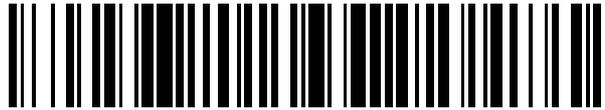


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 955**

51 Int. Cl.:

A61L 2/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2011 E 11702563 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2400993**

54 Título: **Soluciones estériles de ácido hialurónico**

30 Prioridad:

09.02.2010 US 702540

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

23.03.2015

73 Titular/es:

**BAUSCH & LOMB INCORPORATED (100.0%)
1400 North Goodman Street, Area 62
Rochester, NY 14609, US**

72 Inventor/es:

**LIU, XIAOJUN MICHAEL;
HEILER, DAVID JOSEPH;
MENZEL, THOMAS;
BRONGO, ABBIE;
BURKE, SUSAN E. y
CUMMINS, KARL**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 531 955 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

Soluciones estériles de ácido hialurónico

5 **Campo de la invención**

La invención se dirige a soluciones acuosas esterilizadas a través de filtro que contienen ácido hialurónico y a un procedimiento de preparación de volúmenes comerciales de soluciones estériles que contienen ácido hialurónico.

10 **Antecedentes de la invención**

Desafortunadamente, muchos biopolímeros son sensibles a los procedimientos comunes de esterilización, *v.g.*, esterilización por calor. La esterilización por calor puede dar lugar con frecuencia a cambios pronunciados en las propiedades fisicoquímicas del biopolímero, de tal forma que el biopolímero estéril resultante se vuelve inadecuado para su uso pretendido.

Los métodos de esterilización actualmente aplicados a materiales médicos incluyen, por ejemplo, el tratamiento con calor, la esterilización por vapor a alta presión (*v.g.* esterilización en autoclave), la esterilización con óxido de etileno gaseoso (OEG), la esterilización con dióxido de carbono supercrítico y la esterilización por radiación. Véanse, por ejemplo, la Patente Estadounidense N° 6.891.035, la Patente Estadounidense N° 6.149.864, la Patente Estadounidense N° 5.621.093, la Patente Estadounidense N° 4.263.253, US 2006/0292030 y US 2007/0009578. Los métodos de esterilización disponibles son típicamente valorados en relación a la solidez del biopolímero particular que se ha de esterilizar. Por ejemplo, se puede usar la esterilización por vapor a alta presión para un biopolímero sólo en la medida en que el biopolímero pueda soportar altas temperaturas y altas presiones. Sin embargo, muy pocos biopolímeros que incluyen ácido hialurónico pueden soportar dichas altas temperaturas y altas presiones. La esterilización con OEG podría ser útil, ya que el procedimiento suprime la descomposición térmica del biopolímero. Sin embargo, la presencia de óxido de etileno residual en la composición puede ser problemática.

El ácido hialurónico es una sustancia no inmunogénica y, debido a sus propiedades viscoelásticas e hidrofílicas, el ácido hialurónico ha sido utilizado durante muchos años como reemplazo del humor vítreo del ojo o del líquido articular o como medio de soporte en cirugía oftálmica, como se divulga, por ejemplo, en la Patente Estadounidense N° 4.141.973 de Balazs. En los líquidos articulares, la solución de ácido hialurónico sirve como lubricante para aportar un ambiente protector a las células, y, por esta razón, se usa en el tratamiento de las articulaciones inflamadas de la rodilla. EP-A-0.698.388 de Chemedica S. A. desvela una preparación oftálmica para uso como lágrimas artificiales que contiene hialuronato como espesante de la viscosidad. El uso de consumo de productos que incluyen ácido hialurónico requiere que el fabricante esterilice el producto de consumo, y, si se usa como una formulación multidosis abierta, se ha de adoptar una etapa adicional para conservar el producto de la formulación.

El ácido hialurónico es un biopolímero que se sabe es muy sensible a los procedimientos de esterilización térmica. Se sabe que la esterilización por calor del ácido hialurónico acelera la hidrólisis o la oxidación del ácido hialurónico, causando así una reducción significativa y con frecuencia perjudicial del peso molecular medio del biopolímero. Para muchas aplicaciones farmacéuticas, no es deseable una forma de peso molecular relativamente bajo del ácido hialurónico en la formulación. Típicamente, las formas de bajo peso molecular del ácido hialurónico no proporcionan las propiedades reológicas deseadas de la forma de alto peso molecular del ácido hialurónico. Para compensar la descomposición del ácido hialurónico en los métodos de esterilización por calor antes mencionados, se podría posiblemente partir de un ácido hialurónico con un peso molecular superior al deseado. Esta acomodación, sin embargo, da lugar a ineficacias del proceso, ya que el rendimiento en producto del ácido hialurónico disminuye al aumentar el peso molecular medio del biopolímero.

Otro método conocido de esterilización del ácido hialurónico es mediante filtración. Se usan procedimientos de filtración comunes en los procedimientos industriales para preparar sales de ácido hialurónico purificadas en forma concentrada, normalmente en forma de polvo seco, mediante los cuales se pasa una solución acuosa a través del filtro y se seca posteriormente. Dicho procedimiento de filtración está descrito en la solicitud de patente europea EP 867.453 y en WO 00/44925. La Publicación Estadounidense N° 2006/0052336 describe un método de esterilización por filtración de un ácido hialurónico de alto peso molecular a una concentración relativamente baja de ácido hialurónico para reducir la viscosidad de la solución. Después de la etapa de filtración, se concentra el ácido hialurónico en la solución aplicando vacío y eliminando el agua para obtener una forma más concentrada deseada del ácido hialurónico.

La Patente Estadounidense N° 5.093.487 describe un método de preparación de una solución acuosa que contiene una forma de alto peso molecular de ácido hialurónico (preferiblemente mayor de 1,2 MDa) que puede ser filtrada más fácilmente reduciendo la viscosidad de la solución. Se dice que esta reducción de la viscosidad de la solución es posible mediante un "tratamiento térmico controlado" o mediante "filtración de una solución de concentración mínima con alta presión o vacío a través de membranas de poro pequeño". Estos procedimientos reductores de la viscosidad también dan lugar a una forma de ácido hialurónico que mantiene su menor viscosidad a lo largo del tiempo, es decir, se dice que la reducción inducida de viscosidad es irreversible. En particular, se describe el

tratamiento térmico de una solución al 1% en peso de ácido hialurónico que tiene un peso molecular medio ponderal inicial de 1,1 MDa a diferentes temperaturas de calentamiento (30°C, 40°C y 50°C) a lo largo de un período de tratamiento de un mes. Para cada solución de ácido hialurónico, no se refiere ninguna reducción del peso molecular medio ponderal. La patente '487 también indica que las soluciones de ácido hialurónico tratadas con calor pueden ser filtradas a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 micras necesario para la esterilización.

WO 2004/014399 A1 desvela un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica acuosa lista para su uso estéril que contiene una sal de ácido hialurónico de alto peso molecular a una concentración especificada, que comprende las siguientes etapas: proporcionar una formulación acuosa que contiene ácido hialurónico de alto peso molecular a una concentración menor que la concentración final especificada; pasar la formulación acuosa a través de un filtro que tiene un tamaño de poro inferior a 0,45 µm; concentrar la formulación acuosa aplicando vacío y evaporando el agua hasta alcanzar la concentración especificada.

Blumberg *et al.*, en *Changes in Physical Characteristics of Hyaluronate*, pp. 1454-61, amplían la información sobre los cambios en las características físicas de las soluciones de ácido hialurónico en función de la concentración de cloruro de sodio. Con respecto a la viscosidad, un aumento en la fuerza iónica de la solución da como resultado una disminución de la viscosidad. Se observa la disminución de la viscosidad al añadir cantidades relativamente pequeñas de sal. "Después de aproximadamente 0,5 M [NaCl], la caída [de viscosidad] es gradual, y, después de 1,3 M, se produce muy poco cambio con la adición de cantidades incluso grandes de sal". Íd. en 1456. En otras palabras, la viscosidad es muy sensible a los cambios en la concentración de iones sodio, justo por debajo de la de la solución salina fisiológica, y más allá de una "fuerza de iones sodio de aproximadamente 0,15, el hialuronato es relativamente insensible". Íd. en 1459.

En base a lo anterior, se puede ver que la esterilización de soluciones acuosas de biopolímeros, y en particular de soluciones acuosas de ácido hialurónico, no es en absoluto rutinaria, y existen numerosos desafíos técnicos para llegar a una solución estéril substancialmente no degradada. Estos desafíos técnicos se magnifican si el objetivo es un lote de producción a escala comercial.

Resumen de la invención

La invención se dirige a un procedimiento para esterilizar una solución que contiene ácido hialurónico. El procedimiento consiste en proporcionar una solución acuosa de ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 3,6 MDa, y la concentración del ácido hialurónico es del 0,04% al 0,8% en peso. La solución acuosa tiene también una fuerza iónica equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 3% al 30% en peso. Una vez preparada la solución acuosa de alto contenido en sal de ácido hialurónico, se mantiene la solución a una temperatura de 40°C a 80°C durante al menos 1 hora y no más de seis días. Después de la etapa de tratamiento térmico, se filtra la solución acuosa a través de un medio de esterilización por filtración, donde el medio de filtración tiene un tamaño medio de poro de 0,25 µm o menos, para obtener una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada.

En una realización, el procedimiento consiste en proporcionar una solución acuosa de ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderal de 0,8 MDa a 2,2 MDa, y la concentración del ácido hialurónico es del 0,1% al 0,5% en peso. La solución acuosa tiene también una fuerza iónica equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 4% al 18% en peso. Una vez preparada la solución acuosa de alto contenido salino de ácido hialurónico, se mantiene la solución a una temperatura de 50°C a 75°C durante al menos 1 hora y no más de 18 horas. Después de la etapa de tratamiento térmico, se filtra la solución acuosa a través de un medio de esterilización por filtración como se describe.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una representación mediante gráfico de barras que muestra el número calculado de cartuchos de filtro de 10 pulgadas que serían necesarios para procesar aproximadamente 740 kg de solución acuosa de ácido hialurónico para las diversas condiciones de proceso citadas.

La Fig. 2 es una representación esquemática de un ácido hialurónico enrollado aleatoriamente en solución acuosa.

Descripción detallada de la invención

Una composición "estéril" es una que está libre de microbios viables, según se determina usando la prueba de esterilidad USP. Véase "The United States Pharmacopeia", 30ª Revisión, The United States Pharmacopeial Convention: 2008.

El término "ácido hialurónico" se refiere a un polímero que comprende subunidades repetitivas de disacárido de hialuronano. El término también incluye un polímero en el que las subunidades de disacárido pueden ser derivatizadas en una o más posiciones del ácido D-glucurónico y/o la subunidad repetitiva de D-N-acetilglucosamina.

Por consiguiente, el término ácido hialurónico abarca ácido hialurónico, formas derivatizadas de ácido hialurónico y formas salinas (a las que también se hace referencia como hialuronato, *v.g.*, hialuronato de sodio).

5 El ácido hialurónico es un polisacárido lineal (polímero biológico de cadena larga) formado por unidades repetitivas de disacárido consistentes en ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidas por uniones glicosídicas $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$. El ácido hialurónico se distingue de los otros glicosaminoglicanos, ya que está libre de uniones covalentes con proteína y grupos sulfónicos. El ácido hialurónico es ubicuo en animales, encontrándose la mayor concentración en el tejido conectivo blando. Tiene un importante papel con fines tanto mecánicos como de transporte en el organismo; *v.g.*, da elasticidad a las articulaciones y rigidez a los discos vertebrales, y es también un componente importante del cuerpo vítreo del ojo.

10 El ácido hialurónico es bien aceptado por la comunidad oftálmica como un compuesto que puede proteger a los tejidos o células biológicas frente a fuerzas de compresión. Por consiguiente, se ha propuesto al ácido hialurónico como componente de una composición oftálmica viscoelástica para la cirugía de cataratas. Las propiedades viscoelásticas del ácido hialurónico, es decir, elástico duro en condiciones estáticas, aunque menos viscoso bajo pequeñas fuerzas de cizallamiento, permite al ácido hialurónico funcionar básicamente como amortiguador para células y tejidos. El ácido hialurónico tiene también una capacidad relativamente grande para absorber y mantener el agua. Las propiedades indicadas del ácido hialurónico son dependientes del peso molecular, de la concentración de la solución y del pH fisiológico. A bajas concentraciones, las cadenas individuales se enredan y forman una red continua en solución, lo que da al sistema propiedades interesantes, tales como una pronunciada viscoelasticidad y una pseudoplasticidad que es única para un polímero hidrosoluble a baja concentración.

15 Se sabe que las soluciones de ácido hialurónico son sensibles al calor y a la hidrólisis ácida, y, por lo tanto, el peso molecular medio ponderal típicamente disminuirá con el tiempo si se someten las soluciones a condiciones que faciliten la hidrólisis de la unión polisacárida. En el caso de las soluciones acuosas de ácido hialurónico, un calentamiento prolongado por encima de 80°C, *v.g.*, las condiciones usadas para esterilizar por calor, no es adecuado - se observa una reducción substancial en el peso molecular medio ponderal del ácido hialurónico. Además, el uso de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 micras para esterilizar soluciones acuosas de ácido hialurónico con un ácido hialurónico de peso molecular medio ponderal relativamente alto no es adecuado - las fracciones de menor peso molecular pasan fácilmente a través del filtro, mientras que las fracciones grandes (PM medio de aproximadamente 0,6 MDa o superior) que tienen un diámetro molecular medio mayor de 0,2 μm no lo hacen. Los solicitantes, sin embargo, han descubierto condiciones selectas de procesado que facilitan la esterilización por filtro de soluciones acuosas de ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 3,6 MDa.

20 Las condiciones de procesado descritas mejoran la eficacia de filtración de soluciones acuosas de ácido hialurónico. En particular, las condiciones de procesado descritas hacen posible la esterilización de lotes de producción relativamente a gran escala de soluciones acuosas de ácido hialurónico. Los solicitantes demuestran que se puede esterilizar por filtración una solución acuosa que contiene ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 3,6 MDa y una concentración de ácido hialurónico del 0,04% al 0,8% en peso a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 micras, y, por lo tanto, esterilizarla en lotes de producción comercial a gran escala. El procedimiento descrito depende esencialmente de un tratamiento térmico especificado de la solución y de que la solución tenga una fuerza iónica relativamente alta.

25 Una condición de procesado conlleva un tratamiento con calor. En este caso, se mantiene la solución acuosa de ácido hialurónico a una temperatura de 40°C a 80°C durante al menos 1 hora y no más de seis días. Se ha de tener cuidado, sin embargo, de no mantener la temperatura de la solución en el extremo alto de este rango de temperatura durante un período mayor de 24 horas; de lo contrario, se comienza a observar una significativa disminución en el peso molecular medio ponderal del ácido hialurónico. El mantener la temperatura a, o por encima de, 80°C durante un período prolongado de tiempo puede dar lugar a degradación hidrolítica u oxidativa de la unión polisacárida. Dada la correlación entre la duración del tratamiento térmico y la temperatura de mantenimiento con respecto a la minimización de una disminución observada en el peso molecular medio ponderal del ácido hialurónico, se enumeran tratamientos térmicos recomendados en la Tabla 1 para ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 0,6 MDa a 1,6 MDa. De igual modo, se enumeran tratamientos térmicos recomendados en la Tabla 2 para ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 1,6 MDa a 3,6 MDa.

Tabla 1. Tratamientos térmicos para ácido hialurónico de 0,6 a 1,6 MDa

Tiempo (h)	Temp. °C
1-4	75
2-6	70
2-8	65
3-12	60
4-24	55
7-48	50
12-96	45

Tabla 2. Tratamientos térmicos para ácido hialurónico de 1,6 a 3,6 MDa

Tiempo (h)	Temp. °C
2-6	75
3-8	70
3-10	65
6-16	60
6-24	55
10-48	50
14-140	45

5

10

Una segunda condición de procesado incumbe a la fuerza iónica de la solución acuosa de ácido hialurónico. Los valores de la fuerza iónica son indicados y descritos como un equivalente a una concentración acuosa indicada de cloruro de sodio. Los solicitantes hacen a veces referencia al aumento en la fuerza iónica de las soluciones acuosas de ácido hialurónico como una "envoltura retráctil de sal" del polímero. La "envoltura retráctil de sal" del ácido hialurónico es mejor descrita mediante la representación esquemática de un ácido hialurónico enrollado aleatoriamente en solución acuosa mostrada en la Fig. 2.

15

En consecuencia, se combina una cantidad suficiente de uno o más compuestos salinos con el ácido hialurónico para obtener una solución acuosa de ácido hialurónico de alto contenido en sal que tiene una fuerza iónica equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 3% en peso al 30% en peso, del 4% en peso al 18% en peso o del 8% en peso al 14% en peso.

20

De forma ideal, la una o más sales usadas para aumentar la fuerza iónica de la solución acuosa de ácido hialurónico es una sal que tiene que estar presente en una formulación de producto deseada. Por ejemplo, si es necesario tamponar la formulación, una de las sales puede ser el componente salino del tampón. En el caso de una formulación tamponada con boratos, la sal puede ser una sal de borato alcalino, *v.g.*, borato de sodio. De igual modo, en el caso de una formulación tamponada con citratos o con fosfatos, la sal puede ser una sal de citrato alcalino, *v.g.*, citrato de sodio, o una sal de fosfato alcalino, *v.g.*, fosfato disódico, respectivamente. Alguien con conocimientos ordinarios en la técnica entendería que se puede usar cualquier componente de tampón salino para aumentar la fuerza iónica de la solución acuosa de ácido hialurónico.

25

30

En el caso de la preparación de preparaciones oftálmicas, se usan típicamente cloruros de metales alcalinos, tales como NaCl o KCl, para controlar la osmolalidad de la preparación. En consecuencia, se puede usar NaCl, KCl o alguna combinación de las dos sales para aumentar la fuerza iónica de la solución acuosa de ácido hialurónico. De manera alternativa, se pueden usar otras sales comunes, incluyendo sales de metales del Grupo II, *v.g.* cloruro de magnesio o de calcio.

35

En una realización, una solución de alto contenido salino de ácido hialurónico tendrá una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 25 g a 60 g de cloruro de sodio por cada gramo de ácido hialurónico en una solución de un litro. Por ejemplo, una solución al 0,1% en peso de ácido hialurónico incluirá una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 25 g a 60 g de cloruro de sodio. De igual modo, una solución al 0,2% en peso de ácido hialurónico incluirá una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 50 g a 120 g de cloruro de sodio. Una solución al 0,3% en peso de ácido hialurónico incluirá una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 75 g a 180 g de cloruro de sodio.

40

Adición eventual de un ácido

45

También se observa que el pH de la solución tiene un impacto sobre la eficacia del paso de una solución acuosa de ácido hialurónico a través de un medio de esterilización por filtración con un tamaño de poro de 0,22 micras. El pH de la solución puede también tener un impacto sobre la velocidad de hidrólisis del ácido hialurónico a las temperaturas usadas en la etapa de tratamiento térmico. Una reducción del pH a un valor de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 6,2, preferiblemente a un valor de pH de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,2, puede también facilitar el proceso de esterilización por filtración de una solución de ácido hialurónico. Típicamente, se añadiría un ácido tamponante asociado a la sal del tampón que está presente en el producto de la formulación final.

50

Por ejemplo, si es necesario tamponar la formulación, se utilizaría el correspondiente ácido libre. En el caso de una formulación tamponada con boratos, probablemente se añadiría ácido bórico. De igual modo, en el caso de una formulación tamponada con citratos, probablemente se añadiría ácido cítrico.

5 Existe, sin embargo, una compensación si hubiese que preparar una solución acuosa de ácido hialurónico con un valor de pH menor de aproximadamente 6,4 que luego hay que esterilizar por filtración usando el procedimiento descrito. Como se ha indicado, las soluciones acuosas de ácido hialurónico son sensibles a la hidrólisis, es decir, a la escisión hidrolítica de una unión polisacárida, lo que conduce a una disminución no deseada en el peso molecular medio ponderal del ácido hialurónico. Los solicitantes creen que la reacción de hidrólisis está catalizada por la presencia de ácido, y, por lo tanto, un menor valor de pH se corresponderá frecuentemente con un aumento en la velocidad de hidrólisis. Por lo tanto, un experto en la técnica se enfrenta a dos factores opuestos y debe decidir sobre las condiciones de procesado que optimizan un procedimiento de esterilización por filtración para un grado selecto de ácido hialurónico. Un menor valor de pH de la solución da lugar a una disminución en la viscosidad de la solución y, por lo tanto, a una mayor velocidad de flujo a través del filtro de esterilización. Al mismo tiempo, un menor valor de pH puede dar lugar a un aumento en la velocidad de hidrólisis y a un ácido hialurónico con un menor peso molecular medio ponderal.

De forma similar, la velocidad de hidrólisis del ácido hialurónico también se acelera en condiciones de relativamente alta alcalinidad, v.g., un valor de pH de al menos 7,8 o superior. En consecuencia, las sales preferidas que se añaden para preparar la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino son sales neutras, v.g., un cloruro de metal del Grupo I o del Grupo II. El rango preferido de pH para la esterilización por filtración del ácido hialurónico descrita es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,2.

Los solicitantes investigaron dos tipos de medios de esterilización por filtración que tienen un tamaño de poro de 0,22 micras para filtrar las soluciones de ácido hialurónico: un medio de poliéter sulfona (PES) bicapa y un medio de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofóbico. Ambos medios de filtración funcionaban bastante bien a escala de laboratorio; sin embargo, en un ambiente de procesamiento comercial los cartuchos de PVDF de mayor tamaño proporcionaban velocidades de flujo más consistentes de un lote a otro.

La FIG. 1 es un gráfico de barras que muestra el número calculado de cartuchos de filtro de 10 pulgadas que serían necesarios para procesar aproximadamente 740 kg de solución acuosa de ácido hialurónico para diversas condiciones de procesado. Los estudios reales fueron realizados con aproximadamente 2 l de solución de ácido hialurónico usando un disco de filtro de 47 mm. Las variables en estos estudios incluían: la concentración del ácido hialurónico, la fuerza iónica de la solución indicada por la concentración de cloruro de sodio en la solución, los medios de filtro usados (PES o PVDF) y la ausencia o presencia de ácido bórico en la solución. Los solicitantes trataron de mantener el peso molecular medio ponderal del ácido hialurónico lo más consistente posible a través de las operaciones del estudio; sin embargo, hubo una ligera variación en el peso molecular medio ponderal del ácido hialurónico en los lotes del estudio. Los pesos moleculares y las distribuciones de pesos moleculares del hialuronato de sodio son determinados por cromatografía de exclusión por tamaños acuosa con triple detección en línea. Véase, Liu, X.M. *et al.*, Detailed Characterization of Cationic Hydroxyethylcellulose Derivatives using Aqueous Size-Exclusion Chromatography with on-line Triple Detection. J. Chromatogr. A. 1104, 2006. 145-153.

Como entendería un experto en la técnica, el procedimiento de esterilización por filtración descrito está limitado por la viscosidad de la solución acuosa de ácido hialurónico de alto contenido salino. En consecuencia, la concentración del ácido hialurónico en la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino es inferior al 0,8% en peso, ya que cualquier otro aumento en la concentración del ácido hialurónico haría que la solución fuera demasiado viscosa como para filtrar incluso una solución de alto contenido salino tratada con calor. De nuevo, el calentamiento de las soluciones más allá de 80°C durante un tiempo suficiente como para esterilizar a través de filtro concentraciones más elevadas de ácido hialurónico conduciría probablemente a una hidrólisis térmica significativa de las uniones de polisacárido, lo que daría como resultado una disminución significativa en el peso molecular medio ponderal, y probablemente a una pérdida de las propiedades viscoelásticas beneficiosas originalmente buscadas para la formulación de producto deseada.

En muchas realizaciones, la concentración del ácido hialurónico en la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino es del 0,04% en peso al 0,8% en peso o del 0,1% en peso al 0,4% en peso, v.g., de aproximadamente el 0,2% en peso, de aproximadamente el 0,3% en peso, de aproximadamente el 0,4% en peso o de aproximadamente el 0,5% en peso.

Ejemplo 1, FIG. 1. Se preparó un ácido hialurónico (HA) al 0,5% en peso añadiendo lentamente una mezcla mezclada en seco de 10,0 g de HA y 250 g de NaCl (12,5% en peso) a 1.740,0 g de agua purificada mantenida a aproximadamente 70°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA tenía un peso molecular medio ponderal declarado de aproximadamente 1,8 MDa. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 20 min. Se dejó que la solución se enfriara hasta la temperatura ambiente y se guardó en dos botellas de plástico. La solución tenía una viscosidad de cono/placa de 304 cP a 1 rpm y de 111 cP a 17 rpm.

Solución A [ej. comp. A]. Se preparó un ácido hialurónico (HA) al 0,5% en peso añadiendo lentamente 10,0 g de HA

a 1.990,0 g de agua purificada mantenida a aproximadamente 70°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 47 min. Se dejó que la solución se enfriara hasta la temperatura ambiente y se guardó en dos botellas de plástico. La solución tenía una viscosidad de cono/placa de 1.343 cP a 1 rpm y de 192,2 cP a 17 rpm.

Solución B [ej. comp. B]. Se preparó un ácido hialurónico al 1,0% en peso añadiendo lentamente 20,0 g de HA a 1.980,0 g de agua purificada mantenida a aproximadamente 70°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 75 min. Se dejó que la solución se enfriara hasta la temperatura ambiente y se guardó en dos botellas de plástico. Debido a la alta viscosidad aparente de la solución, no se obtuvo una medición de la viscosidad.

Solución C [ej. comp. C]. Se preparó un ácido hialurónico (HA) al 3,0% en peso añadiendo lentamente 15,0 g de HA a 485,0 g de agua purificada mantenida a aproximadamente 70°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 150 min. El producto dio lugar a la formación de un gel no vertible muy espeso y ciertamente comenzó a desplazar hacia arriba la barra de agitación. No se obtuvo una medición de la viscosidad.

En una realización, el procedimiento de esterilización por filtración descrito incluye las siguientes condiciones de procesado y de solución para un cartucho de filtro PES o PVDF de 0,22 micras de tamaño de poro. Se obtiene comercialmente un ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 0,7 MDa a aproximadamente 1,7 MDa como un polvo seco fino. Se añade una cantidad apropiada del ácido hialurónico seco a un recipiente de mezcla seco junto con una cantidad apropiada de cloruro de sodio. Se mezclan en seco los dos polvos de manera efectiva diluyendo el ácido hialurónico en el cloruro de sodio. Mientras tanto, se añade agua purificada a un tanque de mezcla y se calienta el agua y se mantiene a una temperatura de 40°C a 80°C. Se añaden lentamente el hialuronato/NaCl mezclados en seco al agua purificada y se agita la solución hasta que el ácido hialurónico aparece visiblemente completamente en solución (es decir, disuelto). Se trata entonces la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino con calor a una temperatura de 40°C a 80°C durante al menos una hora y no más de seis días. De nuevo, hay que entender que, cuanto mayor sea la temperatura de mantenimiento, más corta será la duración del tratamiento térmico. Después del tratamiento térmico, se enfría preferiblemente la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino hasta una temperatura de aproximadamente 45°C a 55°C, claro está si la temperatura de mantenimiento es mayor de 55°C.

En muchas realizaciones, el ácido hialurónico tendrá un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 3,6 MDa, de 0,8 MDa a 2,2 MDa, de 0,8 MDa a 1,6 MDa o de 1,1 MDa a 1,4 MDa.

Ejemplo 2, FIG. 1. Se preparó un ácido hialurónico al 0,25% en peso añadiendo lentamente una mezcla mezclada en seco de 10,0 g de HA y 500 g de NaCl (12,5% en peso) a 3.490,0 g de agua purificada mantenida a aproximadamente 78°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA tenía un peso molecular medio ponderal declarado de aproximadamente 1,8 MDa. Se dejó que la solución se enfriara hasta la temperatura ambiente. La solución tenía una viscosidad de cono/placa de 16,3 cP a 30 rpm.

Ejemplo 3, FIG. 1. Se preparó un ácido hialurónico (HA) al 0,125% en peso añadiendo lentamente una mezcla mezclada en seco de 5,0 g de HA y 250 g de NaCl (6,25% en peso) a 3.745,0 g de agua purificada mantenida a aproximadamente 73°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA tenía un peso molecular medio ponderal declarado de aproximadamente 1,4 MDa. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 75 min. Se dejó que la solución se enfriara hasta la temperatura ambiente. La solución tenía una viscosidad de cono/placa de 6,4 cP a 60 rpm.

Ejemplo 4, FIG. 1. Se preparó un ácido hialurónico (HA) al 0,125% en peso añadiendo lentamente una mezcla mezclada en seco de 5,0 g de HA y 250 g de NaCl (6,25% en peso) a 3.485,0 g de agua purificada que contenía 160 g de ácido bórico (4% en peso) mantenida a aproximadamente 76°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA tenía un peso molecular medio ponderal declarado de aproximadamente 1,4 MDa. Se dejó que la solución se enfriara hasta la temperatura ambiente. La solución tenía una viscosidad de cono/placa de 3,5 cP a 60 rpm.

Como sugieren los datos indicados en la FIG. 1, la solución del Ejemplo 4 con un 4% en peso de ácido bórico es casi dos veces más eficaz al pasar a través de un disco de filtro PVDF que una solución comparable sin el ácido bórico, es decir, la solución del Ejemplo 3. Más aún, la solución del Ejemplo 4 es cinco veces más eficaz al pasar a través de un disco de filtro PES que la solución del Ejemplo 3.

Ejemplo 5, FIG. 1. Se preparó un ácido hialurónico (HA) al 0,25% en peso añadiendo lentamente una mezcla mezclada en seco de 5,0 g de HA y 250 g de NaCl (12,5% en peso) a 1.745,0 g de agua purificada mantenida a aproximadamente 75°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA tenía un peso molecular medio ponderal declarado de aproximadamente 0,8 MDa. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 30 min. Se dejó que la solución se enfriara hasta la temperatura ambiente. La solución tenía una viscosidad de cono/placa de 8,3 cP a 60 rpm.

Ejemplo 6, FIG. 1. Se preparó un ácido hialurónico (HA) al 0,25% en peso añadiendo lentamente una mezcla mezclada en seco de 4,0 g de HA y 200 g de NaCl (12,5% en peso) a 1.396,0 g de agua purificada mantenida a aproximadamente 73°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA tenía un peso molecular medio ponderal declarado de aproximadamente 0,7 MDa. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 30 min. Se dejó que la solución se enfriara hasta la temperatura ambiente. La solución tenía una viscosidad de cono/placa de 8,7 cP a 60 rpm.

Efecto de la temperatura de mantenimiento sobre el peso molecular

Ejemplo 7A. Se preparó una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino que contenía un 0,26% en peso de ácido hialurónico y un 13% en peso de NaCl como se describe en el Ejemplo 2. Se añadió lentamente una mezcla mezclada en seco de 5,2 g de HA y 260 g de NaCl a 1.734,8 g de agua destilada por calor mantenida a 69°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 105 min., siendo la temperatura en este momento de 66°C. Se enfrió la solución hasta aproximadamente 40°C en aproximadamente 10 min. y se mantuvo a aproximadamente 40°C. Se recogieron muestras a las 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 18 h, variando la temperatura de la solución durante este tiempo de 38°C (18 h) a 44°C (4 h). Se usó un sistema de triple detección por GPC acuosa para determinar el peso molecular medio ponderal de cada muestra. También se realizaron determinaciones de viscosidad de cono/placa para cada muestra a 12 rpm. En la Tabla 3 se muestran tanto los datos del peso molecular por GPC como los datos de viscosidad.

Tabla 3. Ej. 7A, datos a 40°C

Tiempo (h)	M _p 10 ³	Viscosidad cP
0	1475	22,6
1	1463	22,3
2	1475	21,9
3	1455	21,8
4	1459	21,6
18	1463	20,1

Ejemplo 7B. Se preparó una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino que contenía un 0,26% en peso de ácido hialurónico y un 13% en peso de NaCl como se describe en el Ejemplo 2. Se añadió lentamente una mezcla mezclada en seco de 5,2 g de HA y 260 g de NaCl a 1.734,8 g de agua destilada por calor mantenida a 67°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 115 min., siendo la temperatura en ese momento de 69°C. Se enfrió la solución hasta aproximadamente 50°C en aproximadamente 10 min. y se mantuvo a aproximadamente 50°C. Se recogieron muestras a las 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 18 h, variando la temperatura de la solución durante ese tiempo de 46°C (18 h) a 54°C (3 h). Se usó un sistema de triple detección por GPC acuosa (Integrated PL-GPC50 con 2x Waters Ultrahydrogel Linear, 7,8 x 300 mm) para determinar el peso molecular medio ponderal de cada muestra. También se realizaron determinaciones de la viscosidad de cono/placa para cada muestra a 12 rpm. En la Tabla 4 se muestran tanto los datos del peso molecular por GPC como los datos de viscosidad.

Tabla 4. Ej. 7B, datos a 50°C

Tiempo (h)	M _p 10 ³	Viscosidad cP
0	1506	29,5
1	1511	29,0
2	1474	28,9
3	1488	28,6
4	1507	27,7
18	1462	24,7

Ejemplo 7C. Se preparó una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino que contenía un 0,26% en peso de ácido hialurónico y un 13% en peso de NaCl como se describe en el Ejemplo 2. Se añadió lentamente una mezcla mezclada en seco de 5,2 g de HA y 260 g de NaCl a 1.734,8 g de agua destilada por calor mantenida a 70°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 125 min., siendo la temperatura en ese momento de 67°C. Se enfrió la solución hasta aproximadamente 61°C en aproximadamente 5 min. y se mantuvo a aproximadamente 60°C. Se recogieron muestras a las 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 18 h, variando la temperatura de la solución durante ese tiempo de 56°C (18 h) a 61°C (0 h). Se usó un sistema de triple detección por GPC acuosa para determinar el peso molecular medio ponderal de cada muestra. También se realizaron determinaciones de la viscosidad de cono/placa para cada muestra a 30 rpm. En la Tabla 5 se muestran tanto los datos del peso molecular por GPC como los datos de viscosidad.

Tabla 5. Ej. 7C, datos a 60°C

Tiempo (h)	M _p 10 ³	Viscosidad cP
0	1389	16,0
1	1326	14,8
2	1327	13,9
3	1305	13,0
4	1328	12,2
18	1174	9,7

5 **Ejemplos 8A a 8C.** Se repitió el Ejemplo 7, con la excepción de utilizar un segundo lote de ácido hialurónico y de que las temperaturas de mantenimiento eran de aproximadamente 50°C (8A), 55°C (8B) y 60°C (8C). En la Tabla 6 se muestran las determinaciones del peso molecular.

Tabla 6

Tiempo (h)	M _p 10 ³ 8A	M _p 10 ³ 8B	M _p 10 ³ 8C
0	1666	1537	1173
1	1654	1513	1094
2	1605	1515	1024
3	1619	1472	1020
4	1607	1467	918
19	1546	1373	805

10 **Ejemplo 9.** Se preparó una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino que contenía un 0,26% en peso de ácido hialurónico y un 13% en peso de NaCl. Se añadió lentamente una mezcla mezclada en seco de 5,2 g de HA y 260 g de NaCl a lo largo de 5 min. a 1.734,8 g de agua destilada por calor mantenida a aproximadamente 66°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 107 min.,
15 siendo la temperatura en ese momento de aproximadamente 70°C. Se enfrió la solución hasta aproximadamente 50°C en aproximadamente 5 min. y se mantuvo a aproximadamente 50°C. Se preenjuagó un filtro de disco de V_{máx} de 47 mm (STW 0,2 Everlux™ 0,45/0,22 micras) con agua a 50°C durante 5 min. Se filtró la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino tratada con calor a través del filtro a 27 psi. Usando un programa de conversión Millipore, la filtración a través del disco necesitaría aproximadamente 2,7 cartuchos de filtro de 10 pulgadas para un volumen de solución de 777 l.
20

Ejemplo 10. Un experimento similar al Ejemplo 9, con la excepción de que se redujeron las concentraciones de HA y NaCl en un 25%. Se preparó una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino que contenía un 0,195% en peso de ácido hialurónico y un 9,75% en peso de NaCl. Se añadió lentamente una mezcla mezclada en seco de 3,9 g de HA y 195 g de NaCl a lo largo de 5 min. a 1.801,1 g de agua destilada por calor mantenida a aproximadamente 69°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 100 min., siendo la temperatura en ese momento de aproximadamente 69°C. Se enfrió la solución hasta aproximadamente 51°C en aproximadamente 7 min. y se mantuvo a aproximadamente 51°C. Se preenjuagó un filtro de disco de V_{máx} de 47 mm (STW 0,2 Everlux™ 0,45/0,22 micras) con agua a 50°C durante 5 min. Se filtró la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino tratada con calor a través del filtro a 27 psi. Usando un programa de conversión Millipore, la filtración a través del disco necesitaría aproximadamente 2,6 cartuchos de filtro de 10 pulgadas para un volumen de solución de 777 l.
25
30

Ejemplo 11. Un experimento similar al Ejemplo 9, con la excepción de que se redujeron las concentraciones de HA y NaCl en un 50%. Se preparó una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino que contenía un 0,13% en peso de ácido hialurónico y un 6,5% en peso de NaCl. Se añadió lentamente una mezcla mezclada en seco de 2,6 g de HA y 130 g de NaCl a lo largo de 5 min. a 1.867,4 g de agua destilada por calor mantenida a aproximadamente 68°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparecía totalmente disuelto después de aproximadamente 97 min., siendo la temperatura en ese momento de aproximadamente 69°C. Se enfrió la solución hasta aproximadamente 49°C en aproximadamente 8 min. y se mantuvo a aproximadamente 49°C. Se preenjuagó un filtro de disco de V_{máx} de 47 mm (STW 0,2 Everlux™ 0,45/0,22 micras) con agua a 50°C durante 5 min. Se filtró la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino tratada con calor a través del filtro a 27 psi. Usando un programa de conversión Millipore, la filtración a través del disco necesitaría aproximadamente 3,0 cartuchos de filtro de 10 pulgadas para un volumen de solución de 777 l.
35
40
45

En una realización, se describe un procedimiento para esterilizar una solución acuosa de ácido hialurónico con un medio de filtro apropiado. El procedimiento comprende disponer de una solución acuosa de ácido hialurónico que tiene un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 3,6 MDa. La concentración del ácido hialurónico en la solución es del 0,04% al 0,8% en peso. Además, para facilitar la eficacia de filtración, la solución acuosa tiene una fuerza iónica equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 3% al 30% en peso. La presencia de la sal reduce la viscosidad de solución de la solución de ácido hialurónico. Los solicitantes creen que el ácido
50

hialurónico se enrolla más estrechamente en una solución de fuerza iónica relativamente alta, lo que da como resultado un reducido radio de giro del biopolímero. La solución de ácido hialurónico de alto contenido salino es sometida a un tratamiento térmico, que reduce aún más la viscosidad de la solución. En consecuencia, se mantiene la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino a una temperatura de 40°C a 80°C durante al menos 1 hora y no más de seis días. Se filtra entonces la solución tratada con calor a través de un medio de esterilización por filtración. El medio de filtración tiene un tamaño medio de poro de 0,25 µm o menos, v.g., un tamaño de poro de 0,22 µm, para proporcionar una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada. Para facilitar la disolución del ácido hialurónico tras su adición al agua (típicamente, el ácido hialurónico está comercializado como un polvo seco fino), el ácido hialurónico es preferiblemente mezclado en seco con la sal, v.g., NaCl. Se añade luego lentamente la mezcla de sal/ácido hialurónico mezclada en seco a una cantidad apropiada de agua purificada con agitación.

En una realización, el tratamiento térmico de la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino conlleva el mantenimiento de la solución a una temperatura de 40°C a 70°C, aunque generalmente se mantiene la solución a una temperatura de 50°C a 70°C durante 1 hora a 12 horas. De nuevo, con una temperatura de mantenimiento más alta se necesitan tiempos de mantenimiento más cortos. Por ejemplo, si se mantiene la solución acuosa de ácido hialurónico de alto contenido salino a una temperatura de 55°C a 65°C, se recomienda un tiempo de mantenimiento de al menos 1 hora y no mayor de 12 horas bajo dicho tratamiento térmico.

La solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada tiene preferiblemente una concentración de ácido hialurónico del 0,15% al 0,6% en peso y una fuerza iónica preferida equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 4% al 16% en peso.

Como se ha indicado, el pH puede desempeñar un papel en la velocidad de hidrólisis del polímero de ácido hialurónico, que se piensa está catalizada en presencia de ácido o de base. En consecuencia, la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino es mejor preparada a un pH de 6,4 a 7,2 para limitar la escisión hidrolítica del biopolímero, reduciéndose así el peso molecular medio ponderal del ácido hialurónico con el tiempo.

En algunas realizaciones, se usa la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada a través de filtro y tratada con calor para preparar formulaciones farmacéuticas, incluyendo las usadas en aplicaciones oftálmicas, así como en el tratamiento de la osteoartritis. En consecuencia, se puede mezclar la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada por filtración con una solución acuosa preesterilizada que comprende otros componentes de formulaciones farmacéuticas, incluyendo componentes tampón, v.g., ácido bórico y borato de sodio. En el caso de una formulación oftálmica, se ajusta el pH a un valor de 6,4 a 7,2. Dividiendo la formulación acuosa en al menos dos partes o fases separadas de procesamiento comercial, se reduce significativamente el volumen de la formulación que requiere esterilización a través de filtro. En muchos casos, se puede diluir la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada por un factor de al menos 10 para obtener la concentración deseada de ácido hialurónico en la formulación farmacéutica; de este modo, menos de una décima parte de la formulación requeriría esterilización a través de filtro. En otro caso, se puede diluir la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada por un factor de al menos 5. Dependiendo del resto de los componentes en la formulación farmacéutica, se puede esterilizar por calor, v.g., autoclavar, la porción de volumen mayoritaria de la formulación, o también se puede esterilizar esta porción a través de filtro (suponiendo, por supuesto, que el volumen mayoritario de la formulación pueda ser filtrado con alta eficacia).

Tradicionalmente, un medio de esterilización por filtración es uno que, cuando se le desafía con el organismo de ensayo *Brevundimonas diminuta* (*B. diminuta*) a una concentración mínima de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/cm², produce un efluente estéril. El medio de filtración ciertamente desempeña un papel en la velocidad de flujo de filtración (litros/min.) para una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino dada. Se dispone de una serie de medios de filtración para uso en filtros esterilizantes. Éstos incluyen fluoruro de polivinilideno (PVDF), politetrafluoroetileno (PTFE) y poliéter sulfona (PES). Se monta entonces la membrana de filtro en un cartucho. Por ejemplo, los cartuchos de membrana hidrofóbica Durapore® son filtros de grado esterilizante que proporcionan garantía de esterilidad, altas velocidades de flujo y alto rendimiento con mínima presión diferencial. Se usan para la filtración de líquidos en sistemas de pequeño y gran volumen. La membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofóbica de 0,22 µm Durapore® elimina de manera fiable contaminantes y microorganismos en aplicaciones de esterilización. El material de construcción para la estructura de filtro de soporte (v.g., caja, núcleo, tapones terminales y adaptadores) es normalmente polipropileno o una polisulfona.

En otra realización, un procedimiento para esterilizar una solución que contiene ácido hialurónico incluye la preparación de una solución acuosa de ácido hialurónico de alto contenido salino. El ácido hialurónico tendría un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 2,2 MDa y una concentración de ácido hialurónico del 0,08% al 0,5% en peso. La solución de ácido hialurónico tendrá una fuerza iónica equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 4% al 18%. Se consigue la relativamente alta fuerza iónica de la solución gracias a la adición de una o más sales iónicas, v.g., cloruro de sodio o borato de sodio. Se somete la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino a un tratamiento térmico a una temperatura de 50°C a 75°C durante al menos 1 hora y no más de 18 horas. Se filtra entonces la solución tratada con calor a través de un medio de esterilización por filtración como se ha descrito anteriormente. De nuevo, para facilitar la disolución del ácido hialurónico en el agua, el ácido hialurónico

es preferiblemente mezclado en seco con la sal, v.g., NaCl. Se añade luego lentamente la mezcla de sal/ácido hialurónico mezclada en seco al agua con agitación.

En otra realización, el tratamiento con calor de la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino comprende de un 0,1% a un 0,4% en peso de ácido hialurónico y de un 8% a un 16% en peso de cloruro de sodio. Se somete entonces la solución a un tratamiento térmico como se ha descrito. De nuevo, con una mayor temperatura de mantenimiento se necesitan tiempos de mantenimiento más cortos. Por ejemplo, si se mantiene la solución acuosa de ácido hialurónico de alto contenido salino a una temperatura de 55°C a 65°C, se recomienda un tiempo de mantenimiento de al menos 2 horas y no más de 8 horas.

Los procedimientos de esterilización a través de filtro descritos para soluciones acuosas que contienen ácido hialurónico pueden ser usados para preparar una solución acuosa esterilizada que comprende: de un 0,04% a un 0,8% en peso de ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 3,6 MDa. La solución acuosa tendrá una fuerza iónica equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 4% al 18% en peso de cloruro de sodio, y se esteriliza la solución a través de filtro.

En una realización, la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada a través de filtro tendrá una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 25 g a 60 g de cloruro de sodio por cada gramo de ácido hialurónico en un litro de solución. Por ejemplo, una solución al 0,1% en peso de ácido hialurónico incluirá una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 25 g a 60 g de cloruro de sodio. De igual modo, una solución al 0,2% en peso de ácido hialurónico incluirá una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 50 g a 120 g de cloruro de sodio. Una solución al 0,3% en peso de ácido hialurónico incluirá una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 75 g a 180 g de cloruro de sodio.

En otra realización, se puede usar el procedimiento de esterilización por filtración descrito para preparar cantidades de lotes de producción a escala comercial de una solución para el cuidado de las lentes de contacto. El procedimiento sería similar al descrito anteriormente, a excepción de que la formulación final también incluiría componentes adecuados para una solución para el cuidado de las lentes de contacto. Algunos de estos componentes, tales como el ácido hialurónico, pueden ser más adecuados para una esterilización por filtración, mientras que otros pueden ser probablemente esterilizados por calor. Se pueden preparar lotes de producción con un volumen de solución total final de 5.000 l a 40.000 l.

De nuevo, se puede comenzar preparando una solución acuosa de ácido hialurónico de alto contenido salino. El ácido hialurónico tendría un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 3,6 MDa y una concentración de ácido hialurónico del 0,04% al 0,8% en peso. La solución de ácido hialurónico tendrá una fuerza iónica equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 3% al 30%. La relativamente alta fuerza iónica de la solución es conseguida mediante la adición de una o más sales iónicas, v.g., cloruro de sodio o borato de sodio. Se somete la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino a un tratamiento térmico a una temperatura de 55°C a 75°C durante al menos 1 hora y no más de 12 horas. Se filtra entonces la solución tratada con calor a través de un medio de esterilización por filtración como se ha descrito anteriormente.

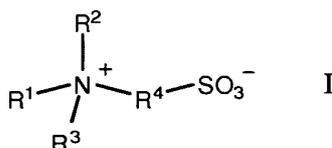
Se combina luego la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada con una segunda solución acuosa que podría contener la mayor parte o todos del resto de los componentes de la solución para el cuidado de lentes de contacto, v.g., componentes tampón, uno o más surfactantes, uno o más agentes quelantes y uno o más componentes antimicrobianos. De nuevo, combinando las dos soluciones acuosas se diluye la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada por un factor de al menos 5, o en algunos casos por un factor de al menos 10.

Como se ha indicado, las soluciones para el cuidado de lentes también incluirán uno o más componentes antimicrobianos seleccionados entre compuestos de amonio cuaternario (incluyendo pequeñas moléculas) y polímeros y biguanidas de bajo y alto peso molecular. Por ejemplo, las biguanidas incluyen las bases libres o las sales de alexidina, clorhexidina, hexametilbiguanidas y sus polímeros y sus combinaciones. En una realización preferida, las soluciones para el cuidado de lentes incluirán una biguanida polimérica conocida como poli(hexametilbiguanida) (PHMB o PAPB), comercializada por Zeneca, Wilmington, DE, bajo la denominación de marca Cosmocil™ CQ. La PHMB está presente en las soluciones para el cuidado de lentes en una cantidad de 0,2 ppm a 5 ppm o de 0,5 ppm a 2 ppm.

Uno de los compuestos de amonio cuaternario más comunes es α -[cloruro de 4-tris(2-hidroxiethyl)amonio-2-butenil]poli[cloruro de 1-dimetilamonio-2-butenil]- ω -cloruro de tris(2-hidroxiethyl)amonio, al que también se hace referencia en la técnica como policuaturnio-1. En general, se hace referencia en la técnica a los compuestos de amonio cuaternario como desinfectantes de "policuaturnio" y se les identifica por un número particular después de la denominación, tal como policuaturnio-1, policuaturnio-10 o policuaturnio-42. El policuaturnio-1 está presente en las soluciones para el cuidado de lentes en una cantidad de 0,5 ppm a 3 ppm. Es interesante el hecho de que los intentos por aumentar la concentración de policuaturnio-1 más allá de 3 ppm en las soluciones dan lugar a la formación de un precipitado. Se cree que el precipitado es el producto de la acomplejación del ácido hialurónico y del policuaturnio-1.

Una de las combinaciones más preferidas de dos componentes antimicrobianos incluye una mezcla de PHMB a una concentración de 0,5 ppm a 1,5 ppm y policuaturnio-1 a una concentración de 0,5 ppm a 1,5 ppm. En dicha formulación, el ácido hialurónico está presente en una cantidad del 0,002% en peso al 0,04% en peso.

- 5 La solución para el cuidado de las lentes de contacto podría también incluir de un 0,01% en peso a un 1% en peso de un surfactante anfotérico de fórmula general I. Ciertas sulfobetainas de fórmula general I son más preferidas que otras. Por ejemplo, la sulfobetaina 3-10, donde R¹ es un alquilo saturado lineal de diez (10) carbonos, R² y R³ son cada uno metilo y R⁴ es -CH₂CH₂CH₂- (tres carbonos, (3)). Otras sulfobetainas que pueden ser usadas en las composiciones oftálmicas incluyen las correspondientes sulfobetaina 3-08 (R¹ es un alquilo saturado lineal de ocho carbonos), sulfobetaina 3-12 (R¹ es un alquilo saturado lineal de doce carbonos), sulfobetaina 3-14 (R¹ es un alquilo saturado lineal de catorce carbonos) y sulfobetaina 3-16 (R¹ es un alquilo saturado lineal de dieciséis carbonos). En consecuencia, algunas de las composiciones oftálmicas más preferidas incluirán una sulfobetaina de fórmula general I donde R¹ es un alquilo C₈-C₁₆ y R² y R³ son metilo y R⁴ es -CH₂CH₂CH₂-.



- 15 Se describen otros componentes que pueden ser incluidos en una solución para el cuidado de lentes de contacto en US 2009/0196846.

- 20 En una realización, se preparan soluciones acuosas de sulfobetaina de fórmula general I, PHMB y policuaturnio-1 y se pasan a través de un filtro de esterilización similar a un medio de filtración usado para procesar la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino. Se añade entonces cada una de las soluciones esterilizadas a través de filtro a un tanque de mezcla común.

- 25 **Ejemplo 12.** Se prepara un lote de producción a escala comercial de una solución limpiadora y desinfectante multiuso para lentes de contacto como cuatro fases separadas (soluciones acuosas) y se combinan en un tanque de mezcla principal.

- 30 Fase 1. En un recipiente de presión con camisa de acero inoxidable 316 de tamaño apropiado, equipado con agitación, se añade suficiente agua purificada como para conseguir una agitación máxima. El volumen de agua de la fase 1 sería de aproximadamente un 60 - 96% del volumen total del lote. Se calienta el agua para conseguir y/o mantener la temperatura del agua a no menos de 70°C. Se inicia la agitación y se mantiene a lo largo de todo el procesado del lote. En el orden enumerado, se añaden y disuelven las cantidades de lote de los siguientes: edetato disódico, ácido bórico, borato de sodio y poloxamina 1107. Se mezcla la solución durante no menos de veinte minutos para asegurar la completa disolución de la poloxamina 1107. Se retira una muestra de la solución y se determina el pH. Si es necesario, se ajusta el pH a 7,3 - 7,7 con NaOH 1N o HCl 1N. Se sella el reactor y se esteriliza por calor la solución de la Fase 1 a 121 - 124°C durante 30 - 45 minutos usando un ciclo validado y recurriendo al Procedimiento General para Soluciones Esterilizadas por Vapor Bajo Presión en cuanto a los requerimientos del proceso y de la documentación. Al completarse el período de esterilización, se enfría la solución de la fase 1 a menos de 40°C.

- 45 Fase II. La Fase II es una mezcla acuosa de agua purificada, un 0,26% en peso de ácido hialurónico y un 13% en peso de cloruro de sodio. Se combinan y mezclan en seco las cantidades de lote de ácido hialurónico y cloruro de sodio. Mientras se mezcla una cantidad apropiada de agua, se vierte lentamente la mezcla mezclada en seco de NaCl/ácido hialurónico en el tanque de mezcla. Se mezcla la solución de NaCl/ácido hialurónico mientras se mantiene un rango de temperatura de 65 - 75°C hasta que el ácido hialurónico se ha disuelto por completo. Se examina visualmente la solución, ralentizando la mezcladora si es necesario, para examinar visualmente cualquier ácido hialurónico suspendido.

- 50 Una vez se ha disuelto por completo el ácido hialurónico, se enfría la solución hasta 50 - 55°C. Se filtra la solución de NaCl/ácido hialurónico a través de filtro(s) Millipore CVGL esterilizado(s) en el tanque de preparación de compuestos de la Fase I. La presión diferencial no debe exceder de 30 psi.

- 55 Fase III. Se añaden a un recipiente de presión adecuado equipado con agitación un 0,50% - 4,95% del peso total del lote de agua purificada a una temperatura de menos de 40°C y una cantidad de lote de polvo de sulfobetaina para preparar una solución al 0,05% en peso - 10,0% en peso. Se mezcla la solución durante un mínimo de veinte minutos. Se filtra asépticamente la solución de sulfobetaina en la solución de la Fase 1 a través de un filtro Millipore de 0,22 μm estéril (diferente montaje de filtro que el usado en la transferencia de la Fase II). Se mezcla la solución de la Fase I durante no menos de diez minutos.

- 60 Fase IV. Se añaden a un recipiente de presión adecuado equipado con agitación un 0,078% - 1,98% del peso total

del lote de agua fría (menos de 40°C) más las cantidades de lote de poli(hexametilenbiguanida) y policuaternio-1 para preparar una solución al 0,03% - 1,00%. Se mezcla la solución durante un mínimo de diez minutos. Se filtra asépticamente la solución de PHMB/PQ-1 en la solución de la Fase I a través de un filtro Millipore de 0,22 µm estéril.

5 **Ejemplo 13.** Se prepara una formulación de colirio para rehumedecimiento de lentes de contacto como sigue. Se prepara una solución acuosa de hialuronato de alto contenido salino que contiene un 3,0% en peso de ácido bórico NF, un 2,1% en peso de NaCl USP, un 0,7% en peso de KCl USP y un 0,5% en peso de ácido hialurónico (peso molecular medio de aproximadamente 0,8 MDa). Se añade lentamente una mezcla mezclada en seco del HA y el NaCl a lo largo de 5 min. a agua destilada por calor mantenida a aproximadamente 68°C en un recipiente inoxidable con agitación. El HA aparece totalmente disuelto después de aproximadamente 100 min. Se enfría la solución hasta 10 aproximadamente 55°C en aproximadamente 8 min. y se mantiene a aproximadamente 55°C durante no menos de 3 horas. Se añaden el KCl y el ácido bórico a la solución de HA tratada con calor y enfriada y se agita la solución durante 10 min. Se esteriliza la solución por filtración pasando la solución a través de un medio de filtración de 0,22 µm PVDF a una temperatura de 55°C. Se prepara por separado una segunda solución acuosa esterilizada que 15 contiene un 1,75% en peso de borato de sodio decahidrato, un 0,03% en peso de cloruro de calcio deshidrato USP, un 0,03% en peso de cloruro de magnesio hexahidrato y un 0,025% en peso de complejo oxiclورو estabilizado (purita). Se puede esterilizar esta segunda solución de sal usando un procedimiento de esterilización por calor convencional. De manera alternativa, se puede esterilizar por filtración esta solución usando el mismo filtro usado en la preparación de la solución de HA. Después de la esterilización de la segunda solución de sal, se combina la 20 segunda solución con la solución de hialuronato de alto contenido salino tratada con calor en una razón de volúmenes de 4:1, respectivamente. En la Tabla 7 se da la formulación oftálmica final, que puede ser usada como una formulación de colirio para rehumedecimiento de lentes de contacto.

25

Tabla 7. Colirio para rehumedecimiento de lentes de contacto

Componente	% en peso
Hialuronato de sodio	0,1
Cloruro de sodio	0,42
Cloruro de potasio	0,14
Ácido bórico	0,6
Borato de sodio	0,035
Cloruro de calcio	0,006
Cloruro de magnesio	0,006
Oxiclورو estabilizado (purita)	0,005

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para esterilizar una solución, consistiendo dicho procedimiento en:
 - 5 proporcionar una solución acuosa de ácido hialurónico que tiene un peso molecular medio ponderal de 0,6 MDa a 3,6 MDa y una concentración de ácido hialurónico del 0,04% al 0,8% en peso, donde la solución acuosa tiene una fuerza iónica equivalente a una concentración acuosa de cloruro de sodio del 3% al 30% en peso, para obtener una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino;
 - 10 mantener la solución acuosa de ácido hialurónico de alto contenido salino a una temperatura de 40°C a 80°C durante al menos 1 hora y no más de seis días; y
 - filtrar la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino calentada a través de un medio de esterilización por filtración, donde el medio de filtración tiene un tamaño medio de poro de 0,25 μm o menos, para obtener una solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada.
 - 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderal de 0,8 MDa a 2,2 MDa.
 3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la concentración del ácido hialurónico es del 0,1% al 0,5% en peso.
 - 20 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la obtención de la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino comprende la combinación y mezcla de un peso seco apropiado de sal y ácido hialurónico para formar una mezcla seca de la sal y el ácido hialurónico y la adición de la mezcla seca a una cantidad apropiada de agua purificada.
 - 25 5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde el agua purificada es precalentada hasta una temperatura de 40°C a 70°C.
 - 30 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el mantenimiento de la solución acuosa de ácido hialurónico de alto contenido salino comprende el mantenimiento a una temperatura de 50°C a 65°C durante al menos 1 hora y no más de 12 horas.
 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende la combinación de la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada con una solución acuosa que contiene componentes tampón y el ajuste del pH a un valor de 6,4 a 7,2, y mediante la combinación de las dos soluciones acuosas, se diluye la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada por un factor de al menos 10.
 - 35 8. El procedimiento de la reivindicación 7, donde los componentes tampón incluyen ácido bórico y borato de sodio.
 - 40 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada tiene un pH de 6,4 a 7,2.
 - 45 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada tiene una concentración de ácido hialurónico del 0,15% al 0,6% en peso y de cloruro de sodio del 4% al 16% en peso.
 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el medio de esterilización por filtración es un cartucho de filtro de fluoruro de polivinilideno.
 - 50 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además comprende la combinación de la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada con una solución acuosa que contiene componentes tampón seleccionados entre el grupo consistente en ácido bórico, borato de sodio y dihidrógeno fosfato de sodio y el ajuste del pH a un valor de 6,4 a 7,2, y mediante la combinación de las dos soluciones acuosas se diluye la solución de ácido hialurónico de alto contenido salino esterilizada por un factor de al menos 5.
 - 55 13. El procedimiento de la reivindicación 12, donde las soluciones acuosas combinadas incluyen además cloro estabilizado en una cantidad conservante efectiva.
 - 60 14. El procedimiento de las reivindicaciones 12 ó 13, donde las soluciones acuosas combinadas incluyen además poli(hexametilenbiguanida), que está presente en una cantidad de 0,5 ppm a 2,0 ppm, o α -[cloruro de 4-tris(2-hidroxi-etil)amonio-2-butenil]poli[cloruro de 1-dimetilamonio-2-butenil]- ω -cloruro de tris(2-hidroxi-etil)amonio, que está presente en una cantidad de 0,5 ppm a 3 ppm.

FIG. 1

