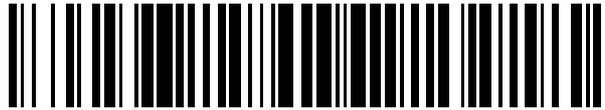


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 181 608**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 29/08 (2006.01)

A61L 27/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2000 E 00901776 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **30.03.2016 EP 1149116**

54

Título: **Procedimiento para la producción de derivados de ácido hialurónico reticulados de forma múltiple**

30

Prioridad:

03.02.1999 GB 9902412

45

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

22.07.2016

73

Titular/es:

**MENTOR WORLDWIDE LLC (100.0%)
201 Mentor Drive
Santa Barbara, California 93111, US**

72

Inventor/es:

ZHAO, XIAOBIN

74

Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 181 608 T5

Procedimiento para la producción de derivados de ácido hialurónico reticulados de forma múltiple.**Descripción**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de derivados de ácido hialurónico (HA), en particular derivados de ácido hialurónico.
- 10 El HA es un miembro de una clase de polímeros conocidos como glicosaminoglicanos. El HA es un polisacárido lineal de cadena larga y normalmente está presente como la sal sódica que tiene la forma molecular $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$ en donde n puede variar de acuerdo con el origen, procedimiento de aislamiento y método de determinación. Sin embargo, se han indicado pesos moleculares de hasta 14×10^6 .
- 15 El HA y sus sales se pueden aislar de muchas fuentes incluyendo cordón umbilical humano, crestas de gallos y casi todas las matrices conectivas de organismos vertebrados. El HA es también un componente capsular de bacterias tales como Streptococci como ha sido demostrado por Kendall et al, (1937), Biochem. Biophys. Acta, 279, 401-405; por tanto, también se puede obtener mediante métodos de fermentación. Por ejemplo, la Patente US No. 5.411.874 de la presente entidad solicitante describe un método para la producción de ácido hialurónico por fermentación continua de Streptococcus equi.
- 20 El HA es no inmunógeno y, por tanto, presenta un gran potencial en medicina. Debido a sus propiedades visco-elásticas, se ha comprobado que el HA que tiene un alto peso molecular (por encima de 1 millón) resulta particularmente útil en una variedad de campos clínicos, incluyendo tratamiento de heridas, cirugía oftálmica y cirugía ortopédica. El HA es también potencialmente útil en un variedad de campos no médicos, tales como aplicaciones cosméticas.
- 25 Sin embargo, el uso de HA en alguna de estas aplicaciones queda limitado por el hecho de que después de su administración a seres humanos, el HA es degradado fácilmente por enzimas tales como hialuronidasas y por radicales libres. Además, el HA es soluble en agua a temperatura ambiente, lo cual puede hacer que resulte menos adecuado para ciertas aplicaciones. Por tanto, se han realizado varios intentos para preparar formas más estables de HA, en particular por reticulación de las moléculas de HA.
- 30 Así, la USP 4.582.865 (Biomatrix Inc.) describe la preparación de geles reticulados de ácido hialurónico que se forman por reticulación de HA bien por sí mismo o mezclado con otros polímeros hidrófilos empleando divinilsulfona como agente reticulante. Parece ser que en este caso la reticulación surge por vía de los grupos hidroxilo del HA.
- 35 La USP 5.550.187 (Collagen Corporation) describe un método para la preparación de composiciones de biomateriales reticulados que comprende mezclar un polímero biocompatible, que preferentemente es colágeno pero que puede ser seleccionado entre otros polímeros incluyendo ácido hialurónico, con un agente reticulante seco estéril, tal como un polímero hidrófilo sintético.
- 40 La USP 5.578.661 (Nepara Inc.) describe un sistema formador de gel para utilizarse como un vendaje para heridas y que está formado a partir de tres componentes principales, siendo el primero un polímero soluble en agua, siendo el segundo un polímero que contiene ácido y siendo el tercero un polisacárido o polímero que contiene grupos amino, tal como ácido hialurónico. En este caso, la reticulación parece surgir por vía de enlace iónico.
- 45 La USP 5.644.049 (Italian Ministry for Universities and Scientific and Technology Research) describe un biomaterial que comprende una red polimérica inter-penetrante (IPN) en donde uno de los componentes poliméricos es un polisacárido ácido tal como ácido hialurónico y el segundo componente polimérico puede ser un polímero químico sintético. Los dos componentes pueden estar reticulados (pero no necesariamente).
- 50 Tomihata e Ikada han informado sobre la reticulación de HA empleando una carbodiimida soluble en agua como agente reticulante. Se postuló que la reticulación tenía lugar por vía de grupos éster. También se efectuó la reacción de reticulación en presencia de éster metílico de L-lisina, lo cual proporcionó al parecer una reticulación adicional por vía de enlaces amida al éster de lisina (J. Biomed. Mater. Res., 37, 243-251, 1997).
- 55 La Patente US No. 5.800.541 describe matrices de colágeno-polímero sintético preparadas empleando una reacción en múltiples etapas. La primera etapa comprende hacer reaccionar colágeno con un polímero hidrófilo sintético; la matriz resultante puede ser modificada entonces en una segunda etapa de reacción que puede implicar la reticulación o conjugación de la matriz con un polímero sintético, el acoplamiento en la matriz de moléculas biológicamente activas o glicosaminoglicanos, la reticulación de la matriz empleando agentes reticulantes químicos
- 60 convencionales o la modificación del colágeno en la matriz por medio de reacción química. En este proceso, la matriz inicial de colágeno-polímero sintético parece ser reticulada sólo por vía de un tipo de enlace y las etapas adicionales del proceso sirven para introducir otras sustancias químicas que pueden formar diferentes tipos de enlaces. Sin embargo, no parece que cualquiera de las dos sustancias que forman el producto se enlacen entre sí por más de un tipo de enlace.
- 65

- 5 La solicitud internacional WO 98/02204 (Hercules Incorporated) se refiere a dispositivos médicos que comprenden hidrogeles poliméricos que tienen propiedades mecánicas mejoradas. Esto se consigue sometiendo una composición de polímero iónicamente reticulable (que puede ser HA) a condiciones de reticulación, de manera que se establecen condiciones de reticulación tanto iónica como no iónica. Como agentes reticulantes adecuados se citan los diepóxidos o glutaraldehído ya que los mismos son compuestos polifuncionales que tienen al menos dos grupos funcionales reactivos con uno o más grupos funcionales del polímero.
- 10 La EP 161 887 (Seikagaku Kogyo Co. Ltd) describe un procedimiento para reticular HA haciéndolo reaccionar con un compuesto epoxi polifuncional en una solución alcalina. Este HA reticulado era resistente a hialuronidasa y tenía un efecto curativo de las heridas.
- 15 La solicitud de patente internacional WO 97/04012 (Agerup) describe composiciones en gel de polisacáridos (que pueden consistir, inter alia, en ácido hialurónico) que se preparan formando una solución acuosa del polisacárido, iniciando la reticulación en presencia de un agente reticulante polifuncional, impidiendo estéricamente que la reacción de reticulación se termine antes de que se presente la gelificación (por ejemplo por dilución de la solución) e introduciendo entonces de nuevo condiciones no estéricamente impedidas (por ejemplo por evaporación de la solución), con el fin de continuar la reticulación a un gel visco-elástico. En esta solicitud no se dice nada sobre la formación de diferentes tipos de enlaces en las dos etapas de reticulación.
- 20 Ninguno de los documentos antes mencionados describe productos en donde la moléculas de HA estén enlazadas entre sí por medio de dos tipos diferentes de enlaces de reticulación covalentes.
- 25 El ácido hialurónico puede ser reticulado por dos tipos diferentes de enlaces de reticulación, para efectuar una "reticulación doble". La formación de diferentes tipos de enlaces se consigue efectuando la reticulación por vía de diferentes grupos funcionales. Los enlaces así formados pueden ser descritos, por tanto, como enlaces funcionales. De este modo, por ejemplo, se puede formar un tipo de enlace por reticulación por vía de grupos hidroxilo y se puede formar un enlace funcional diferente por reticulación por vía, por ejemplo, de grupos carboxilo. Se ha comprobado que dicha reticulación múltiple se traduce en un alto grado de reticulación con una bioestabilidad mejorada del HA.
- 30 La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de derivados de ácido hialurónico reticulados de forma múltiple ácido fujaluronico (HA) como se define en la reivindicación 1. Características preferentes del proceso reivindicado se exponen en las reivindicaciones dependientes 2 a 11.
- 35 En esta descripción, la expresión "HA reticulado de forma múltiple" se refiere a un derivado de ácido hialurónico en donde una molécula de HA está reticulada a otra molécula de HA por medio de dos o más tipos diferentes de enlaces funcionales. Similarmente, la expresión "HA reticulado de forma doble" se refiere a un derivado de ácido hialurónico en donde una molécula de HA está reticulada a otra molécula de HA por medio de dos tipos diferentes de enlace funcional y la expresión "HA reticulado de forma simple" se refiere a un derivado de ácido hialurónico en donde una molécula de HA está reticulada a otra molécula de HA por medio de sólo un tipo de enlace funcional.
- 40 Los grupos funcionales que fundamentalmente son responsables de la reticulación de las moléculas de HA son los grupos hidroxilo y carboxilo. Los grupos hidroxilo pueden ser reticulados por vía de un enlace éter y los grupos carboxilo por vía de un enlace éster. Si se desea, el HA puede ser modificado químicamente antes de la reticulación para formar otros grupos químicamente reactivos. Así, por ejemplo, el HA puede ser tratado con ácido o base, de forma que experimentará una desacetilación al menos parcial, dando ello lugar a la presencia de grupos amino libre. Dichos grupos amino pueden ser reticulados por vía de un enlace amida (-C(O)-NH-); imino (-N=CH-) o amina (-NH-CH-). Un enlace imino es un precursor de un enlace amina y un enlace imino puede ser convertido a un grupo amina en presencia de un agente reductor.
- 50 Para formar un enlace éter, el agente reticulante se elige preferentemente entre formaldehído, glutaraldehído, divinilsulfona y, en condiciones alcalinas, bis- y poli-epóxidos. Con preferencia, el reticulante contiene un segmento hidrocarbonado hidrófobo, por ejemplo 1,2,3,4-diepoxibutano o con suma preferencia 1,2,7,8-diepoxioctano.
- 55 Para formar un enlace éster, el agente reticulante se elige preferentemente entre alcoholes polihídricos, carbodiimidias, polianhídridos, cloruros de ácido carboxílico y, en condiciones ácidas, bis- y poli-epóxidos. Con preferencia, el reticulante contiene un segmento hidrocarbonado hidrófobo, por ejemplo 1,2,3,4-diepoxibutano o con suma preferencia 1,2,7,8-diepoxioctano.
- 60 Un enlace amida se forma preferentemente empleando un agente reticulante elegido entre carbodiimidias en presencia de aminas, anhídridos y cloruros de ácido carboxílico (con HA desacetilado), y diisocianatos.
- 65 Un enlace amina se forma preferentemente empleando un agente reticulante elegido entre un epóxido o glutaraldehído con un agente reductor, en presencia de grupos amino en el HA desacetilado.

Un enlace imino (enlace de base de Schiff) se puede formar empleando glutaraldehído en presencia de grupos amino en el HA desacilado.

5 Un enlace sulfona se forma preferentemente empleando un cloruro de sulfonilo.

Los diferentes enlaces funcionales se pueden formar de manera secuencial, en un proceso de múltiples etapas, lo cual se puede conseguir empleando un agente reticulante diferente en cada etapa o empleando el mismo agente reticulante en cada etapa y ajustando las condiciones de reacción para controlar la reacción de reticulación específica requerida.

10 Así, para conseguir una reticulación múltiple, por ejemplo doble, por etapas de acuerdo con la presente invención, se efectúa una primera reacción de reticulación, por ejemplo empleando uno de los métodos a continuación descritos. Finalizada esta etapa o una vez que ha progresado en el grado requerido, se añade otra agente reticulante a la mezcla de reacción para efectuar la segunda reticulación. El otro agente reticulante puede ser el mismo o distinto del primero. Cuando se emplea un agente reticulante diferente, el mismo se elegirá generalmente de manera que, sin cambiar las condiciones de reacción, se formará un tipo diferente de enlace funcional. Sin embargo, cuando se emplea el mismo agente reticulante para formar ambas reticulaciones, las condiciones de reacción deberán ajustarse consecuentemente con el fin de formar un tipo diferente de enlace. Los expertos en la materia podrán seleccionar fácilmente un agente reticulante adecuado y las condiciones de reacción apropiadas para formar el enlace deseado.

15 Para evitar dudas, ha de apreciarse que si se emplea el mismo agente reticulante bajo las mismas condiciones de reacción en cada etapa, esto dará lugar sólo a un tipo de enlace, es decir, se obtendrá un producto reticulado una sola vez, aunque producido en dos o más etapas.

25 Podrá apreciarse que cuando los dos o más enlaces funcionales de acuerdo con la invención se forman de manera secuencial, es decir, en una reacción en múltiples etapas, la reticulación formada en la primera etapa de la reacción deberá ser lo suficientemente fuerte para soportar las condiciones de reacción necesarias para formar la segunda o posteriores reticulaciones. De este modo, en primer lugar deberá formarse el más fuerte de los dos (o más) enlaces. Esto resultará fácilmente evidente para el experto en la materia y, si es necesario, se puede determinar por medio de experimentación rutinaria.

30 De este modo, cuando las reticulaciones han de formarse por vía de grupos hidroxilo y carboxilo, se reconocerá que la reticulación de la primera etapa deberá efectuarse por vía de los grupos hidroxilo para proporcionar un enlace éter y la reticulación de la segunda etapa se efectuará entonces por vía de los grupos carboxilo, para proporcionar un enlace éster.

35 Un enlace éter se puede formar empleando un epóxido reticulante bajo condiciones alcalinas, preferentemente a un pH de 10 o más o, siempre que el HA no contenga grupos amino libres, empleando glutaraldehído como el agente reticulante bajo condiciones ácidas, por ejemplo un pH de 4 o menos. Un enlace éster se puede formar con epóxido reticulante bajo condiciones ácidas, por ejemplo un pH de 4 o menos.

40 Así, por ejemplo, se puede efectuar una primera reacción de reticulación para formar un enlace éter empleando un epóxido tal como 1,2,7,8-diepoxioctano bajo condiciones alcalinas, preferentemente a un pH de 10 o más, por ejemplo a un pH de 10 a 12. A continuación se puede efectuar una segunda reacción de reticulación para formar un enlace éster empleando el mismo agente reticulante y ajustando el pH del medio de reacción a un pH de 4 o menos, por ejemplo a un pH de 4 a 2. Alternativamente, se pueden emplear en cada etapa distintos agentes reticulantes, en cuyo caso puede no ser necesario ajustar las condiciones de reacción. Así, por ejemplo, se puede efectuar una primera reacción de reticulación empleando glutaraldehído bajo condiciones ácidas para formar un enlace éter, seguido por reacción con un epóxido reticulante también bajo condiciones ácidas, para formar un enlace éster.

45 La relación de agente reticulante a HA empleada en cada etapa de este procedimiento será generalmente del orden de 1:10 a 10:1 en peso.

50 Las reacciones de reticulación individuales se pueden efectuar de acuerdo con métodos conocidos generalmente en la técnica.

Así, el HA empleado como material de partida puede encontrarse en forma de una película o en solución.

55 Cuando se emplea una película de HA, ésta se puede suspender en un disolvente adecuado junto con agente reticulante. El medio de reacción comprende preferentemente un disolvente orgánico tal como acetona, cloroformo o un alcohol, por ejemplo etanol o isopropanol, en mezcla con una solución acuosa ácida o alcalina. Una solución ácida tiene preferentemente un pH de 4 o menos y una solución alcalina tiene preferentemente un pH de 10 o mayor.

60

65

La reacción de reticulación tiene lugar adecuadamente a una temperatura del orden de 15 a 30°C, por ejemplo a temperatura ambiente.

5 Con preferencia, cuando se emplea una película de HA como material de partida, se forma primero un enlace éster bien con un epóxido bajo condiciones alcalinas o bien, siempre que no estén presentes grupos amino libres, con glutaraldehído bajo condiciones ácidas, seguido por la formación de un enlace éster empleando epóxido bajo condiciones ácidas. Si el HA ha sido desacetilado para proporcionar grupos amino libres, se puede formar una base de Schiff con un enlace imino mediante reacción con glutaraldehído bajo condiciones ácidas. Un enlace imino se puede convertir a un enlace amina empleando un agente reductor.

10 El HA se puede emplear también como una solución acuosa ácida o alcalina a la cual se añade el reticulante. Bajo condiciones ácidas, el pH de la solución de partida es con preferencia de 4 o menos y, para una solución alcalina, el pH es con preferencia de 10 o más. La concentración de HA es convenientemente del orden de 1 a 10% p/p. La reacción se puede efectuar a una temperatura de 15 a 50°C. El tiempo para completar la reacción de reticulación puede variar en general entre una hora y varios días aproximadamente.

15 Con preferencia, cuando se emplea una solución de HA se forma primero un enlace éter con un epóxido bajo condiciones alcalinas, seguido por la formación de una reticulación éster empleando un epóxido (preferentemente el mismo epóxido que en la primera etapa) bajo condiciones ácidas.

20 Alternativamente, se puede someter una solución de HA a una primera reacción de reticulación, tras lo cual el producto intermedio se seca para formar una película la cual se somete a otra reacción de reticulación como se ha descrito anteriormente, para proporcionar un producto doblemente reticulado en forma de una película. Con preferencia, para obtener un HA doblemente reticulado de acuerdo con este procedimiento, se forma primero una reticulación éter con un epóxido bajo condiciones alcalinas, seguido por la formación de una reticulación éster empleando un epóxido (preferentemente el mismo epóxido que en la primera etapa) bajo condiciones ácidas.

25 La naturaleza precisa del producto se puede variar mediante la selección adecuada de las condiciones de reacción con el fin de controlar el grado de reticulación y por tanto las propiedades del producto. Los factores que influyen el grado de reticulación y por tanto la naturaleza del producto final incluyen la forma del HA empleado como material de partida, la relación de alimentación de agente reticulante a HA, el tiempo de reacción, la temperatura y el pH. El producto se puede obtener en forma de un gel o película y puede ser transparente u opaco. La capacidad de absorción de agua y la bioestabilidad variarán en función de la naturaleza precisa del producto.

30 El producto producido por el proceso de la invención en forma de película o lámina empleando material de partida de HA en forma de una solución, película o lámina y efectuando el procedimiento sin agitación. Podrá apreciarse que cuando se emplea el HA en forma de película o lámina, ésta absorberá agua cuando se ponga en solución acuosa, tal como tampón PBS, y se hinchará para formar un gel. Si se desea, se puede formar opcionalmente una película intermedia después de la primera etapa de reticulación, como se ha descrito anteriormente. El producto puede ser transparente u opaco, dependiendo del grado de reticulación que ocurra. Los productos de HA altamente reticulados son en general opacos y pueden incluso ser de color blanco.

35 El producto producido por el proceso de la invención en forma de un gel por hidratación de una película, la cual, por ejemplo, puede prepararse como anteriormente se ha descrito. Si es necesario, la película puede subdividirse en pequeñas piezas para facilitar la absorción de agua.

40 El producto producido por el proceso de la invención puede ser obtenido en forma de un gel opaco usando el material de partida de HA en forma de una solución, película o lámina y todo el procedimiento se efectúa con agitación y sin formación de una película en cualquier etapa.

45 Cualquiera que sea el método de reticulación que se utilice, el término de la reacción se puede controlar de forma usual por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la reacción se puede terminar por neutralización de la mezcla de reacción y precipitación en disolvente para obtener un producto con el grado deseado de reticulación.

50 El producto final puede ser aislado del medio de reacción por procedimientos convencionales.

55 Podrá entenderse que cuando se requiera un producto que contenga más de dos reticulaciones diferentes, éste se puede preparar mediante una combinación adecuada de reacciones de reticulación en secuencia, como anteriormente se ha descrito.

60 El HA reticulado preparado de acuerdo con el proceso de la presente invención contiene al menos dos tipos diferentes de enlaces de reticulación, por ejemplo ambos enlaces éter y éster.

65 El HA doblemente reticulado preparado por el proceso de la presente invención puede tener un grado de reticulación

del orden de 10 a 50%, por ejemplo 15 a 30%, con preferencia 20 a 25% (en donde 100% está representado por la reticulación de todos los grupos OH en la posición C6 y de todos los grupos COOH en la posición C5). El grado de reticulación se puede medir por análisis elemental o análisis NMR en estado sólido.

- 5 Las relaciones de los diferentes enlaces funcionales en el producto variarán en función de los tipos de enlaces funcionales presentes y de las condiciones de reacción empleadas para su formación. Para un producto reticulado de forma doble que contiene enlaces éter y éster, la relación de dichos enlaces puede variar de 50:50 a 95:5, por ejemplo de 60:40 a 80:20 de enlaces éter:éster.
- 10 En general, un producto preparado por el proceso de la presente invención tiene un mayor grado de reticulación, es decir, una red de reticulaciones más densas que el HA reticulado de forma simple. Se ha comprobado que un mayor grado de reticulación reduce la capacidad de absorción de agua del HA reticulado, traducándose ello en una mayor estabilidad en solución acuosa. Además, se ha comprobado que el HA doblemente reticulado exhibe una mayor estabilidad contra la degradación por hialuronidasa y contra la degradación debida a radicales libres, indicativo ello de una mayor bioestabilidad.
- 15 Un producto opaco preparado por el proceso de con la presente invención tiene en general un mayor grado de reticulación y, por tanto, una menor capacidad de absorción de agua y una mayor estabilidad, en comparación con un producto transparente. Dichos productos son adecuados para su implantación a largo plazo.
- 20 Un producto transparente, por ejemplo una película transparente, preparado por el proceso la presente invención tiene una mayor capacidad de absorción de agua que un producto opaco y dichos productos resultan particularmente adecuados para implantes dérmicos, curación de heridas (absorción de exudado) e implantación resorbible a corto plazo.
- 25 El procedimiento en múltiples etapas descrito anteriormente proporciona un producto altamente reticulado con una baja capacidad de absorción de agua. La reticulación simultánea se traduce generalmente en un producto insoluble en agua, pero con una mayor capacidad de absorción de agua que un producto preparado empleando un procedimiento en múltiples etapas (por ejemplo, dos etapas) bajo condiciones similares.
- 30 Por otro lado, se ha comprobado que empleando una película de HA reticulado una sola vez para la segunda etapa de reticulación se obtiene un producto (que puede estar en forma de película o que puede convertirse a un gel) con una capacidad de absorción de agua más baja que el HA reticulado doblemente y preparado a partir de solución de HA bajo condiciones de reticulación similares (es decir, sin formación intermedia de película). En realidad, se ha comprobado que la capacidad de absorción de agua de los productos resultantes puede variar desde 400% a 1000% para materiales de partida en forma de película y de gel, respectivamente.
- 35 Los derivados de HA reticulados preparado por el proceso de con la presente invención se pueden emplear en una variedad de aplicaciones farmacéuticas, médicas (incluyendo quirúrgicas) y cosméticas.
- 40 Así, pueden ser útiles, por ejemplo, a la hora de promover la curación de heridas, por ejemplo como un vendaje para heridas dérmicas.
- 45 También pueden ser útiles a la hora de prevenir la adherencia, por ejemplo prevenir el crecimiento de tejido entre órganos después de la cirugía.
- 50 Los derivados de HA reticulados preparado por el proceso de la presente invención pueden encontrar también aplicación en el campo oftálmico, por ejemplo para sustituir el fluido vítreo, como pantallas corneales para el suministro de fármacos al ojo o como lenticulas.
- 55 Los derivados de HA reticulados preparado por el proceso de la presente invención pueden ser también útiles en cirugía, por ejemplo como implantes sólidos para el aumento de tejido duro, por ejemplo preparación o sustitución de cartílago o hueso, o para el aumento de tejido blando, como implantes de mama, o bien como revestimiento para implantes destinados para su uso a largo plazo en el cuerpo, tales como implantes de mama, catéteres, cánulas, prótesis óseas, sustituciones de cartílagos, mini-bombas y otros dispositivos de administración de fármacos, órganos artificiales y vasos sanguíneos, mallas para el refuerzo de tejidos, etc. También se pueden emplear como lubricantes de articulaciones en el tratamiento de artritis.
- 60 Otro uso de los derivados preparados por el proceso de la presente invención reside en la administración de agentes terapéuticamente activos, incluyendo cualquiera de las aplicaciones antes mencionadas. Los agentes terapéuticamente activos pueden ser agentes quimioterapéuticos o factores biológicamente activos (por ejemplo, citoquinas) e incluyen agentes anti-inflamatorios, antibióticos, analgésicos, anestésicos, promotores de la curación de heridas, agentes citostáticos, inmunoestimulantes, inmunosupresores y antivíricos.
- 65 Los factores terapéuticamente activos se pueden unir al derivado de HA reticulado por métodos bien conocidos en la

técnica.

Los derivados de HA reticulados se pueden emplear en diversas formas, incluyendo membranas, perlas, esponjas, tubos, láminas e implantes conformados.

5

La invención será ilustrada ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

Se emplearon los siguientes procedimientos para medir la estabilidad de los productos.

10 **Metodología**

Evaluación de la capacidad de absorción de agua

15 Se sumergieron 20 mg (Wd) de cada una de las muestras reticuladas secas en solución de tampón PBS para formulación durante 24 horas, para obtener un gel totalmente hinchado. El gel húmedo fue separado por filtración y el agua residual en la superficie se retiró empleando papel de seda. El gel húmedo se pesó para obtener Ws. De este modo, la capacidad de absorción de agua (WAC) (%) se puede calcular de acuerdo con la siguiente fórmula:

20

$$WAC(\%) = (Ws - Wd)/Wd \times 100$$

Resistencia a la digestión por hialuronidasa

25

Se suspendieron 200 mg de HA reticulado en 6 ml de solución tampón de PBS (pH=7,2) conteniendo 1000 U de hialuronidasa y se incubó a 37°C durante 24 horas. A continuación, la película se retiró y se enjuagó empleando tampón PBS y se recogió toda la solución de enjuagado para obtener un total de 10 ml de solución. Esta solución se hirvió durante 30 minutos para efectuar la precipitación de hialuronidasa. La solución se centrifugó entonces a 4000 rpm/10 minutos. La solución sobrenadante se completó a 25 ml empleando solución de PBS en un matraz volumétrico. La concentración de HA se midió empleando el ensayo de Carbazol.

30

La pérdida de peso de HA debido a la digestión con hialuronidasa se puede calcular empleando la siguiente fórmula:

35

$$\text{Pérdida peso HA (\%)} = [HA] \times 25/[HA]_o \times 100$$

en donde [HA] es la concentración de HA, [HA]_o es el contenido original en HA (mg).

Resistencia a radicales libres

40

Se emplearon agentes Ferton para crear radicales libres, los cuales se forman mediante 25 microlitros de ácido ascórbico 0,1 y 0,25 microlitros de 0,1M H₂O₂ en 5 ml de solución de PBS. A esta solución se añadieron 20 mg de muestra seca para la digestión. El tiempo de digestión es de 24 horas a 37°C. A continuación, la película se retiró y se enjuagó empleando tampón PBS y toda la solución de enjuagado se recogió y se completó a 25 ml empleando tampón PBS en un matraz volumétrico. La concentración de HA se midió empleando el ensayo de Carbazol. La pérdida de peso de HA se puede calcular empleando la misma fórmula que en la digestión con hialuronidasa.

45

Ejemplo 1

Formación de película de HA doblemente reticulado a partir de película de HA

50

Se moldearon 5 ml de HA (1%) durante 4 días a temperatura ambiente para obtener una película de HA. La película resultante se suspendió en una mezcla de CHCl₃ disolvente/solución ácida o alcalina/reticulante de 1,2,7,8-diepoxioctano o glutaraldehído. La reacción de reticulación se efectuó a temperatura ambiente durante un tiempo fijo (24 horas). Se añadió otra cantidad de agente reticulante y, si es necesario, se ajustó el pH, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas más, para efectuar la segunda reacción de reticulación. En la Tabla 1 se muestran las condiciones detalladas de la reticulación. Después de la reticulación, las muestras se lavaron con IPA y acetona durante tres veces, se sumergieron en IPA/agua desionizada (60/40) durante la noche y luego se lavaron con acetona y se secaron en un horno a 37°C hasta conseguir un peso constante.

60

65

TABLA 1 Formación de HA reticulado (CHA) a partir de película de HA

	Primer reticulante		Segundo reticulante		Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	pH	Capacidad absorción agua (%)	
	Nombre	Relación alimentación *	Nombre	Relación alimentación *					
5									
10									
	CHA-2	G	2,5/1	E	0,75/1	24h/24h	TA	H ⁺	414,4
15	CHA-8	E	0,75/1	E	0,75/1	24h/24h	TA	OH ⁻ /H ⁺	403,0
20	CHA-3	G	2,5/1	E	0,75/1	24h/24h	TA	H ⁺ /OH ⁻	4430,0
	CHA-5	E	0,75/1	G	2,5/1	24h/24h	TA	H ⁺	1017,2
	CHA-9	E	0,75/1	G	2,5/1	24h/24h	TA	OH ⁻ /H ⁺	4400,0
25									
Ejemplos de Referencia									
30	CHA-1	G	2,5/1	G	2,5/1	24h/24h	TA	H ⁺	11132,5
	CHA-4	E	0,75/1	E	0,75/1	24h/24h	TA	H ⁺	781,9
	CHA-6	E	0,75/1	E	0,75/1	24h/24h	TA	H ⁺ /OH ⁻	Disuelto
35	CHA-7	E	0,75/1	E	0,75/1	24h/24h	TA	OH ⁻	11989,1

* Relación de alimentación : relación en peso de HA a reticulante

E: = 1,2,7,8-diepoxi octano; G: = glutaraldehído

H⁺ representa un pH de alrededor de 4; OH⁻ representa un pH de alrededor de 10

CHA-1, CHA-4 y CHA-7 fueron preparados cada uno de ellos empleando las mismas condiciones para cada etapa de reticulación, proporcionando sólo enlaces éter (reticulación simple).

45

50

55

60

65

Ejemplo 2Formación de gel de HA doblemente reticulado a partir de solución de HA

5 Se disolvieron 0,1 g de HA en solución de 0,25N NaOH o solución de 0,25N de HCl para obtener soluciones HA con una concentración de 10% o 2,5%. Se añadió el agente reticulante y la mezcla se sometió a agitación mecánica. La primera reacción de reticulación se efectuó a 40°C durante un período de 2 horas aproximadamente. Se efectuó una segunda reacción de reticulación empleando una cantidad adicional del mismo reticulante, con ajuste de las condiciones de reacción. En la Tabla 2 se ofrecen las condiciones detalladas de la reacción. Después de la reticulación, el gel formado se lavó con IPA, acetona y se extrajo con IPA/agua durante la noche y luego se lavó tres veces con IPA y acetona respectivamente. Las muestras se secaron en un horno a 37°C hasta conseguir un peso constante. El producto se obtuvo como un gel opaco.

TABLA 2 Formación de HA reticulado (CHA) a partir solución de HA

	Primer reticulante		Segundo reticulante		Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	pH	Capacidad absorción agua (%)	
	Nombre	Relación alimentación*	Nombre	Relación alimentación*					
25	CHA-11	E	1/1	E	1/1	2h/2h	40	OH ⁻ /H ⁺	390,0
30	CHA-10	E	1/1	E	1/1	2h/2h	40	OH ⁻ /OH ⁻	620,0
	CHA-12	E	1/1	E	1/1	2h/2h	40	H ⁺ /OH ⁻	1830,0
	CHA-13	E	1/1	E	1/1	2h/2h	40	H ⁺ /H ⁺	disuelto
35	E: = 1,2,7,8-diepoxi octano H ⁺ representa un pH de alrededor de 4; OH ⁻ representa un pH de alrededor de 10								

Ejemplo 3Formación de HA doblemente reticulado (CHA) a partir de solución de HA por vía de película de HA

45 Se disolvieron 0,1 g de HA en solución de 0,25N NaOH o solución de 0,25N de HCl para obtener soluciones de HA con una concentración de 10% o 2,5%. Se añadió el agente reticulante. La reacción se efectuó en un plato Petri con poco o ninguna agitación mecánica. La primera reacción de reticulación se efectuó a temperatura ambiente durante un período de 48 o 72 horas aproximadamente. El producto intermedio se secó para proporcionar una película o lámina (dependiendo del espesor). Se efectuó una segunda reacción de reticulación empleando la metodología descrita en el Ejemplo 1. En la siguiente Tabla 3 se ofrecen las condiciones detalladas de la reacción. Después de la reticulación, el producto se lavó (x3) con IPA y acetona y se extrajo con IPA/agua durante la noche y luego se lavó acetona. Las muestras se secaron en un horno a 37°C hasta conseguir un peso constante y el producto se obtuvo en forma de película o lámina.

55

60

65

TABLA 3- Formación de HA reticulado (CHA) a partir de solución de HA por vía de película de HA

	Primer reticulante		Segundo reticulante		Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	pH	Capacidad absorción agua (%)	
	Nombre	Relación alimentación*	Nombre	Relación alimentación*					
5	CHA-17	E	0,375/1	E	0,5/1	72/24	TA	OH ⁻ /H ⁺	403,2
10	CHA-19	E-1	0,375/1	E	0,5/1	72/24	TA	OH ⁻ /H ⁺	1030,0
15	EJEMPLOS DE REFERENCIA								
20	CHA-14	E	0,375/1	/	/	72	TA	Neutro	2419,1
25	CHA-15	E	0,375/1	/	/	72	TA	H ⁺	2128,3
30	CHA-16	E	0,375/1	/	/	72	TA	OH ⁻	1318,6
35	CHA-18	E-1	0,375/1	/	/	72	TA	OH ⁻	2600,4
E: = 1,2,7,8-diepoxioctano; E-1: epiclorhidrina H ⁺ representa un pH de alrededor de 4 OH ⁻ representa un pH de alrededor de 10									

TABLA 4 Bioestabilidad de HA reticulado contra hialuronidasa y radicales libres

NO	Pérdida de peso (%)		
	Digestión con hialuronidasa	Digestión Ferton (radicales libres)	
35	CHA-16	10,45 ± 0,21	7,89 ± 1,92
40	CHA-17	1,45 ± 0,92	5,63 ± 2,73

Ejemplo 4

45 Se disolvieron 0,1 g de HA en 2 ml en solución de 1N NaOH durante la noche para proporcionar una solución alcalina de HA al 5%. A esta solución se añadieron 0,2 ml de 1,2,7,8-diepoxioctano. Se añadieron luego 0,2 ml de cloroformo mientras se agitaba a 40°C durante 30 minutos. Después de formar la reticulación éter se añadieron 2,2 ml de 1N HCl para cambiar el pH de la solución a un valor entre 3 y 4. Se añadieron otros 0,2 ml de 1,2,7,8-diepoxioctano y luego se añadieron 2,2 ml de cloroformo mientras se agitaba a 40°C durante 30 minutos. Después de la reticulación éster, el gel formado fue precipitado con 20 ml de acetona y purificado de acuerdo con el mismo procedimiento detallado en el Ejemplo 2.

Ejemplo 5

55 A 5 ml de solución de HA/NaOH (1N) se añadieron 0,5 ml de epiclorhidrina y 0,2 ml de cloroformo y se mezcló a temperatura ambiente durante 10 minutos. La solución fue colada en un plato Petri y se dejó secar como una película de HA reticulado (CHA-18). Después de la neutralización con 1N HCl, la muestra de CHA-18 se suspendió en 20 ml de cloroformo/solución acuosa ácida 0,1N (3/1 v/v) y se añadieron 0,2 ml de 1,2,7,8-diepoxioctano y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas. La muestra resultante, CHA-19, fue purificada de acuerdo con el mismo procedimiento detallado en el Ejemplo 1.

Ejemplo 6

65 Se mezclaron 20 ml de una solución al 25% de HA/NaOH (1,0N) con volúmenes variables de 1,2,7,8-diepoxioctano durante 5 minutos con agitación. La solución mezclada se esparció entonces sobre un plato Petri revestido con

poliestireno, sin colágeno, de 7 cm de dimensión y se tapó con una cubierta. Después de 24 horas a temperatura ambiente, se retiró la cubierta y el gel reticulado se secó durante 48 horas. La película seca y con un espesor controlable fue neutralizada con acetona/solución de HCl y purificada con acetona/agua, acetona e IPA. El material de tipo lámina reticulado en primer lugar se puso en una solución de acetona/HCl a pH 5 y 0,4 ml de 1,2,7,8-diepoxioctano durante otras 24 horas de reticulación a temperatura ambiente. La lámina obtenida fue purificada con acetona/agua, acetona e IPA/agua, IPA varias veces.

La lámina de HA doblemente reticulado, así obtenida, es insoluble en agua y se comprobó que absorbía una cantidad de 10 veces de agua para formar un gel transparente. También mostró una resistencia mecánica muy buena, lo cual constituye una característica importante para su aplicación técnica en tejidos.

Análisis 13 C NMR en estado sólido de muestras de HA

El análisis 13 C NMR en estado sólido del hialuroano y de dos muestras doblemente reticuladas se realizó a 50 MHz empleando un espectrómetro Advance 200. Los espectros obtenidos empleando un tiempo de contacto de 1 ms en la secuencia de impulsos de polarización transversal (CP) estándar se muestran en las figuras 1-3. Se obtuvo también un espectro de la muestra número 3 que contiene la referencia interna, tetrakis(trimetil)silano (TKS, desplazamiento químico de 3,2 ppm), empleando un tiempo de contacto de 5 ms. (Figura 4). Las asignaciones de picos con referencia a TKS son como sigue.

	Desplazamiento químico, ppm
C=O en carboxilo y acetilo	170-180
C=O en éster para muestras modificadas	165-170 (hombro)
C ₁	95-110
C ₂ -C ₅ más OCH y OCH ₂ en modificador	65-90
C ₆	60-65
C-N	53-60
CH ₂ en modificador no enlazado a O	20-40
CH ₃ en acetilo	20-25

La muestra 1 (Figura 1) es ácido hialurónico puro sin modificaciones. Las formulaciones reales para muestra 2 y muestra 3 se ofrecen en la siguiente tabla:

	Primer reticulante				Segundo reticulante			
	Relación alimentación	pH	Temperatura reacción (°C)	Tiempo reacción (horas)	Relación alimentación	pH	Temperatura reacción (°C)	Tiempo reacción (horas)
Muestra 2	3/1	10	TA	72				
Muestra 3	1/2	10	TA	2 horas	1/2	4	TA	2 horas

Muestra 2 (Figura 2): preparada de acuerdo con el método del Ejemplo 3 pero sin la segunda reticulación. La relación de alimentación es la cantidad de HA con respecto a 1,2,7,8-diepoxioctano. La película formada fue cortada en mallas finas para análisis NMR.

Muestra 3 (Figuras 3 y 4): preparada de acuerdo con el método del Ejemplo 2 para formar un gel, el cual se molió a un polvo fino para análisis NMR.

Reivindicaciones

- 5 1. Un procedimiento para la preparación de ácido hialurónico reticulado múltiple (HA), cuyo procedimiento comprende la reticulación de HA a través de dos o más grupos funcionales diferentes, en donde dicha reticulación se efectúa poniendo en contacto HA con uno o más agentes de reticulación con el fin de formar dos o más tipos diferentes de enlaces funcionales, entre las moléculas de HA, en el que dichos dos o más tipos diferentes de enlaces funcionales se seleccionan de entre éter, éster, sulfona, amina, imino y enlaces de amida, en el que, en dicho proceso, una primera reacción de reticulación se lleva a cabo y una reticulación adicional agente, que puede ser la misma o diferente de la primera, se añade a la mezcla de reacción para efectuar la segunda reticulación y en el que el agente de reticulación se selecciona de entre formaldehído, glutaraldehído, divinilsulfona, un polianhídrido, un polialdehído, un alcohol polihídrico, carbodiimida, epiclorhidrina, diglicidiléter de etilenglicol, butanodiol diglicidiléter, poliglicidiléter de poliglicerol, polietilenglicol diglicidil éter, polipropilenglicol diglicidil éter, o un bis-o poli-epoxi reticulante.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde los grupos funcionales se eligen entre hidroxilo, carboxilo y amino.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que un enlace éter se forma usando un agente de reticulación seleccionado de bis y poli-epóxidos bajo condiciones alcalinas.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que un enlace éster se forma usando un agente de reticulación seleccionado de bis y poli-epóxidos bajo condiciones ácidas.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, en donde el reticulante se elige entre 1,2,3,4-diepoxibutano y 1,2,7,8-diepoxioctano.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en donde se forma un enlace éter empleando glutaraldehído como agente reticulante bajo condiciones ácidas.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la reticulación de cada tipo de grupo funcional se efectúa de manera secuencial.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende reticular HA por vía de un primer grupo funcional y a continuación reticular adicionalmente el producto por vía de un segundo grupo funcional, en donde dichos primero y segundo grupos funcionales representan entidades químicas diferentes.
- 40 9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en donde el HA se retícula primeramente por vía de los grupos hidroxilo mediante formación de enlaces éter y a continuación se retícula por vía de los grupos carboxilo mediante la formación de enlaces éster.
- 45 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha reticulación múltiple HA se retícula con uno o más agentes de reticulación a fin de formar dos tipos diferentes de enlaces funcionales.
- 50 11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende:
- (a) reticular HA por vía de un primer grupo funcional y
- (b) reticular luego adicionalmente el producto de (a) por vía de un segundo grupo funcional, en donde dichos primero y segundo grupos funcionales representan entidades químicas diferentes.

55

60

65

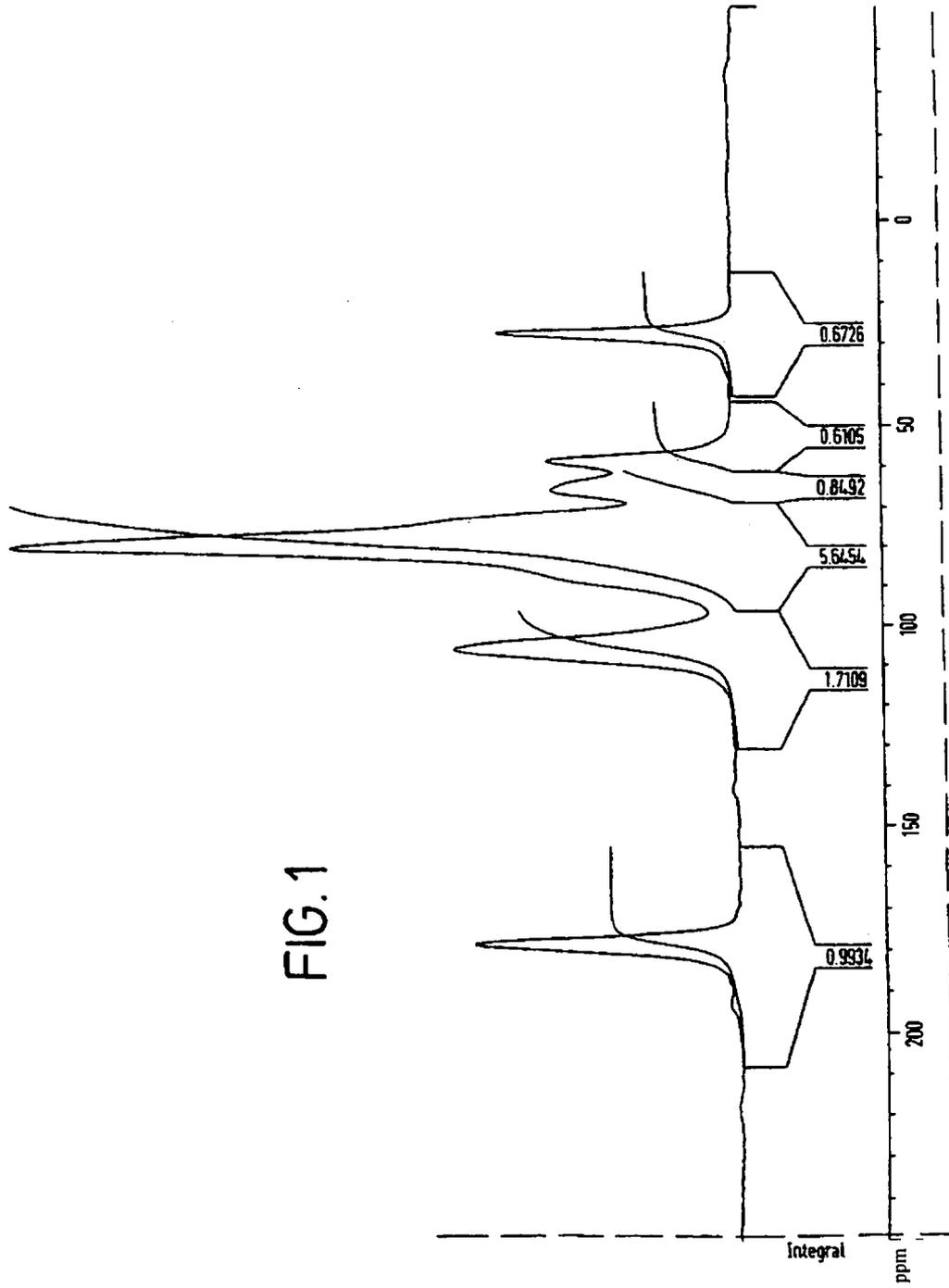


FIG. 1

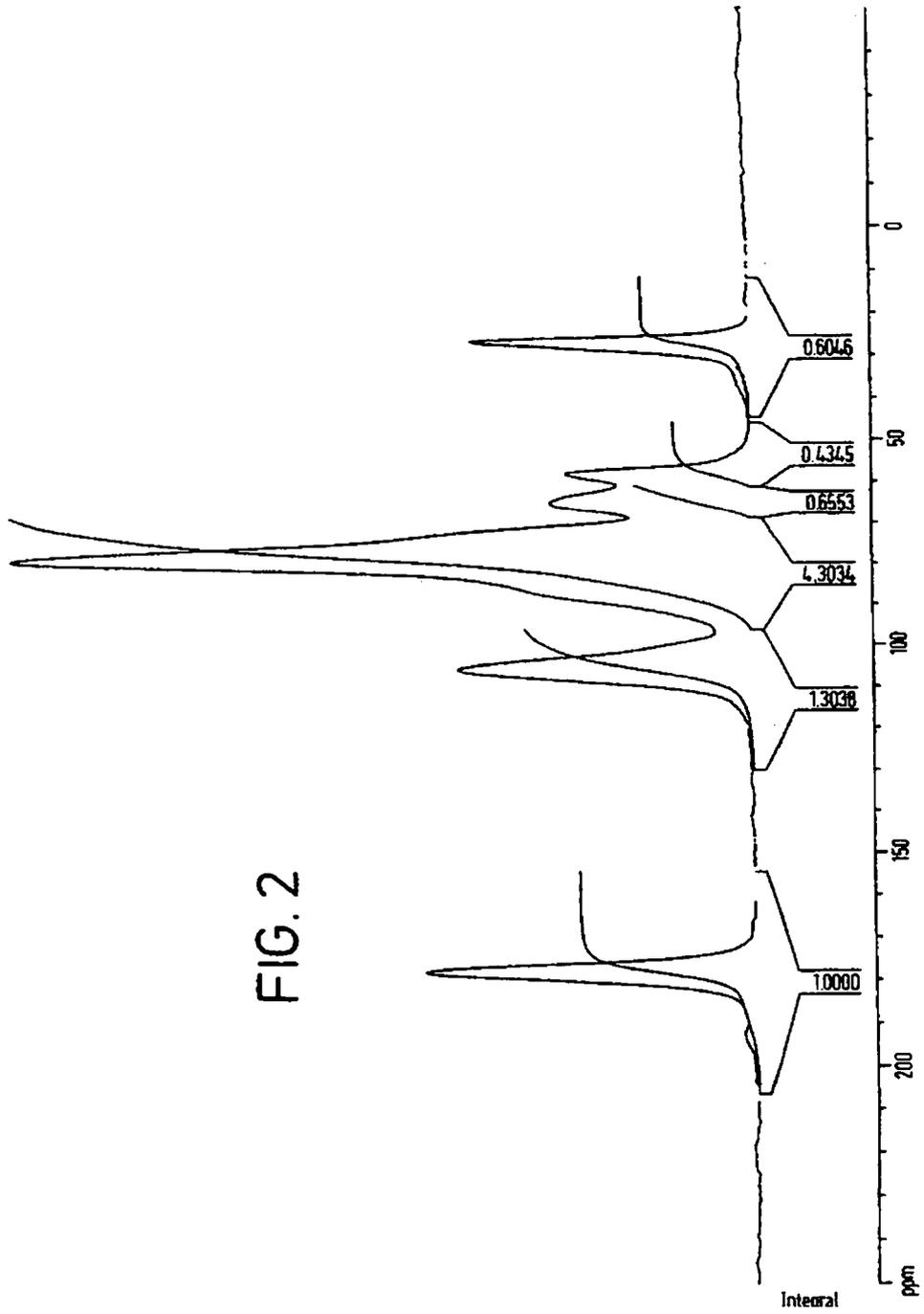


FIG. 2

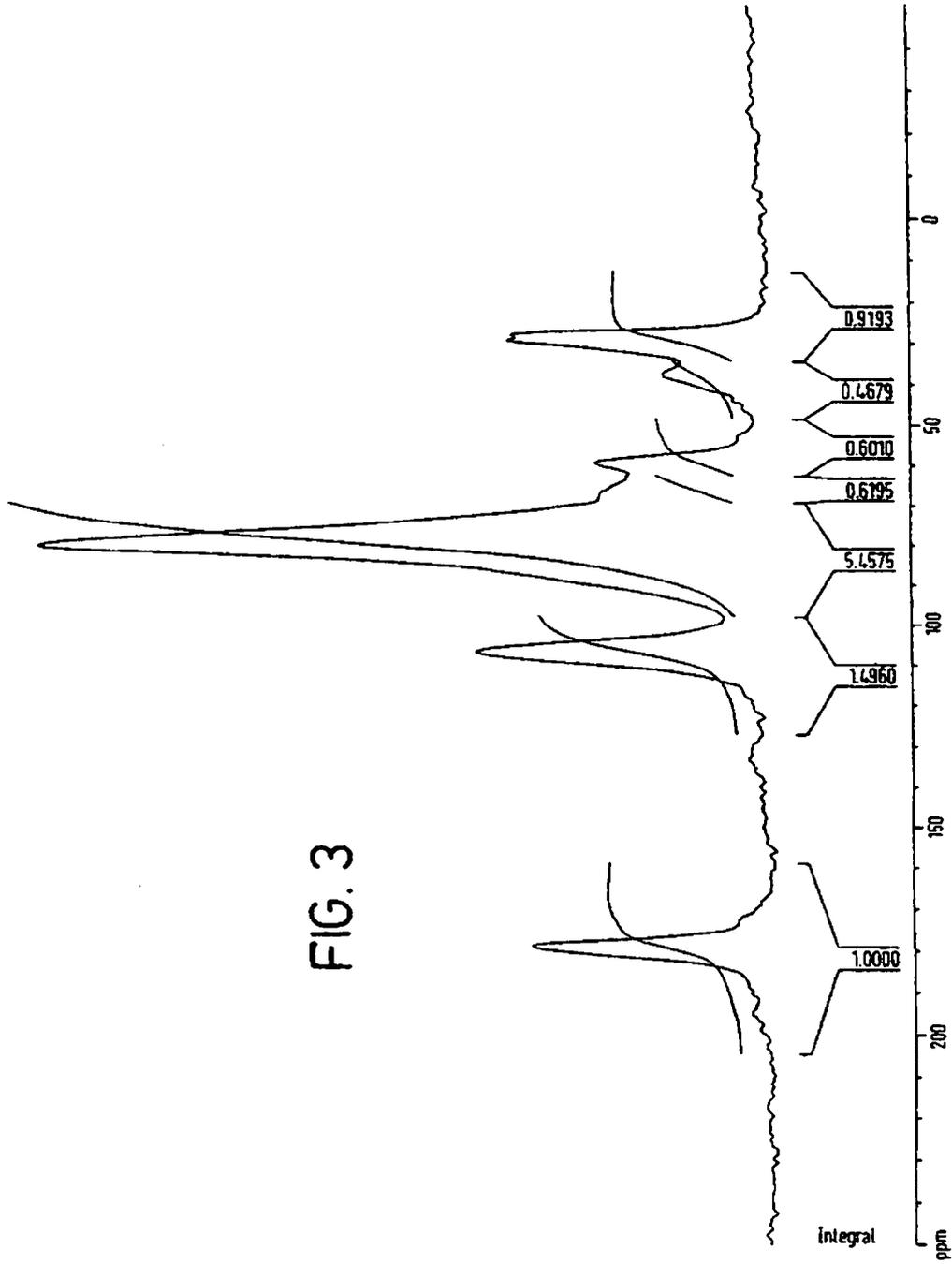


FIG. 3

