras del frío, que representan aproximadamente el 10 % de todas las fibras aferentes sensoriales de la córnea. Se confirmó su actividad de impulso regular en curso a 34 °C en ojos intactos y el marcado aumento de la frecuencia causado por pulsos de enfriamiento de 15 °C, característica de los termorreceptores oculares al frío (Gallar *et al.*, 1993, J. Physiol., 468, 609-622; Parra *et al.*, 2010, Nature Medicine, 16, 1396-1399).

10 Como se muestra en la Tabla 1, la exposición de la córnea durante 4 horas a AH al 4 % disminuyó la actividad de fondo en curso de los termorreceptores al frío a 34 °C. No se observaron cambios claros en el umbral de frío pero, como también se muestra en la Tabla 1, la respuesta a las rampas de frío disminuyó notablemente y solo se recuperó parcialmente 20 minutos después del lavado, mientras que el valor de la frecuencia pico suscitada por la rampa de frío volvió a un valor normal durante este tiempo.

15 En conjunto, estos resultados indican que el AH al 4 % reduce la actividad de impulso anómala en las fibras nociceptoras polimodales que resultan de la estimulación ácida de la córnea. Esto es posiblemente el resultado de una interacción de las moléculas de AH con los canales TRPV1 de las terminales nerviosas nociceptivas sensibilizadas (Caires *et al.*, 2015, Nat. Comm. 6, 8095), lo que demuestra que altas concentraciones de AH son muy eficaces para provocar este efecto. Además, la actividad en los termorreceptores de frío se redujo, posiblemente debido a una protección más eficaz de la superficie de la córnea que las soluciones de AH de 20 concentraciones más bajas.

Ejemplo 2. Requisitos de fuerza para la expulsión de AH a través de varios tamaños de agujas

25 La presión necesaria para expulsar una composición de AH al 4 % de una jeringa de 3 ml con agujas de diferente diámetro (30-18G) se ha medido y se muestra en la Figura 1. La fuerza se ejerció con una placa de una balanza de dos placas, actuando perpendicularmente sobre el émbolo de la jeringa. Se añadieron pesos de magnitud creciente a la placa contralateral. Como lo demuestran los resultados mostrados en la Figura 1, las composiciones de AH de la invención se pueden administrar a sujetos usando agujas con diámetros de 30-18G.

30 EQUIVALENTES

35 La memoria descriptiva escrita anteriormente se considera suficiente para que un experto en la materia pueda poner en práctica la invención. La presente invención no limita su alcance a los ejemplos proporcionados, ya que los ejemplos pretenden ser una sola ilustración de un aspecto de la invención y otras realizaciones funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán obvias para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se incluirán en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas y los objetos de la invención no están necesariamente incluidos en cada realización de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende hialuronano para su uso para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia en un sujeto que lo necesita, en donde:
- 10 el hialuronano está presente en dicha composición a una concentración superior a 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 carece de modificaciones químicas; y en donde la composición carece de otras sustancias farmacéuticamente activas.
- 15 2. Una composición que comprende hialuronano para su uso para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia en un sujeto que lo necesita, en donde:
- 20 el hialuronano está presente en dicha composición a una concentración superior a 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 carece de modificaciones químicas; y en donde la composición carece de una sustancia farmacéuticamente activa, en donde la sustancia farmacéuticamente activa es un anestésico tópico.
- 25 3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el hialuronano está presente en la composición a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml.
- 30 4. Una composición que comprende hialuronano para su uso para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia en un sujeto que lo necesita, en donde:
- 35 el hialuronano está presente en dicha composición a una concentración de al menos 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 carece sustancialmente de modificaciones químicas; y en donde la composición carece de otras sustancias farmacéuticamente activas.
- 40 5. Una composición que comprende hialuronano para su uso para aliviar el dolor y el malestar asociados a una afección relacionada con la xeroftalmia en un sujeto que lo necesita, en donde:
- 45 el hialuronano está presente en dicha composición a una concentración de al menos 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 carece de modificaciones químicas; y en donde la composición carece de una sustancia farmacéuticamente activa, en donde la sustancia farmacéuticamente activa es un anestésico tópico.
- 50 6. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición no comprende un poliglicol.
- 55 7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición comprende además un tampón; opcionalmente, en donde el tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- 60 8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición tiene una elasticidad de (i) al menos aproximadamente 200 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; o (ii) al menos aproximadamente 1000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; o (iii) al menos aproximadamente 2000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz; o (iv) una elasticidad de al menos aproximadamente 4000 Pascales cuando se mide a una frecuencia de 0,5 Hz.
- 65 9. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición es estéril.
10. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición está en forma de un gel, una pomada, un linimento, una loción o una crema.
11. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición se administra (i) a la superficie ocular; opcionalmente, en donde dicha composición se administra diariamente durante 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas o 10 semanas; o (ii) debajo del párpado de dicho sujeto; o (iii) en la interfaz córnea-párpado; o (iv) al sujeto inmediatamente antes de descansar o dormir; o (v) sin una inyección en el ojo de dicho sujeto; opcionalmente, en donde la composición se administra usando un envase seleccionado del grupo que consiste en un envase de dosis única, un frasco, un tubo, un tubo sin aire de plástico blando, una copa, un gotero y un cartucho ocular.

- 5 12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la afección relacionada con la xeroftalmia está asociada a (a) uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en sequedad ocular; disminución de la producción, del volumen y del flujo lagrimal; composición lagrimal anómala; aumento de la osmolaridad lagrimal; queratitis; coloración de la conjuntiva y la córnea; enrojecimiento; visión borrosa; disminución del tiempo de rotura de la película lagrimal; aumento del enrojecimiento de la conjuntiva; exceso de suciedad en la película lagrimal, arenilla ocular; ardor ocular; sensación de cuerpo extraño en el ojo; lagrimeo excesivo; fotofobia; escozor ocular; deterioro refractivo; sensibilidad ocular; irritación ocular y malestar resultantes del uso prolongado de lentillas; o (b) una afección seleccionada del grupo que consiste en un trastorno autoinmunitario; una cirugía ocular; ingestión de un medicamento; condiciones ambientales secas; uso prolongado de ordenador; cansancio ocular; uso de lentillas, sensibilidad en la córnea; cierre parcial del párpado; irregularidades en la superficie; irregularidades en el párpado; y una afección asociada a dolor neuropático; opcionalmente, en donde (i) la afección relacionada con la xeroftalmia está asociada a una cirugía ocular, y en donde dicha cirugía ocular se selecciona del grupo que consiste en cirugía fotorrefractiva, cirugía de cataratas, cirugía de desprendimiento de retina, queratomileusis *in situ* asistida por láser (LASIK) y cualquier procedimiento quirúrgico de la córnea que implique daño en los nervios sensoriales de la córnea; o (ii) la afección relacionada con la xeroftalmia está asociada a una afección asociada a dolor neuropático, y en donde dicha afección es cirugía después de una cirugía de cataratas o desprendimiento de retina.
- 10
- 15
- 20 13. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se consigue una mejoría de larga duración del dolor y malestar en dicho sujeto; opcionalmente, en donde dicha larga duración es de 8 horas, 12 horas, 24 horas, 1 días, 3 días, 5 días, 7 días, 14 días o 28 días.
- 25 14. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho sujeto es un mamífero; opcionalmente, en donde dicho sujeto es un ser humano.
- 30 15. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el hialuronano está presente en dicha composición a una concentración de aproximadamente 35 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml.
16. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el hialuronano está presente en dicha composición a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml.
17. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el hialuronano está presente en dicha composición a una concentración de al menos 45 mg/ml.

Diámetro	Media (kg)	e.t.m.
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

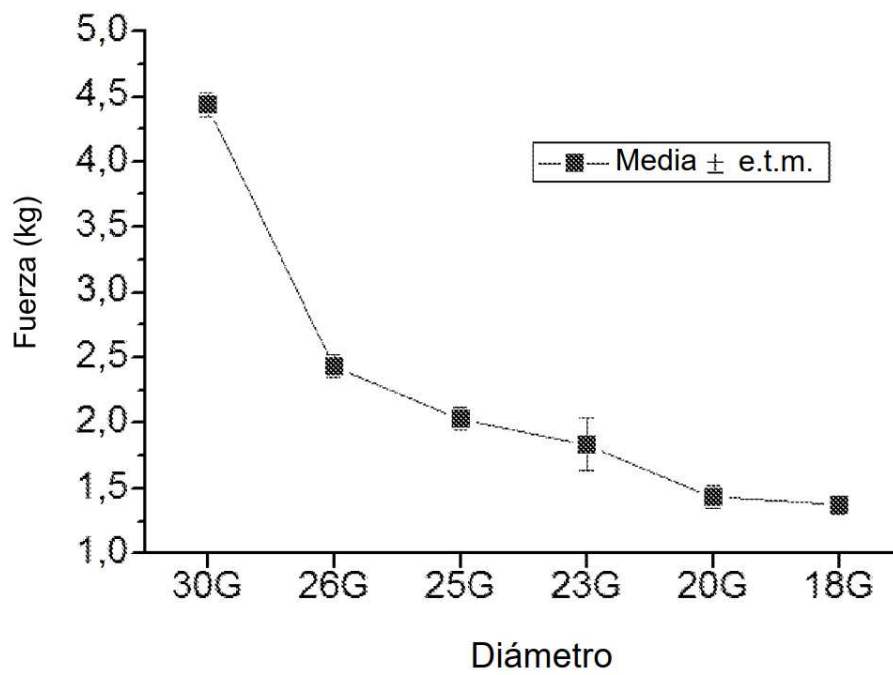


Figura 1