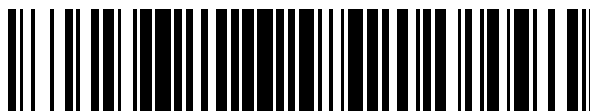


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 862**

51 Int. Cl.:  
**A61L 27/20** (2006.01)  
**A61L 27/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07855366 .6**  
96 Fecha de presentación: **21.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2107913**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.10.2009**

54 Título: **Uso de polisacáridos tiolados para el aumento de tejido**

30 Prioridad:  
**22.12.2006 AT 21362006**  
**22.12.2006 US 871534 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2012**

73 Titular/es:  
**CROMA-PHARMA GESELLSCHAFT M.B.H.**  
**(100.0%)**  
**INDUSTRIEZEILE 6**  
**2100 LEOBENDORF, AT**

72 Inventor/es:  
**HORNOF, MARGIT**

74 Agente/Representante:  
**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 391 862 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

Uso de polisacáridos tiolados para el aumento de tejido

5 La invención se refiere al uso de polímeros para el aumento de tejido por razones médicas y cosméticas.

10 Para el aumento de tejidos, se usan habitualmente polímeros como, por ejemplo, ácido hialurónico entrecruzado con compuestos éter o éster (entrecruzado con divinilsulfona: documento WO 2006/056204; entrecruzamiento con aldehídos: documento US 4.713.448; entrecruzado con compuestos epoxi multifuncionales: documento EP 0 161 887). Después de la implantación en el cuerpo humano estos compuestos pueden producir reacciones inflamatorias, reacciones alérgicas y reacciones a cuerpos exógenos (Parade et al. *Skinmed.* 4 (2005): 345-349; Lemperle et al. *Plast. Reconstr. Surg.* 118 (2006): 92S-107S). Tales procesos inflamatorios pueden producir el desarrollo de compuestos de oxígeno reactivo.

15 La activación de oxígeno a compuestos de oxígeno reactivo (radicales libres y especies de oxígeno no radical) es parte de los procesos metabólicos normales en el marco de los procesos celulares, reacciones de autooxidación y reacciones enzimáticas. Causas adicionales para la formación de compuestos de oxígeno reactivo son, por ejemplo, procesos inflamatorios, lesiones en articulaciones y tejidos así como factores medioambientales exógenos, tales como radiación UV, humo de cigarrillo, exposición a radiación y ozono. Normalmente, existe un equilibrio entre los procesos oxidativos y reductores. Sin embargo, si predominan las reacciones oxidativas, se desarrollará una agresión oxidativa (afección oxidativa). Mediante el ataque de los radicales libres, se dañan lípidos, proteínas y ADN. Este daño es, entre otros, probablemente la causa de los cambios y enfermedades relacionados con la edad, por ejemplo, del envejecimiento de la piel, diabetes, enfermedades vasculares y enfermedades neurodegenerativas.

25 Los radicales libres, tal como los radicales hidroxilo, en muchos casos son corresponsables para enfermedades inflamatorias, por ejemplo, para el desarrollo y perpetuación de enfermedades inflamatorias de las articulaciones, tal como artritis reumatoide. Dentro de marco de una artrosis, los radicales libres producirán la degradación del ácido hialurónico en el líquido sinovial, lo que produce un descenso en la viscosidad y en el efecto lubricante del líquido sinovial (Lepperdinger et al. en *Chemistry and Biology of Hyaluronan* (2004): 71-82).

30 Normalmente, también el líquido de las lágrimas contiene neutralizantes de radicales, tales como, por ejemplo, cisteína, ácido ascórbico y glutatión reducido, y enzimas antioxidantes tal como, por ejemplo, lactoferrina y lisozima, de modo que se proteja la superficie del ojo frente al daño oxidativo por radicales libres (radicales hidroxilo, por ejemplo) (Rose et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217 (1998): 397-407).

35 Mediante la eliminación de los radicales libres por medio de neutralizantes de radicales, se pueden inhibir los procesos inflamatorios. Las funciones protectoras endógenas contra los compuestos de oxígeno reactivo las llevan a cabo enzimas, tales como catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), así como glutatión reducido (GSH) y proteínas formadoras de hierro y cobre (por ejemplo, ferritina, albúmina, lactoferrina). Los antioxidantes exógenos importantes son el ácido ascórbico y sus derivados, tocoferol y retinoides. La mayoría de los medicamentos antiinflamatorios de bajo peso molecular, tal como, por ejemplo, diclofenaco y piroxicam, también tienen propiedades neutralizantes de radicales (Aruoma y Halliwell, *Xenobiotica* 18 (1988): 459-470).

45 El ácido hialurónico, que se usa con frecuencia para el aumento de tejido, muestra él mismo un efecto antiinflamatorio secundario y es un neutralizante débil de radicales hidroxilo. Para aumentar el efecto antioxidante del ácido hialurónico y para reducir las reacciones inflamatorias después de la inyección de ácido hialurónico se ha propuesto la aplicación combinada de ácido hialurónico con manitol (documento WO 2004/073759). Sin embargo, este tipo de aplicación es desventajosa porque el manitol puede difundir fuera del depósito de ácido hialurónico. En un planteamiento adicional se conjugó la enzima superóxido dismutasa al ácido hialurónico lo que produjo una disminución de la actividad enzimática del 30% (Sakurai et al. *Glycoconj J.* 14 (1997): 723-728). Aunque ambas proposiciones aumentan el efecto antioxidante del ácido hialurónico, el efecto deseado dura un periodo de tiempo corto, porque la resorción del ácido hialurónico no disminuye. El ácido hialurónico sin modificar, es decir, ácido hialurónico sin entrecruzar, se resorbe en un par de horas o días después de su implantación en el cuerpo humano.

55 El documento WO 00/16818 divulga el uso de ácidos hialurónicos químicamente modificados que gelifican in situ. Sin embargo, en el documento WO 00/16818 no permanecen grupos tiol después de la reacción de entrecruzamiento.

60 Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos para el aumento de tejidos que, debido a sus propiedades neutralizantes de radicales y de formación de complejos de iones metálicos multivalentes, tienen un efecto antioxidante y simultáneamente se caracterizan por un tiempo de permanencia más largo en el sitio de aplicación.

65 Por tanto, la presente invención se refiere al uso de un polímero que contiene grupos tiol para producir un implante para el aumento y estabilización de tejido, en donde el polímero es un polisacárido, que es preferiblemente

biodegradable. La aplicación se produce preferiblemente a través de inyección subdérmica, intradérmica, subcutánea o intramuscular.

5 Se ha encontrado que los polímeros que contienen grupos tiol, es decir, compuestos poliméricos que contienen grupos tiol, fisiológicamente tolerables, son particularmente adecuados para el aumento de tejido, en donde estos polímeros muestran al mismo tiempo un efecto protector antiinflamatorio/antioxidante.

10 Los procesos oxidativos desempeñan un papel decisivo en un gran número de enfermedades, ya que tales procesos producen daño del ADN, proteínas y lípidos. Los procesos oxidativos pueden estar inducidos por causas extrínsecas (por ejemplo, por influencias medioambientales, tales como radiación (radiación UV, radiación ionizante), agentes oxidantes, etc.) y causas intrínsecas (por ejemplo, por inflamaciones), respectivamente.

15 El acoplamiento directo de antioxidantes tiol al polímero tiene la ventaja de que el efecto protector antioxidante se mantiene durante el tiempo de permanencia completo del polímero y que el entrecruzamiento debido a las funciones de los enlaces disulfuro contribuye a la estabilidad del polímero. La mejora de las propiedades neutralizantes de hidroxilo y antioxidantes del ácido hialurónico alcanzadas por tiolación se ejemplifica en la figura 2, la figura 3 y la figura 4.

20 Según la presente invención el término "implante" se refiere a una preparación, líquida, similar a gel o semisólida, inyectable, preferiblemente estéril, que permanecerá esencialmente durante al menos varias semanas a meses o incluso durante años en o en la proximidad del sitio de aplicación hasta que el implante se degrada al menos parcialmente, preferiblemente sustancialmente por completo.

25 Según una forma de realización preferida, el polímero que contiene grupos tiol tiene una masa molecular de al menos 10000 g/mol, preferiblemente de al menos 25000 g/mol, en particular al menos 50000 g/mol.

30 La masa molecular del polímero que contiene grupos tiol inventivo es de relevancia particular si es importante que, cuando se usa el polímero, el último permanezca directamente en el sitio activo o en la proximidad inmediata del mismo durante un periodo de tiempo más largo que los antioxidantes conocidos hasta ahora que tienen una masa molecular sustancialmente menor. Esto es particularmente ventajoso si es importante controlar procesos de oxidación locales o pararlos, respectivamente, o reducirlos. Por tanto, se prefiere que el polímero que contiene grupos tiol tenga una masa molecular de al menos 10000 g/mol.

35 Los grupos tiol en el polímero preferiblemente forman enlaces disulfuro inter y/o intramoleculares.

40 La capacidad del polímero que contiene grupos tiol inventivo para formar enlaces disulfuro es necesaria si es importante para ejercer las propiedades antioxidantes en el sitio activo o en la proximidad del mismo. Como se ilustra en la figura 1, se puede usar el polímero que contiene grupos tiol reducido para reducir el disulfuro de glutatión que desempeña un papel decisivo en la detoxificación de peróxido de hidrógeno. Debido a sus propiedades antioxidantes, los polímeros que contienen grupos tiol además inhiben la agresión oxidativa directamente producida por los radicales hidroxilo y, por tanto, pueden prevenir el daño del ADN, lípidos y proteínas. Además, los polímeros que contienen grupos tiol inhiben la formación de radicales hidroxilo formando complejos con iones de hierro divalentes. De esta manera, la reacción de Fenton de peróxido de hidrógeno a radicales hidroxilo se puede parar o reducir en gran parte, respectivamente.

45 Después de la síntesis del polímero según la presente invención todos sus grupos tiol están preferiblemente disponibles como grupos tiol libres, de modo que el polímero se entrecruza en un grado bajo o incluso no se entrecruza en absoluto. Esto permite producir soluciones acuosas de fase única de polímeros que fácilmente se pueden procesar adicionalmente y permite introducir en dichos polímeros excipientes farmacéuticos o compuestos farmacéuticamente activos. El entrecruzamiento se produce después en condiciones controladas cambiando el pH a valores de pH fisiológico entre pH 6-10,5 en presencia de oxígeno. La adición de un agente de entrecruzamiento no es necesaria. Para la aplicación en el aumento de tejido por razones médicas y cosméticas se prefiere el entrecruzamiento parcial de los polímeros a través de puentes disulfuro.

50 También se pudo mostrar que los polímeros que contienen grupos tiol entrecruzados a través de puentes disulfuro para el aumento de tejido muestran una estabilidad mucho mayor, comparados con polímeros convencionales conocidos en la técnica.

60 El polímero según la presente invención se puede usar de forma cosmética o terapéutica según lo cual preferiblemente se aumenta tejido blando, en particular tejido dérmico, tejido muscular y tejido conjuntivo. El aumento dérmico cosmético se usa preferiblemente para tratar cosméticamente arrugas profundas en la región de la cara, en particular pliegues nasolabiales, pliegues de los labios superiores y pliegues en la frente, pliegues finos en el ojo y la región de la mejilla, pequeñas desigualdades en la piel y aumento de mejillas hundidas.

65 La parte del grupo tiol del polímero preferiblemente es más de 20  $\mu$ moles/g de polímero, preferiblemente más de 50  $\mu$ moles/g de polímero, en particular más de 100  $\mu$ moles/g de polímero.

Las propiedades antioxidantes de los polímeros que contienen tiol, inventivos son particularmente ventajosas si el polímero comprende al menos 50  $\mu$ moles de grupos tiol por gramo de polímero.

5 Según la invención, los polímeros que son fisiológicamente tolerables y que pueden ser modificados por grupos tiol son adecuados. Los polímeros base se seleccionan del grupo de polisacáridos. Los polímeros que contienen grupos tiol preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste en ácido hialurónico que contiene grupos tiol, quitosano que contiene grupos tiol y combinaciones de estos polímeros que contienen grupo tiol han demostrado ser particularmente ventajosas para el uso según la invención.

10 Algunos de estos polímeros, tales como, por ejemplo, ácido hialurónico tiolado, ya se usan como excipientes en medicamentos, por ejemplo, de modo que se introduzcan sustancias activas de forma más fácil y eficaz en capas de moco (cf., por ejemplo, el documento WO 00/25823). Sin embargo, ahora se ha encontrado sorprendentemente que tales compuestos poliméricos muestran ellos mismos un efecto farmacológico y se pueden usar como antioxidantes.  
15 Los grupos tiol de los polímeros son capaces de aumentar significativamente las propiedades antioxidantes posiblemente presentes en polímeros no tiolados, o de impartir propiedades antioxidantes a los polímeros.

Se puede influir el tiempo de permanencia mediante la elección del polímero. Los biopolímeros ácido hialurónico y quitosano se degradan por hialuronidasa y lisozima, respectivamente, presentes de forma natural en un mamífero, en particular en un ser humano. Para la degradación de polímeros sintéticos como ácido poliacrílico o poliacrilamida no hay enzimas presente en el cuerpo de un mamífero lo que tiene la consecuencia de que dichos polímeros se tienen que eliminar del cuerpo mediante cirugía, según lo cual los polímeros biodegradables se degradan durante un periodo de tiempo de al menos 6, 12, 24 o incluso 60 meses por enzimas y por consiguiente se eliminan del cuerpo.

20 Al menos un grupo tiol del polímero inventivamente usado deriva preferiblemente de un compuesto tiol fisiológicamente tolerable, por ejemplo, cisteína, cisteamina y N-acetil-cisteína, lo que significa que estos compuestos tiol o sus derivados se pueden usar para tiolar polímeros.

Según la invención, la tiolación se puede realizar por todos los tipos de reacciones químicas por las que los compuestos tiol se unen a polímeros, en particular a polímeros solubles en agua. Por varias razones, el uso de cisteína y derivados de cisteína es aconsejable para la tiolación, ya que los últimos son fisiológicamente tolerables, por una parte, y fácil y baratos de obtener, por otra parte. La cisteína y los derivados de cisteína preferiblemente se pueden unir al polímero a través de un enlace amida. Por otra parte, el polímero inventivo, también se puede preparar de modo que en el curso de la producción del polímero, al menos se copolimerice un monómero con grupos tiol, que tenga grupos tiol libres en el polímero, lo que significa que los grupos tiol no se hacen reaccionar directamente en la reacción de polimerización. Tal polímero que contiene al menos un monómero que tiene grupos tiol libres en el polímero también se prefiere según la invención (cf. por ejemplo, Bernkop-Schnürch, Adv. Drug Deliv. Rev. 57 (2005): 1569-1582).

40 Dependiendo del sitio de aplicación o sitio activo, el implante de la invención se proporciona en una formulación correspondiente. Las sustancias auxiliares requeridas en la misma dependerán cada una de la formulación y son suficientemente conocidas para los expertos en la materia (cf. por ejemplo, Sarfaraz Niazi, "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", CRC Press (2004)).

45 Los polímeros que contienen grupos tiol según la invención también se pueden usar por vía subcutánea e intradérmica para el aumento dérmico. En cosmética, los polímeros tales como, por ejemplo, el ácido hialurónico, son agentes auxiliares conocidos y usados con frecuencia para aliviar los signos del envejecimiento de la piel (arrugas, sequedad, pérdida de elasticidad) que, entre otros, se asocian con una reducción de ácido hialurónico por radicales libres en el tejido (Agren et al., Free Radic. Biol. Med. 23 (1997): 996-1001). Debido a las propiedades antioxidantes de los polímeros que contienen grupos tiol inventivos, preferiblemente ácido hialurónico que contiene grupos tiol, la degradación mediada por radicales del ácido hialurónico que contiene grupos tiol disminuye después de un aplicación subcutánea o intradérmica.

50 En las formulaciones para la aplicación subcutánea o intradérmica, el polímero que contiene grupos tiol puede estar presente a una concentración desde el 0,001-20% (m/v), preferiblemente desde el 0,01-10% (m/v). Además, las formulaciones pueden contener excipientes adicionales que normalmente se usan para preparaciones para la aplicación subcutánea o intradérmica, por ejemplo, sales tampones, estabilizantes, excipientes para ajustar la osmolalidad deseada, excipientes para ajustar la viscosidad deseada y excipientes para aumentar la tolerancia de la formulación. La osmolalidad y el pH de la formulación acabada preferiblemente están en el intervalo fisiológico.

60 El implante es particularmente preferido formulado como gel o como preparación acuosa, preferiblemente de fase única.

65 El implante según la invención que comprende al menos un polímero que contiene grupos tiol se puede formular en una pluralidad de formas de aplicación. Particularmente ventajosa es la provisión de la formulación como solución

acuosa /preparación. Si el implante se proporciona como una solución acuosa, la última se debe administrar de una manera sencilla por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular en una localización deseada.

5 El uso de polímeros que tienen la forma de geles y soluciones acuosas de baja viscosidad, o en forma de preparaciones sólidas (también como insertos para la liberación controlada de la sustancia activa) como implantes en el cuerpo humano puede producir reacciones inflamatorias en el tejido circundante. Mediante el efecto neutralizante de radicales y antioxidante que ejercen los polímeros que contienen grupos tiol inventivos, estas reacciones inflamatorias se pueden aliviar o eliminar por completo, respectivamente. Esto es aplicable, por ejemplo, a la aplicación intradérmica y subcutánea de los polímeros que contienen grupos tiol para la inyección debajo de las arrugas, para el uso de los polímeros que contienen grupos tiol para el aumento de esfínteres y para la implantación de preparaciones (semi-)sólidas basadas en polímeros que contienen grupos tiol.

10 Resultó que es particularmente ventajoso usar el polímero según la presente invención como una preparación acuosa de fase única homogénea que se puede distribuir después de la aplicación de una manera fácil y que puede ser degradada igualmente de forma lenta por enzimas presentes en el sitio de aplicación. Con partículas poliméricas entrecruzadas como se divulga, por ejemplo, en el documento WO 99/31167 solo se pueden producir formulaciones de dos fases que consisten en una suspensión de partículas en un medio soporte líquido. Con tales formulaciones es difícil estimar la cantidad requerida del implante para un aumento (por ejemplo, inyecciones por debajo de las arrugas), porque el medio soporte se absorbe bastante deprisa el cuerpo y las partículas residuales tienen un volumen significativamente reducido. Por tanto, la aplicación se tiene que corregir lo que hace difícil obtener un resultado satisfactorio.

15 Según una forma de realización preferida, el medicamento o el implante además comprende adicionalmente al menos una sustancia activa; para la aplicación en dermatología, preferiblemente una sustancia activa del grupo de anestésicos locales (por ejemplo, lidocaína, prilocaína, procaína, mepivacaína), antimicóticos (por ejemplo, omoconazol, clotrimazol, bifonazol, miconazol, floconazol, itraconazol, oxiconazol, fenticonazol, terbinafina, ciclopirox, amorolfina), antihistaminas, agentes antialérgicos, agentes antiinflamatorios, antibióticos (por ejemplo, tetraciclina y derivados, ácido fusidínico, cloranfenicol, neomicina, bacitracina, gentamicina, tirotricina, mupirocina, virginamicina, rifaximina y ampicacina), agentes quimioterapéuticos, agentes antivíricos, emolientes, agentes protectores de la piel, agentes para el tratamiento de heridas, agentes antiacné tópicos y corticoesteroides, antiflogísticos no esteroideos, agentes para el tratamiento de hemorroides, antisépticos tópicos y agentes que contienen yodo. Además, en el implante puede estar contenido al menos un excipiente farmacéutico del grupo de sales tampones, agentes conservantes, excipientes para ajustar la osmolalidad deseada, excipientes para ajustar la viscosidad deseada, estabilizantes, emolientes, materiales de recubrimiento, agentes de flujo, aglutinantes, lubricantes, rellenos, desecantes, agentes disgregantes, solventes, solubilizantes y excipientes para aumentar la tolerancia de la formulación.

20 Además de los polímeros que contienen grupos tiol inventivos y los excipientes posiblemente añadidos requeridos o de ventaja para formulaciones particulares, el medicamento o implante, respectivamente, puede comprender sustancias activas adicionales. Las sustancias activas, que preferiblemente se añaden al polímero que contiene grupos tiol, pueden tener ellas mismas propiedades antioxidantes o puede servir para curar, aliviar o prevenir la enfermedad antioxidante o la enfermedad causada por la agresión oxidativa, respectivamente. Se pueden mencionar a modo de ejemplo en este contexto sustancias antiinflamatorias y vitaminas que tienen actividad antioxidante.

25 Según una forma de realización preferida de la presente invención, el implante comprende además al menos un polímero sin modificar. En implantes que comprenden tanto polímeros que contienen grupos tiol como también polímeros sin modificar, su relación de mezcla uno respecto al otro es variable. Según la invención, en "polímeros sin modificar" se resumen los que están completamente sin modificar o que están modificados, sin embargo no tienen ningún grupo tiol, respectivamente.

30 Según una forma de realización preferida de la presente invención, el implante comprende el polímero que contiene grupos tiol a una concentración desde el 0,001 hasta el 100% en peso, preferiblemente desde el 0,01 hasta el 90% en peso, incluso más preferido desde el 0,05 hasta el 80% en peso; en donde la administración se produce más preferiblemente a una concentración del 0,1 al 20%, o incluso lo más preferiblemente del 0,1 al 10%.

35 El implante según la invención puede consistir por completo en el polímero que contiene grupos tiol o puede estar mezclado con excipientes, soportes y sustancias farmacéuticamente activas.

40 Debido a los grupos tiol contenidos en el polímero de la invención, el polímero tiene propiedades antioxidantes.

45 Según una forma de realización preferida de la presente invención, el tejido que se va a aumentar se selecciona del grupo que consiste en tejido dérmico, tejido muscular y tejido conjuntivo.

50 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un implante para el aumento de tejido que comprende al menos un polímero que contiene grupos tiol como se ha definido anteriormente.

Un aspecto aún adicional de la presente invención se refiere a un método para el tratamiento cosmético de la piel y para reducir y/o prevenir el envejecimiento de la piel, en el que se aplica un polímero que contiene grupos tiol como se ha definido anteriormente, por vía subcutánea y/o intradérmica.

5 Los polímeros que contienen grupos tiol se pueden usar para el tratamiento cosmético de la piel y para reducir el envejecimiento de la piel. Los polímeros, tales como, por ejemplo, ácido hialurónico, son agentes auxiliares bien conocidos y usados con frecuencia en cosmética, por ejemplo, para la inyección debajo de las arrugas y en los labios. Para este fin, se usa principalmente un gel viscoso de moléculas de cadena larga que se degrada muy lentamente en el cuerpo. En un proceso adicional, los polímeros se rompen con luz UV, masajeados en la piel y posteriormente tratados con laser, según lo cual los fragmentos de polímero masajeados reaccionan de nuevo a macromoléculas en la piel. Tales polímeros se usan como una alternativa al colágeno.

15 El uso cosmético de los polímeros, en particular de ácido hialurónico, puede producir efectos secundarios parcialmente pronunciados, tales como, por ejemplo, erupción y enrojecimiento cutáneos, basados en agresión oxidativa. Se ha encontrado ahora que cuando se administran polímeros que contienen grupos tiol, tales efectos secundarios se pueden prevenir por completo o reducir en gran parte, respectivamente.

20 La invención se explicará en más detalle a modo de los siguientes ejemplos y figuras a los que, por supuesto, no está restringida.

La figura 1 muestra una representación esquemática del mecanismo activo antioxidante de los polímeros que contienen grupos tiol.

25 La figura 2 muestra la inhibición del efecto oxidante de radicales hidroxilo por soluciones acuosas al 0,1% (m/v) de ácido hialurónico tiolado en comparación con polímeros sin modificar ( $n \geq 3$ ;  $\pm$  DE).

30 La figura 4 muestra la inhibición del efecto oxidante de radicales hidroxilo por soluciones acuosas al 0,1% (m/v) de ácido hialurónico tiolado modificado a varios grados (200  $\mu$ M de grupos tiol/g de polímero y 70  $\mu$ M de grupo tiol/g de polímero) en comparación con ácido hialurónico sin modificar ( $n \geq 4$ ;  $\pm$  DE).

La figura 5 muestra la inhibición de la oxidación lipídica en córnea porcina *in vivo* por hidroxilo por soluciones acuosas al 0,1% (m/v) de ácido hialurónico tiolado en comparación con polímeros sin modificar ( $n \geq 3$ ;  $\pm$  DE).

## 35 Ejemplos

### Ejemplo 1: Inhibición del efecto oxidativo de radicales hidroxilo por polímeros que contienen grupos tiol inventivos

40 Se evaluaron las propiedades neutralizantes de radicales hidroxilo de los polímeros que contienen grupos tiol inventivos con la prueba de la desoxirribosa (Halliwell et al., Food Chem. Toxicol. 33 (1995): 601-617). En este sistema de prueba, los radicales hidroxilo se generan por iones de hierro que atacan la desoxirribosa. Los productos de degradación resultantes reaccionan con ácido tiobarbitúrico a un agente colorante rosa cuya absorción se mide. Con este método, se prueban las propiedades tanto neutralizantes de radicales como también de formación de complejos de los polímeros que tienen grupos tiol inventivos.

45 También se evaluaron las propiedades neutralizantes de radicales y de formación de complejos de los polímeros que tienen grupos tiol inventivos con la prueba de la desoxirribosa con dependencia de su concentración y su grado de modificación. Es importante que los polímeros que tienen grupos tiol inventivos aún desplieguen su actividad antioxidante incluso a bajas concentraciones porque de esta manera –en combinación con el tiempo de permanencia extendido de estos polímeros que contienen grupos tiol– se puede alcanzar un efecto de larga duración. Además, en preparaciones para aplicaciones oculares, intraarticulares, intradérmicas o subcutáneas, se pueden usar compuestos poliméricos de alto peso molecular solo a concentraciones iniciales relativamente bajas, ya que de otra manera, debido a su alta viscosidad, no se asegura más una tolerancia óptima.

50 Para esta prueba, se prepararon soluciones poliméricas recientes disolviendo el polímero en tampón fosfato, pH 7,4, de modo que la concentración final del polímero en la solución de muestra entera fuera del 0,1% (m/v). Si fue necesario, el pH de la solución de muestra se ajustó a 7,4 mediante la adición de NaOH.

60 El tampón fosfato, pH 7,4 sin polímeros sirvió como control. A 0,6 ml de la solución de muestra, al principio se añadieron 0,1 ml de una solución de 2-desoxi-D-ribosa 10 mM.

Inmediatamente después de la adición de 0,1 ml de una solución de  $\text{FeSO}_4$  10 mM recién preparada, las muestras se incubaron durante 120 minutos a 37°C. La reacción se paró mediante la adición de 0,5 ml de ácido trifluoroacético al 2,5% (v/v). Después de la adición de ácido tiobarbitúrico al 1% (m/v), las muestras se incubaron durante 20 minutos a 95°C para el desarrollo del color. Después las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 5 minutos. Se transfirió una alícuota de la solución de muestra a cubetas microfotométricas, y se midió la absorción a 532 nm.

Las propiedades antioxidantes del polímero inventivo se calcularon en forma de la inhibición de la oxidación de desoxirribosa:

- 5 Inhibición de la oxidación en % =  $(1 - (A_s/A_c)) * 100$ ,  
en donde  $A_s$  es la absorción de la muestra y  $A_c$  es la absorción del control.

Los resultados se ilustran en las figuras 2 y 3. En el eje y, se ilustra en cada caso la inhibición del efecto de oxidación (en %) de los radicales hidroxilo por los polímeros. Los valores ilustrados son los valores medios de al menos 3 repeticiones de la prueba  $\pm$  desviación estándar. En la figura 2 se muestra que mediante la unión covalente de compuestos tiol, el efecto antioxidante del ácido hialurónico se pudo aumentar significativamente. La dependencia del efecto antioxidante de los polímeros según la invención en el grado de modificación con compuestos tiol se ilustra en la figura 3 a modo de ejemplo de ácido hialurónico tiolado. El ácido hialurónico tiolado que tiene un grado de modificación de 200  $\mu$ M de grupos tiol/g de polímero tiene, por tanto, un efecto antioxidante mayor que el ácido hialurónico tiolado que tiene un grado de modificación de 70  $\mu$ M de grupos tiol/g de polímero.

Ejemplo 2: Inhibición de la peroxidación de lípidos en la piel por polímeros que contienen grupos tiol

20 Con una prueba *in vitro*, se evaluó el potencial de los polímeros que contienen grupos tiol para inhibir la oxidación de lípidos de la dermis. La peroxidación de los lípidos intracelulares causada, por ejemplo, por radiación UV produce daños de la piel/dermis humana.

Con este método, se prueban las propiedades tanto neutralizantes de radicales como de formación de complejos de los polímeros que contienen grupos tiol (Halliwell et al., Food Chem. Toxicol. 33 (1995): 601-617). En este sistema de prueba *in vitro*, la peroxidación de lípidos se acelera por la adición de iones de hierro y calentamiento. Los fragmentos lipídicos oxidados (TBARS; sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico) reaccionan con ácido tiobarbitúrico a un agente colorante rosa cuya absorción se mide.

Las soluciones poliméricas se preparan recientes en tampón fosfato isotónico de modo que la concentración final del polímero en la solución de muestra entera fuera del 0,05% (m/v). El pH de las soluciones de muestra se ajustó a 7,4 mediante la adición de NaOH. El tampón fosfato isotónico, pH 7,4 sirvió como control. A estas muestras se añadieron 100 mg de dermis porcina. Después de la adición de 0,3 ml de una solución de  $FeSO_4$  20 mM recién preparada, las muestras se incubaron a 95°C durante 60 minutos. La reacción se paró mediante a la adición de 0,3 ml de ácido trifluoroacético al 20% (v/v). Después de la adición de 0,3 ml de ácido tiobarbitúrico al 1% (m/v), las muestras se incubaron durante 20 minutos adicionales a 95°C y, después de enfriar a temperatura ambiente, se centrifugaron. Se transfirió una alícuota a cubetas microfotométricas, y se midió la absorción a 532 nm.

La inhibición de la peroxidación de lípidos se calculó según la siguiente ecuación:

- 40 Inhibición de la oxidación en % =  $(1 - (A_s/A_c)) * 100$ ,  
en donde  $A_s$  es la absorción de la muestra y  $A_c$  es la absorción del control.

Los resultados se ilustran en la figura 5. En el eje y, se representa la inhibición de la oxidación de los polímeros respectivos en %. Los valores mostrados son los valores medios de 3 repeticiones de la prueba + la desviación estándar. A partir de estos estudios es claramente aparente que debido a sus propiedades neutralizantes de radicales, de formación de complejos y, por tanto, antioxidantes, los polímeros que contienen grupos tiol son capaces de reducir significativamente la oxidación de lípidos causada por procesos inflamatorios.

Ejemplo 3: Aplicación intradérmica de los polímeros que contienen grupos tiol según la presente invención

Se produjo la siguiente preparación para aplicación intradérmica: se disolvieron 2 g de ácido hialurónico que contenía grupos tiol en tampón fosfato isotónico estéril, se agitó para formar un polímero parcialmente entrecruzado, se rellenaron jeringuillas y se esterilizaron. Se inyectaron por vía intradérmica 0,1 ml de esta formulación en la región del lomo de conejos. La aplicación produjo una irritación local mínima que desapareció después de un día. El depósito formado por el ácido hialurónico que contiene grupos tiol fue detectable al tacto durante todo el periodo de examen de dos semanas.

Ejemplo 4: Producción de una preparación para el uso subcutáneo e intradérmico para el aumento dérmico

60 Se fabricó una preparación para el uso subcutáneo e intradérmico como sigue: Se disolvió 1 g de ácido hialurónico que contiene grupos tiol estéril en condiciones asépticas y en ausencia de oxígeno en 100 ml de un tampón fosfato estéril pH 7,4. La osmolalidad de esta preparación se ajustó mediante la adición de NaCl para dar una osmolalidad de la solución entre 200 y 400 mosmol/kg. Se llenaron botellas con la solución y se empaquetó impermeable a gas.

Ejemplo 5: Formulación para el aumento de tejido de cicatriz

5 Se produjo una preparación como sigue: se disolvieron 3 g de ácido hialurónico que contenía grupos tiol estéril en condiciones asépticas en 100 ml de tampón fosfato estéril pH 7,4 y se entrecruzó parcialmente. Después de ellos, la osmolalidad para la adición sugerida de NaCl para dar una osmolalidad de la solución de entre 200 y 400 mosmol/kg. Se llenaron botellas con la solución y se cerró impermeable a gas.

Ejemplo 6: Formulación para aumentar los músculos de los esfínteres anal y uretral

10 Se han usado los polímeros que contienen grupos tiol para aumentar el esfínter anal interno para prevenir la incontinencia anal apoyando la amortiguación natural en el canal anal. La misma formulación también se usó para aumentar los músculos del esfínter uretral (véase también el documento US 5.785.642). La incontinencia es un problema que se produce con frecuencia, en particular para mujeres, cuyo suelo pélvico se debilita significativamente después de la gestación. Si los músculos del suelo pélvico no se pueden forzar por métodos  
15 convencionales, la inyección de materiales para aumentar la uretra es una buena alternativa.

Se produjo una formulación para el aumento del esfínter, como sigue: se disolvieron 5 g de quitosano que contiene grupos tiol estéril en condiciones asépticas en 100 ml de tampón borato estéril pH 6,5 y se entrecruzó parcialmente, la osmolalidad se ajustó mediante la adición de NaCl a 200 a 400 mosmol/kg. Se llenaron jeringuillas con la solución.  
20

Ejemplo 7: Degradación enzimática de una formulación de ácido hialurónico que contiene grupos tiol de una única fase y una formulación que comprende partículas de ácido hialurónico entrecruzado

En este ejemplo se muestran ventajas adicionales de los polímeros que contienen grupos tiol, en particular del ácido hialurónico que contiene grupos tiol. El ácido hialurónico que contiene grupos tiol y formulaciones comercialmente disponibles se han digerido con hialuronidasa. En ambos casos el ácido hialurónico se degradó, según lo cual la degradación era comparable con un ácido hialurónico sin modificar en el caso del ácido hialurónico que contiene grupos tiol y los fragmentos formados muestran un peso molecular mucho mayor que las partículas que comprenden ácido hialurónico entrecruzado. Esto resulta del hecho de que los puentes disulfuro no se degradan por una enzima,  
25 y en segundo lugar el grado de entrecruzamiento es mucho mayor que en partículas de ácido hialurónico entrecruzado. Por tanto, los ácidos hialurónicos que contienen grupos tiol entrecruzados según la presente invención están más tiempo en el lado de la aplicación que las partículas de ácido hialurónico entrecruzado.  
30



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un polímero que contiene grupos tiol para preparar un implante para el aumento de tejido, en donde el polímero base es un polisacárido.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado en que el polímero que contiene grupos tiol tiene una masa molecular de al menos 10.000 g/mol, preferiblemente al menos 25.000 g/mol, en particular al menos 50.000 g/mol.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado en que los grupos tiol del polímero forman enlaces disulfuro inter- y/o intramoleculares.
- 20 4. Uso según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 3, caracterizado en que la parte de grupo tiol del polímero es más de 20  $\mu$ moles/g de polímero, preferiblemente más de 50  $\mu$ moles/g de polímero, en particular más de 100  $\mu$ moles/g de polímero.
- 25 5. El uso según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 4, caracterizado en que el polímero que contiene grupos tiol se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico que contiene grupos tiol, quitosano que contiene grupos tiol y combinaciones de estos polímeros.
- 30 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado en que el grupo tiol del polímero inventivo preferiblemente deriva de cisteína, cisteamina o N-acetil-cisteína.
- 35 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado en que el implante se suministra como un gel o preparación acuosa, preferiblemente de fase única.
- 40 8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado en que el implante además comprende quitosano y/o ácido hialurónico.
- 45 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado en que el implante además comprende adicionalmente al menos una sustancia activa, preferiblemente del grupo de agentes antiflogísticos, agentes antirreumáticos, analgésicos, agentes antiinfecciosos, agentes antivíricos, antibióticos, antimicóticos, agentes antisépticos, agentes quimioterapéuticos, espasmolíticos, vitaminas, agentes citostáticos, anestésicos locales, agentes antialérgicos, antihistaminas, agentes antiinflamatorios, agentes antiartríticos, agentes para el tratamiento de hemorroides, agentes terapéuticos para el tratamiento de la piel, agentes ginecológicos, agentes oftálmicos, agentes urológicos, agentes rinológicos y otológicos, y/o al menos un excipiente farmacéutico, preferiblemente del grupo de sales tampones, agentes conservantes, excipientes para ajustar la osmolalidad deseada, excipientes para ajustar la viscosidad deseada, estabilizantes, emolientes, materiales de recubrimiento, agentes de flujo, aglutinantes, lubricantes, rellenos, desecantes, agentes disgregantes, solventes, solubilizantes y excipientes para aumentar la compatibilidad de la formulación.
- 50 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado en que el implante comprende el polímero que contiene grupos tiol a una concentración desde el 0,001 hasta el 100% en peso, preferiblemente desde el 0,01 hasta el 90% en peso, incluso más preferido desde el 0,05 hasta el 80% en peso.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado en que el tejido que se va a aumentar se selecciona del grupo que consiste en tejido dérmico, tejido muscular y tejido conjuntivo.
12. Implante que comprende al menos un polímero que contiene grupos tiol como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 9.

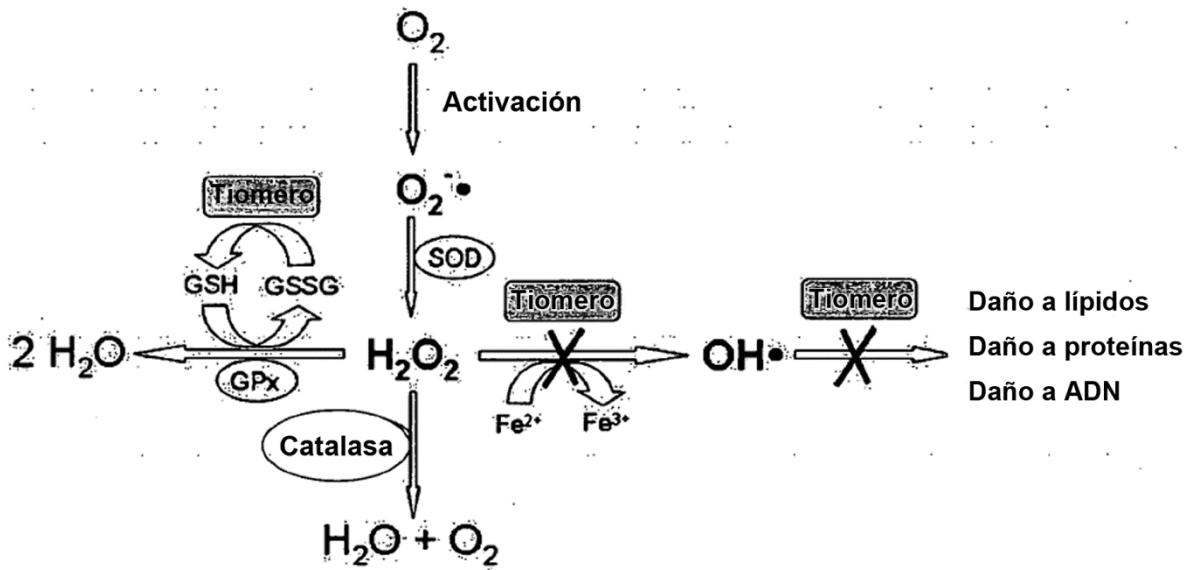


Fig. 1

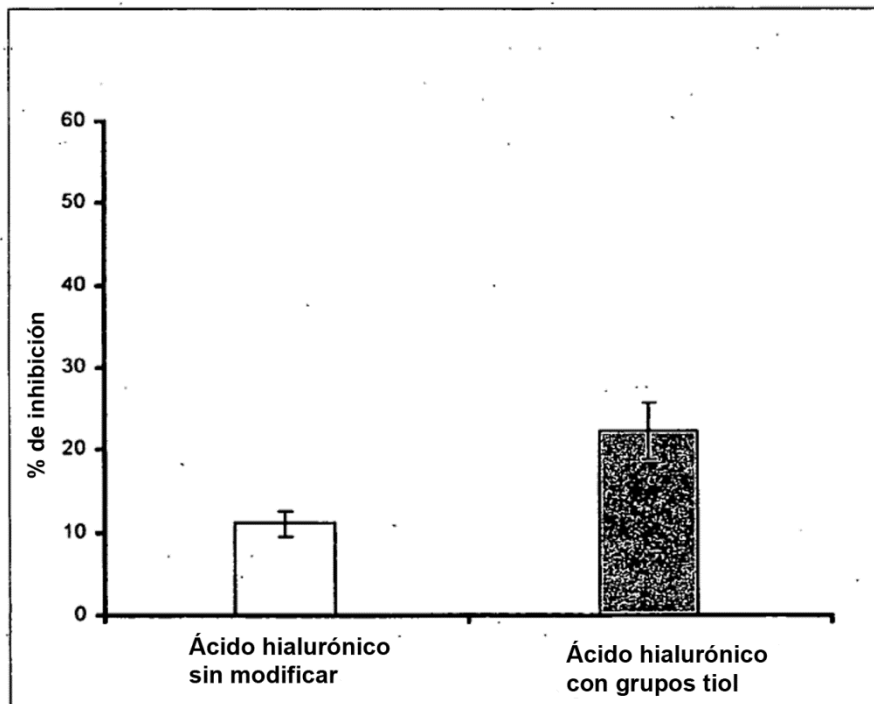


Fig. 2

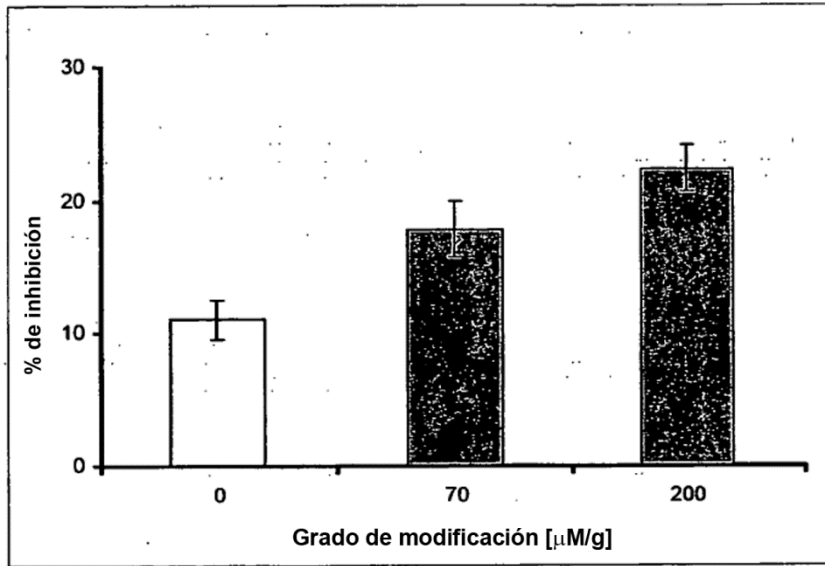


Fig. 3

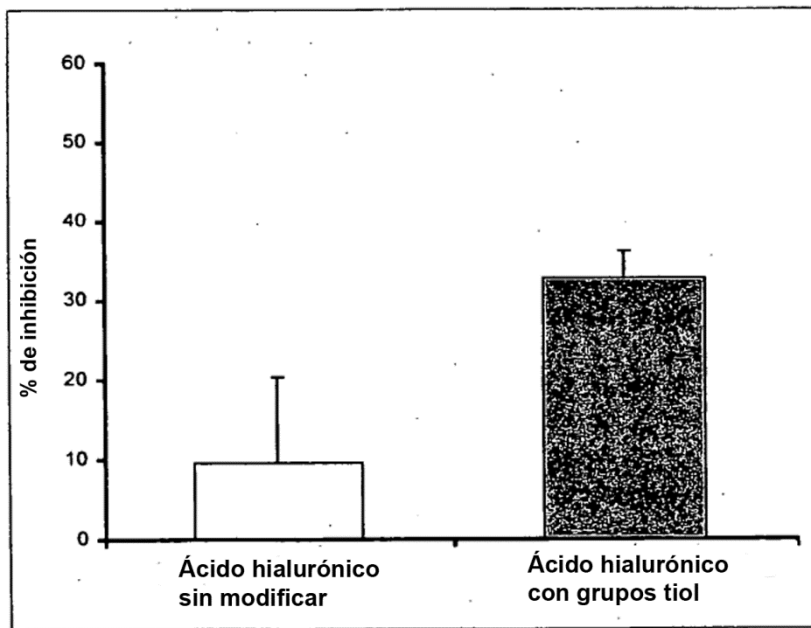


Fig. 4