

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 115**

51 Int. Cl.:

C08L 5/08 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

C08K 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2011 E 11704388 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2534200**

54 Título: **Ácido hialurónico oxidado entrecruzado para uso como un sustituto vítreo**

30 Prioridad:

31.08.2010 US 871923

12.02.2010 US 303673 P

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

05.05.2015

73 Titular/es:

**NATIONAL HEALTH RESEARCH INSTITUTES
(100.0%)**

**No. 35, Keyan Road
Zhunan Town, Miaoli County 35053, TW**

72 Inventor/es:

**LIN, FENG-HUEI;
SU, WEN-YU;
CHEN, YU-CHUN y
CHEN, KO-HUA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 535 115 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

Ácido hialurónico oxidado entrecruzado para uso como un sustituto vítreo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a reemplazos vítreos, y más específicamente a los sustitutos del humor vítreo, al método de fabricación y uso de los mismos.

10 Antecedentes de la invención

15 El cuerpo vítreo es una sustancia gelatinosa, transparente, clara en la cavidad vítrea del ojo ubicado en la parte posterior del lente y anterior a la retina. Ocupa dos tercios del volumen ocular y tiene un peso de aproximadamente 4 g y un volumen de aproximadamente 4 ml. Los principales componentes del cuerpo vítreo incluyen agua (98%), fibrillas de colágeno, glicosaminoglicanos, ácido hialurónico (HA) y otros solutos de soporte. Enfermedades específicas, degeneración relacionada con la edad o trauma pueden dar lugar a cambios patológicos en el cuerpo vítreo, incluyendo degeneración del HA y precipitación del colágeno, que se traducen en la licuefacción de la matriz. Un cuerpo vítreo degenerado o licuado dará lugar a la formación de cuerpos en flotación y eventualmente dar lugar a desprendimiento posterior del vítreo y posible desprendimiento de la retina.

20

Entre los tratamientos clínicos, vitrectomía a través de la pars plana (VPP) es una de las cirugías más importantes para el tratamiento de una cantidad de enfermedades relacionadas con el ocular, incluyendo retinopatía diabética, desprendimiento de retina complejo (por ejemplo, debido a un trauma) y agujero macular. Durante la VPP, se corta el cuerpo vítreo y se aspira, y luego se reemplaza típicamente con un sustitutivo vítreo, tal como gas (aire, perfluoropropano o hexafluoruro de azufre) o aceite de silicona. Se usan sustitutos vítreos para rellenar la cavidad vítrea y ayudar a unir nuevamente la retina después de la cirugía de vitrectomía. Después de la operación, un sustitutivo vítreo puede mantener la retina en posición mientras se forma la adhesión entre la retina y las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Los gases que son más ligeros que el agua, son útiles para aplanar una retina desprendida y mantenerla unida mientras se produce la cicatrización. Sin embargo, con frecuencia es necesario permanecer boca abajo después de la cirugía durante una semana o más cuando se utiliza gas. A veces se utiliza el aceite de silicona en lugar de los gases para mantener la retina unida después de la operación desde los años 1960 para los desprendimientos de retina complicados, o en pacientes que no se pueden colocar en una posición apropiada después de la operación (por ejemplo, los niños), pero pueden presentarse complicaciones a largo plazo si no se retira después el aceite de silicona. Además, el aceite de silicona también puede ser citotóxico para los tejidos oculares, tales como las células endoteliales de la córnea.

25

30

35

Recientemente, se han investigado numerosos materiales sustitutos del vítreo que utilizan polímero natural, semisintético o sintético, incluyendo poli(vinil alcohol), poli(1-vinil-2-pirrolidona), poli(acrilamida), poli(metacrilato de glicerilo), poli(metil-2-acrilamido-2-metoxiacetato) y poli(2-hidroxietilacrilato). Los criterios para el sustitutivo vítreo ideal incluyen claridad, transparencia, índice de refracción y rigidez suficiente para actuar como un sustituto de taponamiento, capacidad para permitir la transferencia de metabolito, características de no absorción, composición hidrofílica y la capacidad de ser inyectado a través de una aguja de calibre pequeño. Estos criterios sugieren que la búsqueda de un material adecuado para un sustitutivo vítreo no es una tarea fácil.

40

45

Por lo tanto, existe una necesidad hasta ahora sin resolver en la técnica para abordar las deficiencias e insuficiencias mencionadas anteriormente, especialmente en relación con sustitutos vítreos.

La patente de los Estados Unidos No. 5.874.417 describe una composición de materia que comprende un hialuronato que cuenta con una función hidrazida en los sitios del ácido glucurónico de dicho hialuronato.

50

La publicación internacional No. WO2006/130455A2 divulga matrices poliméricas bioreabsorbibles y métodos de fabricación y uso de las mismas.

El documento EP1129683A1 divulga gel de ácido hialurónico, un proceso para la preparación del mismo y materiales médicos que lo contienen.

55

Resumen de la invención

60 En un aspecto, la invención se refiere a una composición para uso como sustituto vítreo para reemplazar el humor vítreo de un ojo, que comprende un polímero de hidrogel que comprende: a) ácido hialurónico oxidado; y b) una dihidrazida que se entrecruza con el ácido hialurónico oxidado; en donde el polímero de hidrogel presenta las siguientes propiedades: a) transparente e incoloro; y b) se transforma de un estado líquido en una matriz de gel a 37 °C.

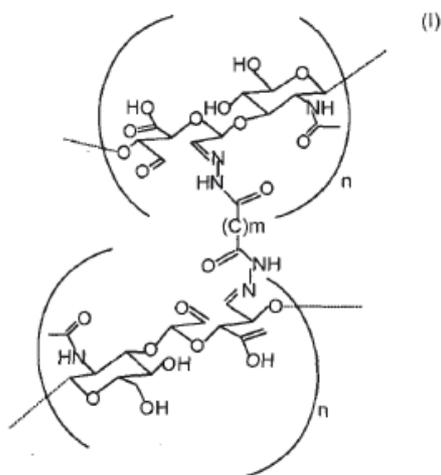
En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de una composición como la mencionada anteriormente, que comprende mezclar una primera solución que comprende ácido hialurónico oxidado con una segunda solución que comprende una dihidrazida para formar la composición para uso.

5

Además en otro aspecto, la invención se refiere a un kit para uso en la preparación de una composición para uso como el mencionado anteriormente que comprende: a) ácido hialurónico oxidado; b) una dihidrazida; c) regulador; y d) un prospecto con instrucciones sobre la preparación de la composición para uso.

10

Incluso en otro aspecto, la invención se refiere a una composición para uso como se mencionó anteriormente que comprende un polímero de hidrogel de la fórmula (I):



15

en donde m, n son enteros, $m \leq 5$, $100 \leq n \leq 2.500$; y en donde el polímero es un hidrogel que presenta las siguientes propiedades: a) transparente e incoloro; y b) se transforma de un estado líquido en una matriz de gel.

20

Estos y otros aspectos serán evidentes a partir de la siguiente descripción de la realización preferida tomada conjuntamente con los dibujos siguientes, aunque pueden efectuarse variaciones y modificaciones a la misma, sin apartarse del espíritu y alcance de los conceptos novedosos de la divulgación.

25

Los dibujos adjuntos ilustran una o más realizaciones de la invención y, junto con la descripción escrita, sirven para explicar los principios de la invención. Siempre que sea posible, se usan los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a los mismos elementos o a elementos similares de una forma de realización.

Breve descripción de los dibujos

30

La FIG. 1 muestra que el ácido hialurónico (HA) es oxidado por peryodato de sodio (NaIO_4).

35

La FIG. 1B es un espectro de FTIR de ácido hialurónico oxidado (oxi-HA) con diferentes grados de oxidación (GO): (i) potencia del HA (GO: 0%), (ii) oxi-HA bajo (GO: 27,3%), (iii) oxi-HA medio (GO: 44,3%) y (iv) oxi-HA alto (GO: 60,4%). La flecha indica los grupos funcionales aldehído de oxi-HA en 1725 cm^{-1} y 836 cm^{-1} , y los picos cambiantes de la banda de C-O-C y CH en 1147 cm^{-1} y 895 cm^{-1} .

40

La FIG. 2A es un dibujo esquemático que muestra oxi-HA entrecruzado de forma covalente con dihidrazida de ácido adípico (ADH).

La FIG. 2B muestra que la solución de oxi-HA/ADH puede inyectarse a través de una aguja de calibre 27 (panel izquierdo) y formar un hidrogel incoloro y transparente (panel derecho).

La FIG. 2C muestra el índice de refracción de oxi-HA al 6% p/v (grado de oxidación: 44,3%) entrecruzado con varias concentraciones de ADH (2% p/v hasta 8% p/v).

La FIG. 3A es un gráfico que muestra el módulo elástico (G' , \circ) y de viscosidad (G'' , \bullet) módulos del hidrogel de oxi-HA/ADH en función del tiempo a 4 °C. El hidrogel de oxi-HA/ADH se preparó haciendo reaccionar oxi-HA al 6 % (p/v) (GO: 44,3%) con 2% del entrecruzador ADH (i), 4% (ii) y 8% (p/v) (iii), respectivamente. El módulo elástico (G' , \circ) y el módulo de viscosidad (G'' , \bullet) del hidrogel de oxi-HA/ADH se midieron a una frecuencia constante de 0,1 Hz en función del tiempo. El punto de gel se define como el punto de cruce de G' y G'' . El tiempo requerido para que se produzca el punto de gel se conoce como el tiempo de gelificación.

La FIG. 3B es un gráfico que muestra el módulo elástico (G' , \circ) y el módulo de viscosidad (G'' , \bullet) del hidrogel de oxi-HA/ADH en función del tiempo a 37 °C. El hidrogel de oxi-HA/ADH se preparó haciendo reaccionar oxi-HA con el entrecruzador ADH como se describe en la FIG. 3A.

La FIG. 4A es un gráfico que muestra la masa restante de hidrogel después de la digestión con lisozima en función del tiempo. El hidrogel de oxi-HA/ADH se preparó haciendo reaccionar oxi-HA al 6% (p/v) (GO: 44,3%) con 2% del entrecruzador ADH (\diamond), 4% (Δ) y 8% (peso / v) (\square), respectivamente. Los hidrogeles cilíndricos (300 μ l) se sumergieron en 3 ml de PBS que contenía 10.000 unidades / ml de lisozima.

La FIG. 4B es un gráfico que muestra el índice de hinchamiento del hidrogel después de la digestión con lisozima en función del tiempo. El hidrogel de oxi-HA/ADH se preparó haciendo reaccionar oxi-HA al 6% (p/v) (GO: 44,3%) con 2% del entrecruzador ADH (\diamond), 4% (Δ) y 8% (p / v) (\square), respectivamente.

La FIG. 5A es un gráfico que muestra que los hidrogeles de oxi-HA/ADH no tuvieron ningún efecto sobre la proliferación celular. Las lecturas de densidad óptica obtenidas en el ensayo de WST-8 se relacionaron con la proliferación celular (n = 6).

La FIG. 5B es un gráfico que muestra que los hidrogeles de oxi-HA/ADH no tuvieron ningún efecto citotóxico. Las células se cultivaron en el medio de extracción del hidrogel de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8 (n = 6).

La FIG. 6 es una colección de fotomicrografías de células teñidas con colorantes para la detección simultánea de células viables y muertas en cultivos de células con un microscopio de fluorescencia. Aumento: 40X, barras de la escala 200 μ m.

La FIG. 7A muestra que no se observa una elevación significativa de la presión intraocular durante el período de observación, y no se observaron diferencias significativas entre los ojos operados y los ojos de control.

La FIG. 7B muestra que no se observaron cambios significativos en el espesor de la córnea durante todo el período de observación, y no se observaron diferencias significativas entre los ojos operados y los ojos de control. (n = 3)

La FIG. 8A muestra una fotografía con lámpara de hendidura del ojo inyectado con oxi-HA/ADH8 (izquierda) 3 semanas después de la operación y del ojo de control (derecha).

La FIG. 8B muestra una observación con un microscopio de luz de una sección histológica retina el día 21 después de la cirugía (coloración HE, 200x). Izquierda: el ojo operado; derecha: el ojo de control (derecho).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos que pretenden ser ilustrativos ya que numerosas modificaciones y variaciones de los mismos resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Diversas realizaciones de la invención se describen ahora en detalle. Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones que siguen, el significado de "un", "uno", "una" y "el, la" incluyen referencias a los plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se utiliza en la presente descripción y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, se pueden utilizar títulos o subtítulos en la memoria descriptiva para la comodidad de un lector, que no tendrá ninguna influencia sobre el alcance de la presente invención. Además, algunos términos usados en esta memoria descriptiva se definen más específicamente a continuación.

Definiciones

Los términos utilizados en esta memoria descriptiva tienen en general sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico donde se utiliza cada término. Algunos de los términos que se utilizan para describir la invención se discuten a continuación, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar una orientación adicional al practicante con respecto a la descripción de la invención. Por conveniencia, ciertos términos se pueden resaltar, por ejemplo, utilizando letra cursiva y/o comillas. El uso de resaltado no tiene ninguna influencia sobre el

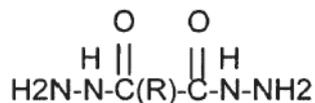
alcance y significado de un término; el alcance y el significado de un término es el mismo, en el mismo contexto, ya sea que esté resaltado o no. Se apreciará que lo mismo se puede decir en más de una forma. En consecuencia, se pueden utilizar expresiones alternativas y sinónimos para uno o más de los términos discutidos en este documento, ni tiene ningún significado especial el hecho de ser colocado después ya sea que un término sea elaborado o discutido en el presente documento. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. La mención de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier lugar en esta memoria descriptiva incluyendo ejemplos de cualquiera de los términos discutidos en el presente documento es sólo ilustrativa, y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la invención o de cualquier término usado como ejemplo. Asimismo, la invención no se limita a las diversas realizaciones mencionadas en esta memoria descriptiva.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto ordinariamente capacitado en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, el presente documento, incluye las definiciones que los controlarán.

Como se usa aquí, "alrededor de", "cerca de" o "aproximadamente" significarán en general dentro del 20 por ciento, preferiblemente dentro del 10 por ciento, y más preferiblemente dentro del 5 por ciento de un valor o intervalo dado. Las cantidades numéricas que se presentan aquí son aproximadas, lo que significa que el término "alrededor de", "cerca de" o "aproximadamente" se puede inferir si no se indican expresamente.

Como se usa en el presente documento, cuando se menciona un número o un intervalo, una persona ordinariamente capacitada en la técnica entiende que abarca un intervalo razonable, apropiado, para el campo particular relacionado con la invención.

El término "hidrogel", como se usa aquí, se refiere a una red entrecruzada de un polímero hidrofílico. Las dihidrazidas están representadas por el grupo activo:



donde R puede ser cualquier radical orgánico polivalente preferiblemente derivado de un ácido carboxílico. Los ésteres de ácidos carboxílicos se hacen reaccionar con hidrato de hidracina en una solución alcohólica usando un catalizador y una etapa de extracción en agua. Las dihidrazidas más comunes incluyen dihidrazida de ácido adípico (ADH), derivada del ácido adípico, dihidrazida de ácido sebácico (SDH), dihidrazida de valina (VDH), derivada del aminoácido valina, y dihidrazida isoftálica (IDH). El grupo R alifático puede ser de cualquier longitud. Por ejemplo, cuando el grupo R es sólo de carbono, el compuesto resultante es carbodihidrazida (CDH), la dihidrazida más rápida. O R siempre y cuando sea de 18 carbonos, ha sido reportado como en la dihidrazida de ácido icosanodioico (LDH). La seguridad de la ADH ha sido bien establecida.

La invención se refiere a un hidrogel inyectable formado *in situ* que se compone de HA oxidado (oxi-HA) y dihidrazida de ácido adípico (ADH) como sustitutivo vítreo. Como se describió anteriormente, el ácido hialurónico (HA) es uno de los principales componentes del humor vítreo. Se ha utilizado ampliamente en el área de biomateriales, ingeniería de tejidos y otros campos relacionados. Estos polímeros a base de glucosa contienen una alta densidad de grupos hidroxilo que vuelven a los polímeros altamente hidrofílicos y con más grupos químicos funcionales. El ácido hialurónico se utilizó por primera vez como sustituto vítreo en la década de 1960. Sin embargo, el ácido hialurónico no proporciona un efecto de taponamiento apropiado sobre la retina durante la cirugía o después de la misma, en parte debido a su baja tensión superficial y a su gravedad específica. Además, las soluciones de HA han demostrado que no son útiles como sustitutos vítreos a largo plazo a causa de su relativamente rápida eliminación del ojo. Para mejorar el tiempo de retención de los sustitutos vítreos con base en HA, se usó peryodato de sodio (NaIO₄) para oxidar el HA para crear grupos funcionales aldehído. Luego, se entrecruzó oxi-HA mediante ADH para formar un hidrogel de oxi-HA/ADH claro, incoloro y transparente.

Los grupos funcionales aldehído del oxi-HA se caracterizaron mediante análisis infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR) y el grado de oxidación del oxi-HA se determinó por el ensayo del ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS). Debido a que un índice de refracción (IR) es una característica esencial de sustitutos vítreos, se midieron mediante un refractómetro el IR de los hidrogeles de oxi-HA/ADH con diversas composiciones. Las propiedades de gelificación de los hidrogeles de oxi-HA/ADH se evaluaron por análisis reológico a 4 °C y 37 °C. Los módulos de elasticidad (G') y de viscosidad (G'') se registraron para determinar el tiempo de gelificación. Además, también se investigaron el tiempo de degradación *in vitro*, las propiedades de hinchamiento y la citotoxicidad del oxi-HA/ADH.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un polímero de hidrogel que comprende: a) un ácido hialurónico oxidado; y b) una dihidrazida, entrelazando el ácido hialurónico oxidado; en donde el polímero de hidrogel

exhibe las siguientes propiedades: a) transparente e incoloro; y b) la transformación de un estado líquido en una matriz de gel a 37 °C.

5 En una realización de la invención, el hidrogel se transforma de un estado líquido a un gel en un lapso de 5 minutos a 37 °C.

10 En una realización de la invención, la dihidrazida se selecciona entre el grupo que consta de dihidrazida de ácido adípico, oxalildihidrazida, dihidrazida succínica, dihidrazida malónica, dihidrazida de ácido etilmalónico, dihidrazida de ácido sebácico, dihidrazida de ácido isoftálico, LDH Ajicure, VDH Ajicure, dihidrazida de ácido maleico y dihidrazida de ácido pimélico. Por ejemplo, el polímero de hidrogel puede comprender ácido hialurónico oxidado entrecruzado por dihidrazida de ácido adípico.

En otra realización de la invención, el ácido hialurónico oxidado entrecruzado del polímero de hidrogel comprende ácidos glucurónicos con C2 o C3 o siendo ambos grupos aldehído.

15 En otra realización de la invención, la dihidrazida entrelaza dos cadenas de ácido hialurónico oxidado a través de C2 y C3 de ácidos glucurónicos del ácido hialurónico oxidado.

20 En otra realización de la invención, el ácido hialurónico oxidado entrecruzado en el polímero de hidrogel comprende ácidos glucurónicos estando C2 o C3 o ambos oxidados.

En otra realización de la invención, la relación en peso entre el ácido hialurónico oxidado y la hidrazida oscila entre 12:1 a 3:1. Sin pretender limitar el alcance de la invención, un ejemplo de la relación en peso entre el ácido hialurónico oxidado y la dihidrazida de ácido adípico es 3:1.

25 En otra realización de la invención, la composición tiene un índice de refracción que varía desde 1,341 hasta 1,345.

En otra realización de la invención, la composición tiene un índice de refracción que oscila desde 1,3420 hasta 1,3442.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de una composición como la mencionada anteriormente, que comprende mezclar una primera solución que comprende ácido hialurónico oxidado con una segunda solución que comprende un dihidrazida para formar una composición que comprende un polímero de hidrogel que comprende: a) el ácido hialurónico oxidado; y b) la dihidrazida, el entrecruzamiento del ácido hialurónico oxidado; en donde el polímero de hidrogel presenta las siguientes propiedades: a) transparente e incoloro; y b) se transforma de un estado líquido en una matriz de gel a 37 °C.

35 En una realización de la invención, la concentración de ácido hialurónico oxidado en la primera solución es mayor al 4%, pero menor al 8% (p/v), y en donde la concentración de dihidrazida en la segunda solución varía de 2 a 8%.

40 En otra realización de la invención, la relación en peso o la concentración del ácido hialurónico oxidado y la dihidrazida en la composición es de 3:1.

En otra realización de la invención, la relación en peso o la concentración de ácido hialurónico oxidado y la dihidrazida de ácido adípico en la composición es de 3:1 a 12:1.

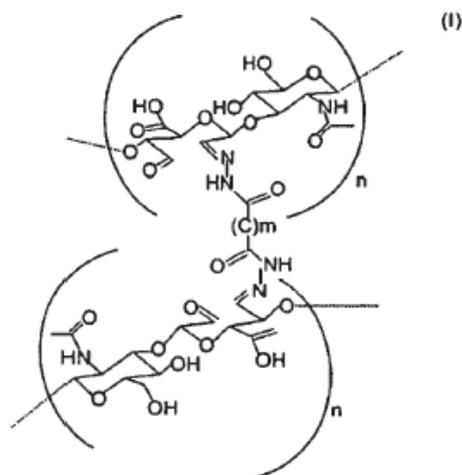
45 En otra realización de la invención, la etapa de mezcla se lleva a cabo a una temperatura que forma un polímero de hidrogel que tiene un tiempo de gelificación de no menos de 5 minutos. La etapa de mezcla puede llevarse a cabo a 4 °C para formar un hidrogel que mantiene un estado de solución durante al menos 5 minutos.

50 Además en otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende: a) ácido hialurónico oxidado; b) una dihidrazida; c) regulador; y d) un prospecto con instrucciones sobre la preparación de una composición como la mencionada anteriormente.

En una realización de la invención, la dihidrazida en el kit mencionado anteriormente es dihidrazida de ácido adípico.

55 Además en otro aspecto, la invención se refiere a un método para reemplazar el vítreo de un ojo, que comprende: a) remover el vítreo de una cavidad vítrea del ojo; b) reemplazar el vítreo con aire; y c) inyectar una cantidad de una composición como la anteriormente mencionada en la cavidad vítrea del ojo, siendo la cantidad de la composición suficiente para reemplazar el aire.

60 Incluso en otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un polímero de hidrogel de la fórmula (I):



en la que m, n son enteros, $m \leq 5$, $100 \leq n \leq 2500$;

y en donde el polímero de hidrogel presenta las siguientes propiedades:

5

transparente e incoloro; y

la transformación de un estado líquido a una matriz de gel a 37°C .

10

En una realización de la invención, $m = 4$.

En otra realización de la invención, n es $\leq 2400, \leq 2300, \leq 2200, \leq 2100, \leq 2000, \leq 1900, \leq 1800, \leq 1700, \leq 1600, \leq 1500, \leq 1400, \leq 1300, \leq 1200, \leq 1100$, o ≤ 1000 .

15

En otra realización de la invención, $n \geq 200, \geq 300, \geq 400, \geq 500, \geq 600, \geq 700, \geq 800$, o ≥ 900 .

En otra realización de la invención, el HA oxidado en el polímero de la composición tiene un grado teórico de oxidación de al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%.

20

En otra realización de la invención, el HA oxidado en la composición tiene un grado experimental de la oxidación de al menos 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%.

En otra realización de la invención, el HA oxidado tiene un grado teórico de oxidación del 100% y/o un grado experimental de oxidación que varía del 20% al 80%.

25

En otra realización de la invención, el HA oxidado en el polímero de la composición tiene un grado de oxidación de al menos 40%, 45%, o 50%.

Ejemplos

30

Sin pretender limitar el alcance de la invención, se presentan a continuación ejemplos de instrumentos, dispositivos, métodos y sus resultados relacionados de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. Obsérvese que los títulos o subtítulos pueden ser utilizados en los ejemplos para comodidad de un lector, que de ningún modo limita el alcance de la invención. Por otra parte, se proponen y describen aquí ciertas teorías; sin embargo, de ninguna manera, ya sean correctas o incorrectas, deben limitar el alcance de la invención siempre y cuando la invención se lleve a cabo de acuerdo con la invención sin tener en cuenta ninguna teoría o esquema de acción particular.

35

Materiales y métodos

40

2.1 Materiales

El ácido hialurónico (peso molecular medio de $3,2 \times 10^5$ Da) se adquirió a través de QP Corporation (Tokio, Japón). El tetraborato de sodio decahidratado (bórax), ter-butil carbazato y dihidrazida de ácido adípico se adquirieron a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). El dietilenglicol, el bromuro de potasio (KBr) y el peryodato de sodio (NaIO_4) se

adquirieron a través de RDH Chemical Co (Spring Valley, CA, EE.UU.). El ácido tricloroacético se adquirió a través de JTB Corporation (Tokio, Japón). El tubo de diálisis (MWCO 6.000 - 8.000) era de Membrane Filtration Products Inc. (Texas, EE.UU.). Las células del epitelio pigmentado de retina humana (células RPE, BCRC 60383) fueron suministradas a través del National Centre for Cell Sciences, Taiwán. El medio de cultivo celular DMDM/F-12, tripsina-EDTA, suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina se adquirieron a través de Gibco (Grand Island, NY, EE.UU.). El Kit II del Ensayo de Proliferación Celular Rápida era de BioVision Inc. (CA, EE.UU.). El ensayo de citotoxicidad no radioactivo CYTOTOX 96® era de Promega Corporation (WI, EE.UU.). El kit de viabilidad de vida/muerte / citotoxicidad para células de mamífero era de Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.).

10 2.2. Preparación de ácido hialurónico oxidado (oxi-HA)

15 El ácido hialurónico (HA) se oxidó mediante peryodato de sodio (NaIO_4) en una solución acuosa a temperatura ambiente durante 24 h. En un vaso de precipitados de 300 ml envuelto con papel de aluminio, se disolvió ácido hialurónico (2,00 g) en agua bidestilada (200 ml), y luego se añadieron diferentes concentraciones de solución de peryodato de sodio en forma gradual mientras se agitaba. La relación molar de NaIO_4 con respecto a HA fue de 1:2, 1:1 y 1:0,5 para lograr diversos grados de oxidación (oxi-HA baja, media y alta). Después de 24 h de agitación, se detuvo la reacción mediante la adición de etilén glicol con agitación adicional durante media hora. La solución resultante se dializó por un tubo de diálisis con un MWCO 6.000 - 8.000 (CelluSep T2 Tubings, Uptima) durante 3 días con agua bidestilada. Se cambió el agua por lo menos tres veces durante el proceso de diálisis. Finalmente, se liofilizó la solución dializada mediante un liofilizador (FDU-1100, EYELA Corp., Tokio, Japón) durante 3 días para producir un producto esponjoso de color blanco, el ácido hialurónico oxidado (oxi-HA). El oxi-HA obtenido se comprimió manualmente en pequeñas bolitas para el análisis FT-IR (JASCO FTIR-4200 con ATR PRO450-S).

25 2.3. Determinación del grado de oxidación

El grado de oxidación de oxi-HA se cuantificó midiendo el número de grupos funcionales aldehído en oxi-HA usando t-butil carbazato (t-BC). Se sabe que los carbazatos reaccionan con aldehídos para formar carbazones estables en una forma similar a la formación de hidrazona. Por lo tanto, el grado de oxidación de oxi-HA se determinó mediante la medición del t-BC residual después de que el exceso de t-BC (25 μl , 30,0 mM en ácido tricloroacético acuoso al 1%) había reaccionado con los grupos funcionales aldehído de oxi-HA (25 μl , 0,6% p/v) durante 24 horas. El t-BC residual se determinó mediante la adición de un exceso de soluciones acuosas de ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) (500 μl , 6,0 mM) y midiendo la absorbancia del complejo (derivado trinitrofenilo) a 340 nm. Se usaron diversas concentraciones de soluciones acuosas de t-BC como patrones para obtener una curva de calibración para identificar carbazatos no reaccionados en las muestras experimentales.

35 2.4. Preparación de hidrogel de oxi-HA/ADH

Se disolvieron en forma separada muestras de oxi-HA con diferentes grados de oxidación en solución reguladora de fosfato (pH 7,4) hasta una concentración final de 6% p/v a temperatura ambiente durante la noche. Las soluciones al 2, 4 y 8% p/v de dihidrazida de ácido adípico (ADH) se prepararon en solución reguladora de fosfato. Se mezcló una solución de oxi-HA (400 μl) con 2, 4 y 8% p/v de soluciones de ADH (100 μl) en un Eppendorf que se sumergió en un baño que contenía agua y hielo (cerca de 0 °C) para formar hidrogeles, hidrogeles de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8, respectivamente.

45 2.5. El índice de refracción de hidrogel de oxi-HA/ADH

Se utilizó un refractómetro (DR-A1 ATAGO, Japón) para medir el índice de refracción (IR) de hidrogeles de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8. En resumen, se trasladó un volumen de una alícuota de la solución de oxi-HA/ADH en estado líquido al prisma del refractómetro con una punta de pipeta. Se incubó el prisma del refractómetro a 37 °C mediante circulación isotérmica de un baño de agua. Después de esperar 10 minutos para la gelificación, se leyó el índice de refracción (IR) del hidrogel en una pantalla digital.

50 2.6. Evaluación reológica del hidrogel de oxi-HA/ADH

55 Se usó un reómetro (HAAKE Rheostress 600, Thermo Fisher Scientific Inc.) con geometría de cono y de placa (1-C35/2 Ti) para evaluar las propiedades reológicas de los hidrogeles de oxi-HA/ADH a la temperatura de conservación de 4 °C y a temperatura corporal de 37 °C. Se usó la temperatura de 4 °C para evaluar el tiempo de operación para el cirujano para mezclar la solución de oxi-HA/ADH y se utilizó 37 °C para evaluar el tiempo de gelificación del hidrogel de oxi-HA/ADH. Se operó el modo de barrido del tiempo de oscilación a 0,1 Hz, 10 Pa y se terminó después de 15 min para determinar el tiempo de gelificación de los hidrogeles de oxi-HA/ADH. Se registraron y analizaron el módulo elástico G' y el módulo de viscosidad G'' mediante el software RheoWin 3.

2.7. Experimentos de degradación *in vitro* del hidrogel de oxi-HA/ADH

Las propiedades de degradación de los hidrogeles de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8 fueron evaluadas mediante la inmersión del hidrogel preformado en PBS que contenía 10.000 unidades/ml de lisozima. Se seleccionó la lisozima para uso en el sistema modelo de degradación debido a que es una enzima ocular que se sabe que ataca a las fracciones de polisacárido. Brevemente, se mezclaron oxi-HA y ADH en solución en un Eppendorf, y se trasladaron inmediatamente 300 µl de la mezcla (solución de oxi-HA/ADH) a un molde cilíndrico y se dejaron gelificar durante 10 min y formar un hidrogel cilíndrico con un diámetro de 0,7 mm y una altura de 0,8 mm. El hidrogel de oxi-HA/ADH con forma cilíndrica se colocó en una placa de cultivo de 24 pozos y se añadieron a cada pozo 3 ml de PBS que contenía lisozima. Se determinó el peso seco del hidrogel inicial (W_{id}) inmediatamente después de la formación del hidrogel. A intervalos regulares, se removieron y se liofilizaron los hidrogeles mediante un liofilizador durante 72 h. Se determinó el peso seco (W_d) de los hidrogeles de oxi-HA/ADH en diferentes instantes de tiempo y se calculó el porcentaje de degradación mediante $[(W_{id} - W_d) / W_{id}]$.

2.8. Experimentos de hinchamiento del hidrogel de oxi-HA/ADH

El índice de hinchamiento de los hidrogeles de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8 se evaluaron bajo las mismas condiciones que los experimentos de degradación *in vitro*. El peso de hidrogel inicial (W_i) se determinó inmediatamente después de que se formó el hidrogel y luego se lo colocó en una placa de cultivo de 24 pozos. A intervalos regulares, se removieron los hidrogeles del PBS que contenía lisozima, se secaron con papel de filtro para remover el agua superficial, se pesaron (W_i) y se retornaron al mismo contenedor (se reemplazó la solución reguladora se reemplazó en cada medición). Se calculó el índice de hinchamiento a partir de la relación entre W_i y W_i .

2.9. Evaluación de la citotoxicidad del hidrogel de oxi-HA/ADH

La evaluación de la citotoxicidad del hidrogel de oxi-HA/ADH se llevó a cabo mediante el ensayo del medio de extracción con una monocapa de células del epitelio pigmentado de retina humana (células del EPR, BCRC 60383, National Centre for Cell Sciences, Taiwán) de acuerdo a las normas ISO. El medio de extracción se preparó por incubación de hidrogeles de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4, y oxi-HA/ADH8 con medio de cultivo estándar (DMEM / F-12) en una relación de extracción de 0,75 cm²/ml durante 72 h a 37 °C. Se analizaron doscientos microlitros del medio de extracción en una monocapa de células del EPR. Las células del RPE se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos con una densidad celular de 5×10^3 células/pozo y se alimentaron con medio de cultivo estándar a 37 °C durante la noche. A continuación, se reemplazó el medio de cultivo estándar con el medio de extracción. Los grupos en el experimento, incluyendo el control (medio de cultivo estándar), el control negativo (medio de extracción de Al₂O₃), el control positivo (medio que contenía Triton X-100 al 0,1%), y los grupos experimentales (medio de extracción de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4, y oxi-HA/ADH8) se ensayaron por hexuplicado ($n = 6$). Después de incubación a 37 °C durante 1 y 3 días, se valoraron cuantitativamente las evaluaciones de viabilidad celular y de citotoxicidad utilizando el Kit II del Ensayo de Proliferación Celular Rápida (BioVision Inc.) y el ensayo de citotoxicidad no radioactiva CYTOTOX 96® (Promega Corporation), por separado. Las células del EPR tratadas con el medio de extracción también se tiñeron con kit de coloración LIVE/DEAD (Molecular Probes # L3224).

El kit II del Ensayo de Proliferación Celular Rápida se utilizó para evaluar la viabilidad celular. Las células se cultivaron durante 1 y 3 días y se descartó luego el medio de cultivo y se lo reemplazó con 0,2 ml de solución de trabajo de tetrazolio-8 soluble en agua (WST-8) en cada pozo. El WST-8 puede ser reducido por la deshidrogenasa en las células vivas para producir un producto de color amarillo (formazán). Después de 2 horas de incubación, se evaluaron cuantitativamente 100 µl de solución de trabajo mediante lectura en un espectrofotómetro a 450 nm. La longitud de onda de referencia fue 650 nm.

Se utilizó el ensayo de citotoxicidad no radioactiva CYTOTOX 96® para evaluar la citotoxicidad. El kit de ensayo mide cuantitativamente la lactato deshidrogenasa (LDH), que es una enzima citosólica estable liberada tras la lisis celular. Después de 1 y 3 días de cultivo, se midieron tanto el medio de cultivo como la lisis celular total mediante la absorbancia a 490 nm de acuerdo con el manual del ensayo. Se evaluó también el medio de extracción (sin incubación con las células del EPR) para servir como fondo. La citotoxicidad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{\text{DO}_{\text{medio de cultivo}} - \text{DO}_{\text{fondo}}}{\text{DO}_{\text{lisis total}} + \text{DO}_{\text{medio de cultivo}} - \text{DO}_{\text{fondo}}} \times 100\%$$

2.10. Estudio preliminar de los animales

Se utilizaron seis ojos de tres conejos blancos de Nueva Zelanda (2,8 - 3,2 kg). Las cirugías se llevaron a cabo bajo anestesia general con inyección intramuscular de ketalar / Chanazina al 2%. Bajo un microscopio quirúrgico, se creó una esclerotomía de aproximadamente 3 mm en los ojos izquierdos con una cuchilla quirúrgica. Se aspiró el cuerpo vítreo

mediante agujas de calibre 18 tanto como fuera posible y se lo reemplazó con aire. Luego se inyectó solución de oxi-HA/ADH en la cavidad vítrea. Después de la cirugía, los ojos fueron tratados con gentamicina (genticina, Roche) como gotas de antibiótico para los ojos y clorhidrato de tetraciclina como ungüento oftálmico 3 veces al día durante 1 semana. El ojo derecho se usó como control sin ningún tipo de cirugía. Se usó una lámpara oftálmica de hendidura de mesa (Topcon Medical Systems, Inc.) para observar y registrar el segmento anterior y el medio ocular. Se midió la presión intraocular (PIO) mediante un tonómetro Schiotz a los 1, 5, 8, 12, 15 días y 3 semanas después de la operación. Se usó Paquimetría Ultrasónica (DGH Technology, Inc.) para medir el espesor central de la córnea. Tres semanas después de la operación, se sacrificaron tres conejos. Se tomaron tanto el ojo derecho (control) como el izquierdo (operado) de estos animales. Se fijaron los ojos con una solución de formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (colorante HE) para observación al microscopio de luz.

2.11. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar. Las diferencias estadísticas entre los grupos se sometieron a pruebas de análisis unidireccional de la varianza (ANOVA). La significación estadística se estableció con antelación para un nivel de probabilidad de 0,05.

3. Resultados

3.1. Caracterización del ácido hialurónico oxidado (oxi-HA)

El ácido hialurónico (HA) se oxidó mediante diferentes concentraciones de peryodato de sodio a temperatura ambiente. La FIG. 1A muestra la reacción química del HA oxidado por NaIO_4 para crear dos grupos funcionales aldehído. Los espectros de FT-IR de polvo de HA (i) y diferentes grados de oxidación de HA oxidado (oxi-HA) (grados bajo, medio y alto de oxidación del oxi-HA; (ii), (iii) y (iv), respectivamente) se muestra en la FIG. 1B. Los picos significativos de grupos funcionales aldehído se pudieron observar en los espectros de FT-IR (ii, iii y iv) a 1725 cm^{-1} y 836 cm^{-1} , cuya intensidad aumentó a medida que aumentaron los grados de oxidación (de ii a iv). Los picos a 1147 cm^{-1} y 895 cm^{-1} en el espectro (i) del polvo de HA estaban relacionados con C-O-C (enlace éter) y C-H. Estos dos picos se desplazaron hasta 1112 cm^{-1} y 875 cm^{-1} , respectivamente, en los espectros de (ii), (iii) y (iv) debido a la formación de grupos funcionales aldehído.

El grado de oxidación de oxi-HA se midió además por titulación de t-BC (ensayo de TNBS) como se describió anteriormente. La Tabla 1 resume los grados de oxidación teóricos calculados a partir de la relación molar de NaIO_4 y HA, y el grado de oxidación obtenido se mide mediante el ensayo de TNBS. Como era de esperar, el grado de oxidación de oxi-HA aumentó de $27,3 \pm 2,3\%$ a $60,4 \pm 2,66\%$ a medida que aumenta la cantidad de NaIO_4 . El oxi-HA con un grado medio de oxidación ($44,3 \pm 4,25\%$) se entrecruzó mediante diversas concentraciones de ADH (2, 4 y 8% p/v) en los siguientes experimentos.

	Oxi-HA bajo	Oxi-HA medio	Oxi-HA alto
Relación molar de HA y NaIO_4	1:0,5	1:1	1:2
Grado de oxidación teórico	50%	100%	100%
Grado de oxidación (%)	$27,30 \pm 2,36$	$44,33 \pm 4,25$	$60,40 \pm 2,66$
Porcentaje de rendimiento (%)	$87,62 \pm 2,94$	$84,04 \pm 5,75$	$87,53 \pm 4,42$

* el grado de oxidación se midió mediante el ensayo de TNBS

3.2. Índice de refracción (IR) del hidrogel de oxi-HA/ADH

Se descubrió que el oxi-HA puede ser entrecruzado con ADH, un entrecruzador bifuncional, para formar hidrogeles sin el uso ningún iniciador químico. La FIG. 2A muestra la reacción de entrecruzamiento que se produjo espontáneamente sin la adición de ningún otro reactivo químico para iniciar la reacción. Grupos funcionales aldehído de oxi-HA reaccionaron con el grupo funcional NH_2 del ADH rápidamente para formar un hidrogel de oxi-HA/ADH incoloro, transparente (FIG. 2B, paneles izquierdo y derecho). El índice de refracción de los hidrogeles de oxi-HA/ADH varió desde 1,3420 hasta 1,3442 a medida que aumentaba la concentración de ADH desde 2% hasta 8% (FIG. 2C), que era similar a aquel del humor vítreo humano ($1,3345 \sim 1,3348$).

3.3. Propiedades reológicas del hidrogel de oxi-HA/ADH

Se realizaron barridos de tiempo oscilatorios para evaluar el comportamiento de gelificación del hidrogel de oxi-HA/ADH. La FIG. 3 muestra el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') del hidrogel de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8 a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y $37\text{ }^\circ\text{C}$. El punto de entrecruzamiento de G' y G'' se define como el punto de gel que indica la formación del gel. El tiempo requerido para que se produzca el punto de gel se denomina a veces como el tiempo de gelificación para las muestras.

La FIG. 3A muestra los resultados reológicos de los hidrogeles de oxi-HA/ADH (oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8) a 4 °C. Estos resultados indican que todos los tipos de hidrogeles de oxi-HA/ADH se puede mantener en estado líquido a 4 °C durante 3 a 8 min dependiendo de la concentración de ADH en el hidrogel. La FIG. 3B muestra los resultados reológicos de los hidrogeles de oxi-HA/ADH a 37 °C. El punto de gel de todos los hidrogeles aparece de 143 a 175 s, lo que indica que los hidrogeles de oxi-HA/ADH comenzaron a transformarse en una matriz de gel en un lapso de 3 minutos a 37 °C. Los resultados de la evaluación reológica de hidrogeles de oxi-HA/ADH se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Hidrogeles	Índice de refracción (nD)	Punto de gel ^a (s)		Tiempo de degradación <i>in vitro</i>
		4°C	37°C	
Oxi-HA / ADH2	1,3420 ± 0,0000	180,3	175,4	2 días
Oxi-HA / ADH4	1,3427 ± 0,0001	202,2	158,7	14 días
Oxi-HA / ADH8	1,3442 ± 0,0001	491,7	143,4	Más de 35 días

^a el punto de gel se definió como el punto de entrecruzamiento de G' y G'' de la medición reológica (G' = G''); el tiempo requerido para que se produzca el punto de gel se denomina como el tiempo de gelificación.

3.4. Degradación *in vitro* e índice de hinchamiento del hidrogel de oxi-HA/ADH

La FIG. 4A muestra la masa restante del hidrogel de oxi-HA/ADH en porcentaje en función del tiempo. Se disolvieron el hidrogel de oxi-HA/ADH2 (◇) y oxi-HA/ADH4 (Δ) completamente en el día 3 y el día 14, respectivamente. En el día 3, el porcentaje en masa restante del hidrogel de oxi-HA/ADH8 (□) era del 86,67 ± 3,54%, que disminuyó gradualmente hasta 61,02 ± 3,13% en el día 35. La FIG. 4B muestra el índice de hinchamiento del oxi-HA entrecruzado con diferentes concentraciones de ADH. El índice de hinchamiento del hidrogel de oxi-HA/ADH2 aumentó con el tiempo hasta que se disolvió completamente el hidrogel (en un lapso de 3 días). El índice de hinchamiento de oxi-HA/ADH4 y de oxi-HA/ADH8 disminuyó ligeramente durante los primeros 3 días y luego mantuvo un valor constante hasta que el hidrogel empezó a degradarse.

3.5 Citotoxicidad del hidrogel de oxi-HA/ADH

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de WST-8 (FIG. 5A). No hubo diferencia significativa entre los grupos experimentales (oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8) en el primer día (p > 4,5). Después de cultivar durante 3 días, los valores de DO₄₅₀ de WST-8 de los grupos de control, oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8 fueron 1,27 ± 0,03, 1,20 ± 0,05, 1,14 ± 0,04 y 0,99 ± 0,06, respectivamente. El medio de extracción de oxi-HA/ADH2 y oxi-HA/ADH4 (p > 0,5) no influyó significativamente en la viabilidad celular de las células del EPR en comparación con el grupo de control y de control negativo. Sin embargo, el medio de extracción de oxi-HA/ADH8 causó una pequeña reducción en la viabilidad celular en comparación con el grupo control (p < 0,001). La citotoxicidad se examinó adicionalmente mediante el ensayo de LDH (FIG. 5B) y mostró que el porcentaje de citotoxicidad de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8 fue de 6,1640 ± 0,5805%, 6,0720 ± 0,3872% y 5,3166 ± 0,9590%, respectivamente. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa entre los grupos de medio de extracción de oxi-HA/ADH en comparación con el grupo control (6,9811 ± 0,6663%, p > 0,5).

La FIG. 6 muestra fotomicrografías de fluorescencia de las células del EPR cultivadas en el medio de extracción de los hidrogeles de oxi-HA/ADH2, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8, respectivamente. El colorante polianiónico calceína-AM puede ser retenido dentro de las células vivas y produce una intensa fluorescencia verde uniforme en las células vivas. Por otro lado, EthD-1 puede entrar en las células con membranas dañadas y producir fluorescencia de color rojo brillante en las células muertas. Los resultados de coloración de células vivas/muertas demostraron que la mayoría de las células cultivadas en diferentes medios de extracción eran viables.

3.6 Estudio preliminar de los animales

La FIG. 7A mostró cambios en la presión intraocular (PIO) después de la operación. La PIO en ojos operados se redujo ligeramente el día 1 después de la operación. Hubo una tendencia creciente en la PIO en el día 5 y el día 8 después de la inyección del hidrogel de oxi-HA/ADH. En los días 12, 15 y 21 después de la operación, la PIO alcanzó un nivel de meseta. No hubo diferencia significativa en la PO entre los ojos operados y los ojos de control durante el período de observación. La FIG. 7B mostró el espesor de la córnea de los ojos operados y de los ojos de control, y no hubo ninguna diferencia significativa en el espesor de la córnea entre los grupos. La FIG. 8A mostró fotografías de los exámenes con lámpara de hendidura de los ojos en el día 21 después de la inyección de oxi-HA/ADH8. La córnea y el cristalino del ojo operado no presentan ningún defecto. Los resultados no mostraron una inflamación considerable u otra enfermedad en el segmento anterior de los ojos examinados 3 semanas después de la cirugía. La FIG. 8B mostró secciones de retina de ojos operados y de control 21 días después de la cirugía. Las capas de la retina eran fácilmente detectadas. No hubo reacción inflamatoria

o infiltración, o cualquier diferencia con los ojos de control.

4. Discusión

5 Cuando un paciente experimenta una cirugía de vitrectomía, se remueve gran parte del humor vítreo de la cavidad vítrea. Debido a que el vítreo natural es incapaz de regenerarse, la cavidad vítrea debe ser llenada con un sustituto vítreo para mantener la retina en su posición y evitar que se desprenda de nuevo. En las pasadas décadas, el desarrollo de sustitutos vítreos ha sido un reto para los investigadores. Se han examinado muchos biopolímeros y compuestos sintéticos en los laboratorios. Sin embargo, no se ha desarrollado hasta el momento un material ideal como sustituto vítreo permanente.

10 El descubrimiento se refiere a un hidrogel incoloro y transparente de oxi-HA/ADH que se puede inyectar en la cavidad vítrea a través de una aguja de calibre 27 y posteriormente se transforma en una sustancia tipo gel. Los grupos funcionales aldehído en oxi-HA fueron creados por NaIO_4 , que escinde los grupos hidroxilo C2-C3 de ácido glucurónico para formar dialdehído, como se caracteriza por FT-IR (picos a 1725 cm^{-1} y 836 cm^{-1} ; FIG. 1B). El dialdehído de oxi-HA puede reaccionar con el grupo hidrazida del ADH para formar redes intermoleculares en hidrogel de oxi-HA/ADH.

15 El índice de refracción es uno de los caracteres ópticos importantes para la aplicación de sustitutos vítreos. Un índice de refracción inapropiado de un sustituto vítreo influirá en la visión de un paciente después de la cirugía de vitrectomía. El taponamiento de gases induce cambios ópticos que son lo suficientemente graves como para limitar temporalmente tanto el examen del fondo de ojo y como la visión del paciente. Los índices de refracción de los sustitutos vítreos actuales (por ejemplo, aceite de silicona, $n_D = 1,40516$; aceite pesado de silicona, $n_D = 1,3008$) difieren de los del cuerpo vítreo natural ($n_D = 1,336$), y se esperan por lo tanto cambios refractivos inducidos en los ojos con taponamiento. El índice de refracción de oxi-HA/ADH8 es de aproximadamente 1,3342, que es bastante similar al del cuerpo vítreo humano. El uso de hidrogel de oxi-HA/ADH8 como sustituto vítreo puede evitar cambios refractivos no deseados después de la vitrectomía.

20 Clínicamente, la inyección a través de una aguja de calibre pequeño es un procedimiento común para el suministro de un sustituto vítreo. El hidrogel de oxi-HA/ADH8 puede inyectarse fácilmente a través de una aguja de calibre 27, como se muestra en la FIG. 2B (panel izquierdo). La facilidad de inyección es un factor importante para los cirujanos y los pacientes oculares. El tiempo de operación debe ser suficiente para que un cirujano ocular inyecte un hidrogel en estado líquido en la cavidad vítrea, y el tiempo de transformación de la solución en gel debe ser tan corto como sea posible para evitar la extrusión del hidrogel. La evaluación reológica mostró que una mezcla de solución de oxi-HA y de solución de ADH puede mantenerse en forma de solución durante unos 8 minutos. Por lo tanto, los cirujanos oculares tienen tiempo suficiente (8 min) para mezclar la solución de ADH y oxi-HA a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y luego transferir la solución mezclada oxi-HA/ADH en una jeringa para la inyección. La forma líquida se puede inyectar y por lo tanto supera las dificultades en la introducción de un sustituto en forma de gel y por lo tanto proporciona un sistema de suministro mínimamente invasivo para un sustituto vítreo al ojo.

30 Para un hidrogel poco entrecruzado (por ejemplo, oxi-HA/ADH2), el índice de hinchamiento aumentó inmediatamente y se disolvió por completo en un lapso de 3 días. Durante este tiempo, el hidrogel experimenta hidrólisis y los enlaces de hidrazona se degradaron casi linealmente con el tiempo. Para hidrogeles con alto entrecruzamiento (por ejemplo, oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8), el índice de hinchamiento disminuye durante los primeros 3 días, seguido de un valor constante y luego aumenta hasta que las redes se disuelven completamente. El aumento en el índice de hinchamiento con el tiempo era una consecuencia de la hidrólisis de los enlaces de hidrazona en la red del hidrogel. Cuando se hidrolizan los enlaces de hidrazona en el hidrogel, la red se hincha y contiene más agua, y luego se disuelve completamente. De acuerdo con los estudios de pérdida de masa, el comportamiento de degradación encontrado en los hidrogeles de oxi-HA/ADH4 y oxi-HA/ADH8 era diferente del observado en los hidrogeles de oxi-HA/ADH2. El hidrogel con mayor contenido de ADH y por lo tanto con mayor número de enlaces de hidrazona, tiende a hidrolizarse más lentamente que con menor contenido de ADH. En los hidrogeles muy entrecruzados, hubo una disminución inicial en la pérdida de masa (5-15%) durante los primeros 3 días, probablemente debido a la hidrólisis de las regiones de hidrogel con baja densidad de entrecruzamiento o de ácido hialurónico no entrecruzado. Esta fase fue seguida por una ligera disminución en la masa durante los próximos días o semanas, probablemente debido a la degradación de las regiones muy entrecruzadas. Finalmente, los enlaces de hidrazona en el hidrogel se hidrolizaron, lo que resultó en una fase de disolución.

40 El hidrogel de oxi-HA/ADH4 mostró un hinchamiento progresivo en 8 - 12 días, lo que significa que los enlaces de hidrazona se hidrolizaron en este momento, y luego fue seguido por una fase de disolución en 14 días. Esto resultó en una disminución de la masa del hidrogel y finalmente una disolución completa del hidrogel. Por otro lado, debido al alto grado de entrecruzamiento oxi-HA/ADH8 alcanzó un índice de hinchamiento constante durante 3 días, y el hidrogel mostró un hinchamiento progresivo durante 30-35 días. Los experimentos de degradación *in vitro* mostraron que sólo el 30-40% del hidrogel de oxi-HA/ADH8 se degrada en presencia de enzimas (PBS que contiene 10.000 unidades/ml de lisozima) y el hidrogel fue estable durante 5 semanas. Clínicamente, el aceite de silicona y los gases son los sustitutos vítreos comunes en la cirugía para unir nuevamente la retina para restablecer el volumen intraocular y manipular desprendimientos de retina. Impiden el paso de fluido a través de las roturas de la retina, mantienen la aposición normal del epitelio del pigmento retina

5 (EPR) - retina normal y mantienen la nueva unión de la retina. La longevidad de los gases está por lo general dentro de unos pocos días a 2 semanas, dependiendo del tipo de gas, el volumen de la burbuja, la concentración inicial y la presión intraocular. A diferencia de los gases intraoculares, que se reabsorben en unas pocas semanas, el hidrogel de oxi-HA/ADH8 puede mantener la matriz del gel por lo menos durante 5 semanas en un ensayo de degradación *in vitro*. Para consideración clínica, la longevidad del hidrogel de oxi-HA/ADH8 debe ser benéfica para la fijación de la retina. Por otra parte, el hidrogel supera los inconvenientes de la posición boca abajo cuando los pacientes se someten a la vitrectomía con gases de taponamiento.

10 Las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) se seleccionaron como células objetivo para las evaluaciones de citotoxicidad, ya que a menudo están expuestas directamente al sustitutivo vítreo que llena el globo ocular después del desprendimiento de retina o de retinectomía local. También se encontró que las células del EPR están asociadas con la re inserción fallida de la retina y la vitreorretinopatía proliferativa (VRP). Los ensayos de viabilidad celular (WST-8) y de citotoxicidad (ensayo de LDH) indican que el hidrogel de oxi-HA/ADH era biocompatible y no tóxico con células de EPR en las evaluaciones *in vitro*. Los productos de degradación del hidrogel son otro motivo de preocupación para la aplicación clínica. De acuerdo con los resultados de las evaluaciones de degradación, el hidrogel de oxi-HA/ADH2 se degradó en 3 días en ambientes acuosos. Esto indica que el hidrogel de oxi-HA/ADH2 se degradada totalmente en el medio de extracción durante el proceso de extracción (37 °C, 72 h) y los productos degradados se cultivaron con células de EPR en la evaluación de citotoxicidad. Según los datos del ensayo de citotoxicidad (FIGS. 5A-5B), no hubo una citotoxicidad significativa en este grupo. Estos resultados indicaron que los productos de degradación del hidrogel de oxi-HA/ADH no fueron citotóxicos para las células del EPR con base en el ensayo WST-8 y de citotoxicidad. Además, la coloración vivo / muerto también demuestra que la mayoría de las células cultivadas a partir de diferentes medios de extracción fueron viables.

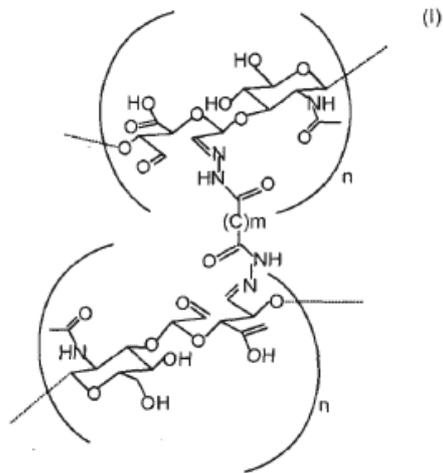
25 El examen con lámpara de hendidura de los ojos inyectados con oxi-HA/ADH8 no reveló hallazgos de inflamación o de opacidad en el segmento ocular anterior durante el período de observación. A mendo ocurre un aumento de la PIO después de la cirugía de vitrectomía. Sin embargo, la PIO de los ojos operados se mantuvo en un nivel normal durante el período de observación. Esto podría ser debido a una ligera disminución en el índice de hinchamiento del hidrogel de oxi-HA/ADH. El examen histológico del tejido retinal tampoco mostró cambios estructurales o de degradación, y tampoco hay una diferencia significativa con respeto a los ojos de control.

30 5. Conclusión

35 Actualmente, aún no se han desarrollado los sustitutos vítreos ideales para aplicaciones clínicas. Muchas investigaciones hacen esfuerzos encaminados al desarrollo de biomateriales apropiados para sustitutos vítreos. La invención se refiere a la síntesis y caracterización de nuevos hidrogeles inyectables a base de ácido hialurónico, oxi-HA/ADH. El hidrogel muestra varias propiedades beneficiosas para su uso como sustituto vítreo, tales como un índice de refracción apropiado, ser inyectable y propiedades de gelificación *in situ* y que no muestran citotoxicidad para las células de EPR. Además, el hidrogel de oxi-HA/ADH8 no fue degradado *in vitro* por la enzima ocular (lisozima) durante 5 semanas. En el estudio preliminar en animales, el hidrogel de oxi-HA/ADH no indujo ninguna complicación grave durante el período de observación.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición para uso como un sustituto vítreo para reemplazar el humor vítreo de un ojo, que comprende un polímero de hidrogel que comprende:
- a) ácido hialurónico oxidado; y
 b) una dihidrazida que se entrecruza con el ácido hialurónico oxidado; en donde el polímero de hidrogel presenta las siguientes propiedades:
- 10 i) transparente e incoloro; y
 ii) se transforma de un estado líquido en una matriz de gel a 37 °C.
- 15 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde la dihidrazida es al menos una escogida a partir de dihidrazida de ácido adípico, oxalildihidrazida, dihidrazida succínica, dihidrazida malónica, dihidrazida de ácido etilmalónico, dihidrazida de ácido sebácico, dihidrazida de ácido isoftálico, LDH Ajicure, VDH Ajicure, dihidrazida de ácido maleico y dihidrazida de ácido pimélico.
3. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la dihidrazida es dihidrazida de ácido adípico.
- 20 4. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el polímero de hidrogel comprende ácido hialurónico oxidado, entrecruzado, teniendo el ácido hialurónico oxidado entrecruzado ácidos glucurónicos con C2 o C3, o siendo ambos grupos aldehído.
- 25 5. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la dihidrazida entrecruza dos cadenas de ácido hialurónico oxidado a través de C2 y C3 de ácidos glucurónicos del ácido hialurónico oxidado.
6. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la relación en peso entre el ácido hialurónico oxidado y la hidrazida en el polímero de hidrogel oscila entre 12:1 hasta 3:1.
- 30 7. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la composición tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,341 a 1,345.
- 35 8. Un método para preparar una composición para uso como la reivindicada en la reivindicación 1, que comprende mezclar una primera solución que comprende ácido hialurónico oxidado con una segunda solución que comprende una dihidrazida para formar la composición para uso.
9. Un kit para uso en la preparación de una composición para uso como la reivindicada en la reivindicación 1, que comprende:
- 40 (a) ácido hialurónico oxidado;
 (b) una dihidrazida;
 (c) regulador; y
 (d) un prospecto con instrucciones sobre la preparación de la composición para uso.
- 45 10. El kit para uso de la reivindicación 9, en donde la dihidrazida es al menos una escogida a partir de dihidrazida de ácido adípico, oxalildihidrazida, dihidrazida succínica, dihidrazida malónica, dihidrazida de ácido etilmalónico, dihidrazida de ácido sebácico, dihidrazida de ácido isoftálico, LDH Ajicure, VDH Ajicure, dihidrazida de ácido maleico y dihidrazida de ácido pimélico.
- 50 11. El kit para uso de la reivindicación 9, en donde la dihidrazida es dihidrazida de ácido adípico.
12. Una composición para uso como la reivindicada en la reivindicación 1 o 2, en donde el polímero de hidrogel exhibe una propiedad de transformarse desde un estado líquido en una matriz de gel en un lapso de 5 minutos a 37 °C.
- 55 13. Una composición para uso como la reivindicada en la reivindicación 7, en donde el polímero de hidrogel exhibe una propiedad de mantener un estado de solución durante al menos 5 minutos a 4 °C.
14. La composición para uso de la reivindicación 1, que comprende un polímero de hidrogel de la fórmula (I):



en donde m, n son enteros, $m \leq 5$, $100 \leq n \leq 2.500$.

- 5 15. La composición para uso de la reivindicación 14, en donde el polímero de hidrogel tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,341 a 1,345, y $m = 4$.

FIG. 1A

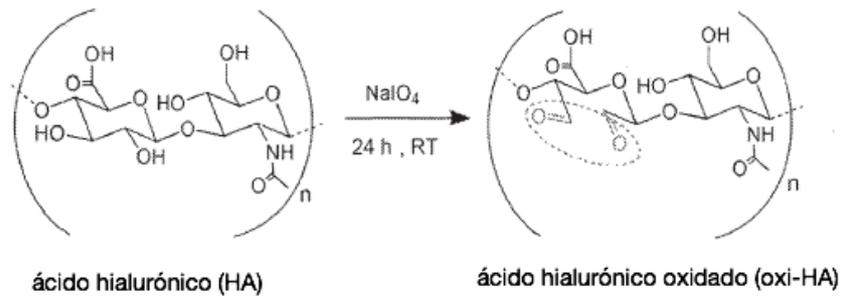
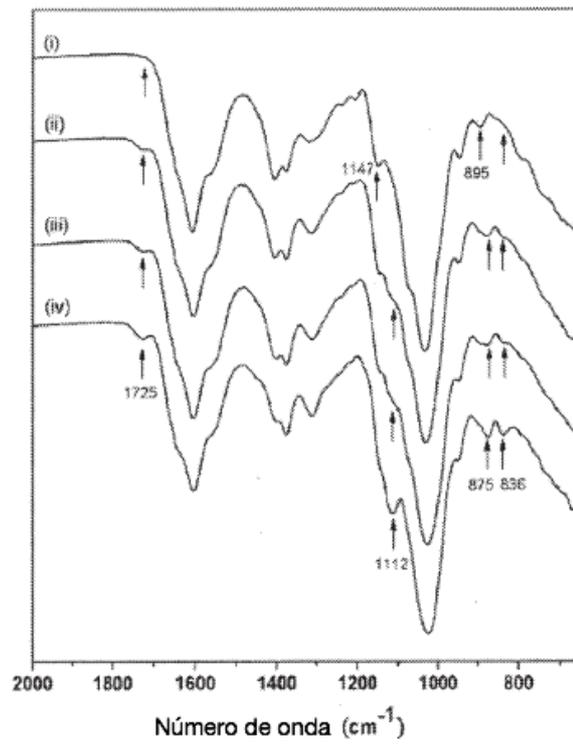


FIG. 1B



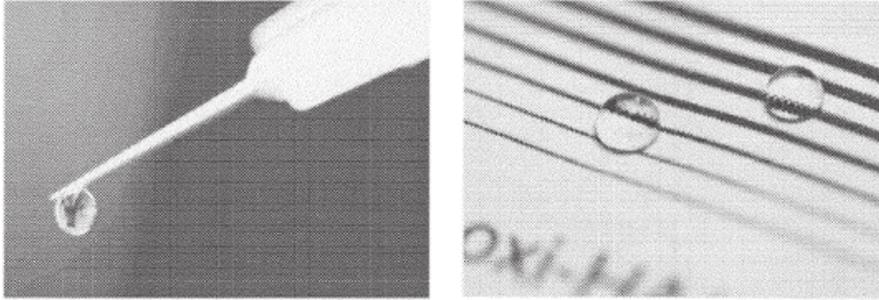


FIG. 2B

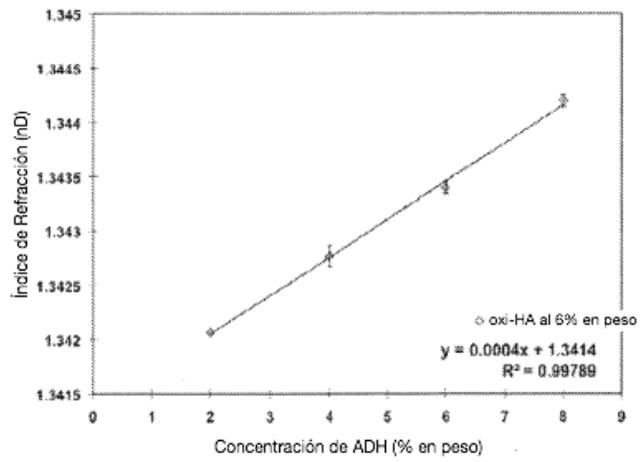
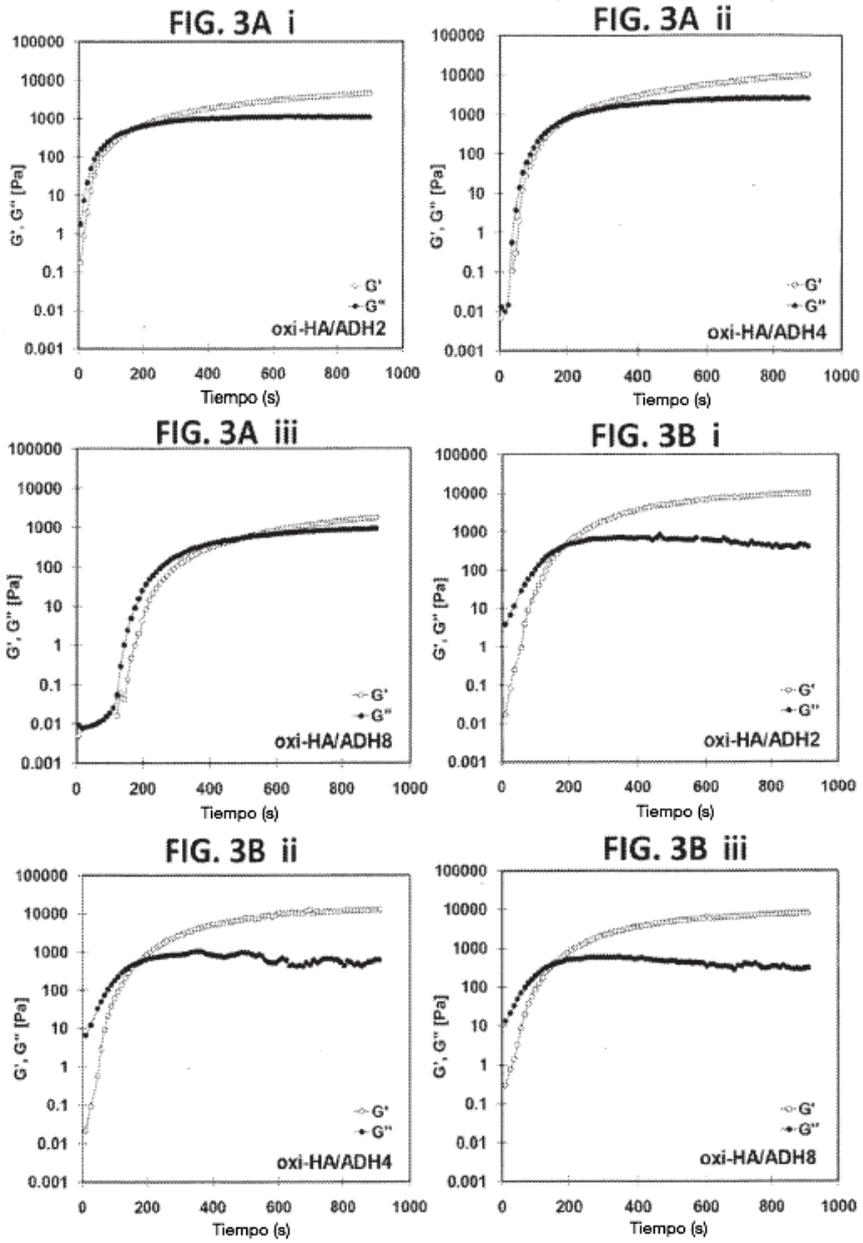
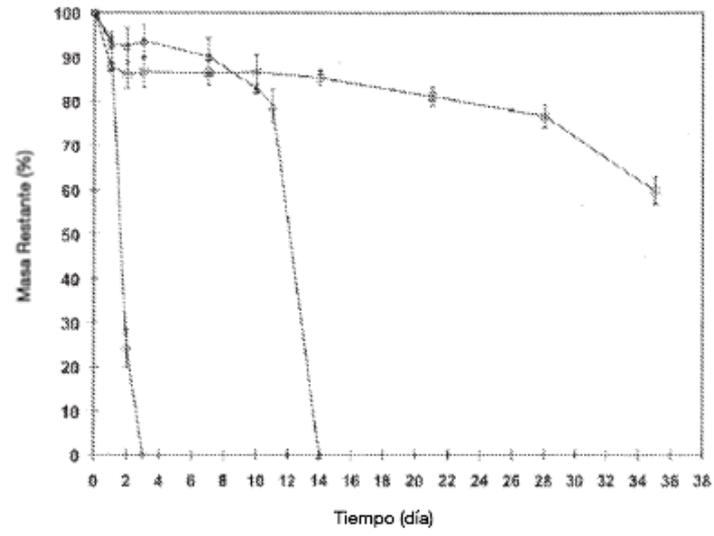


FIG. 2C



A



B

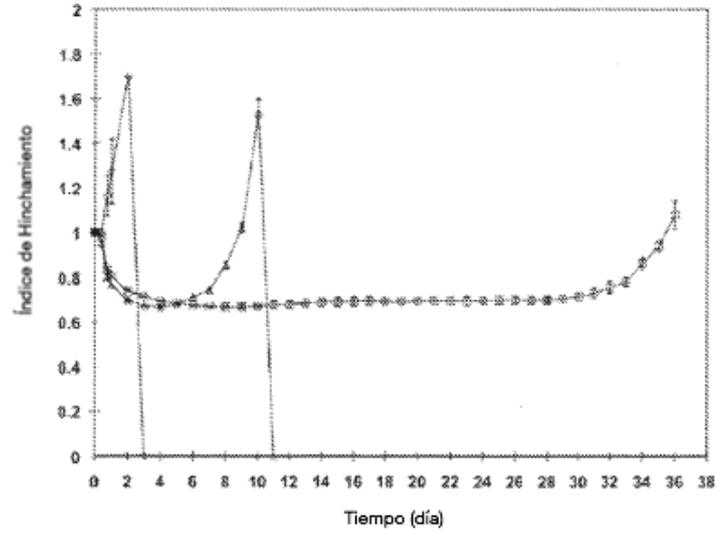


FIG. 4

FIG. 5A

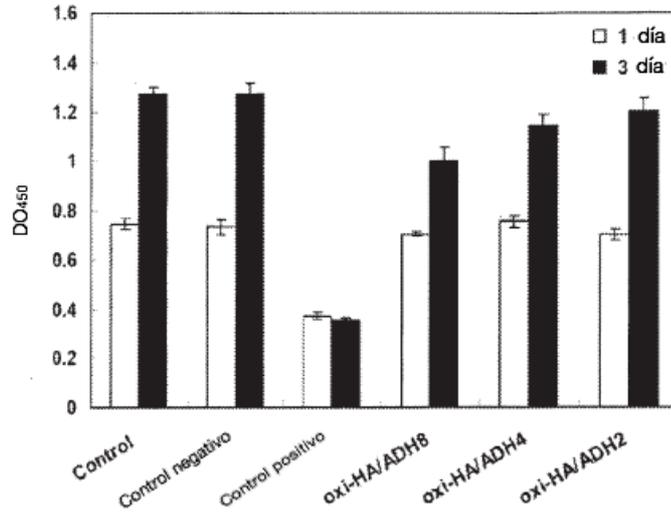
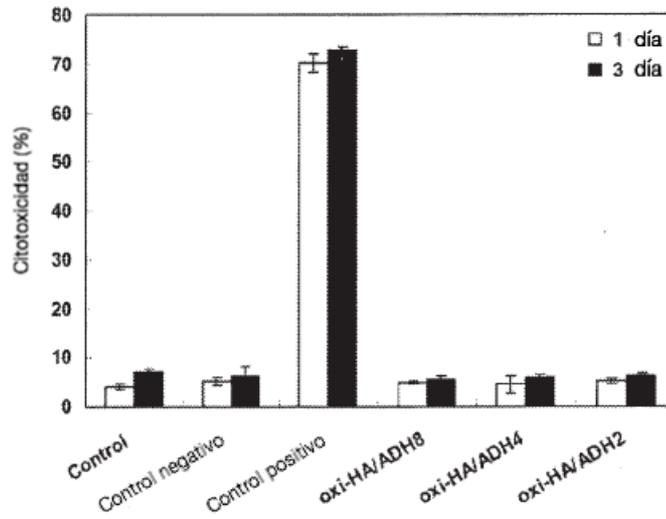


FIG. 5B



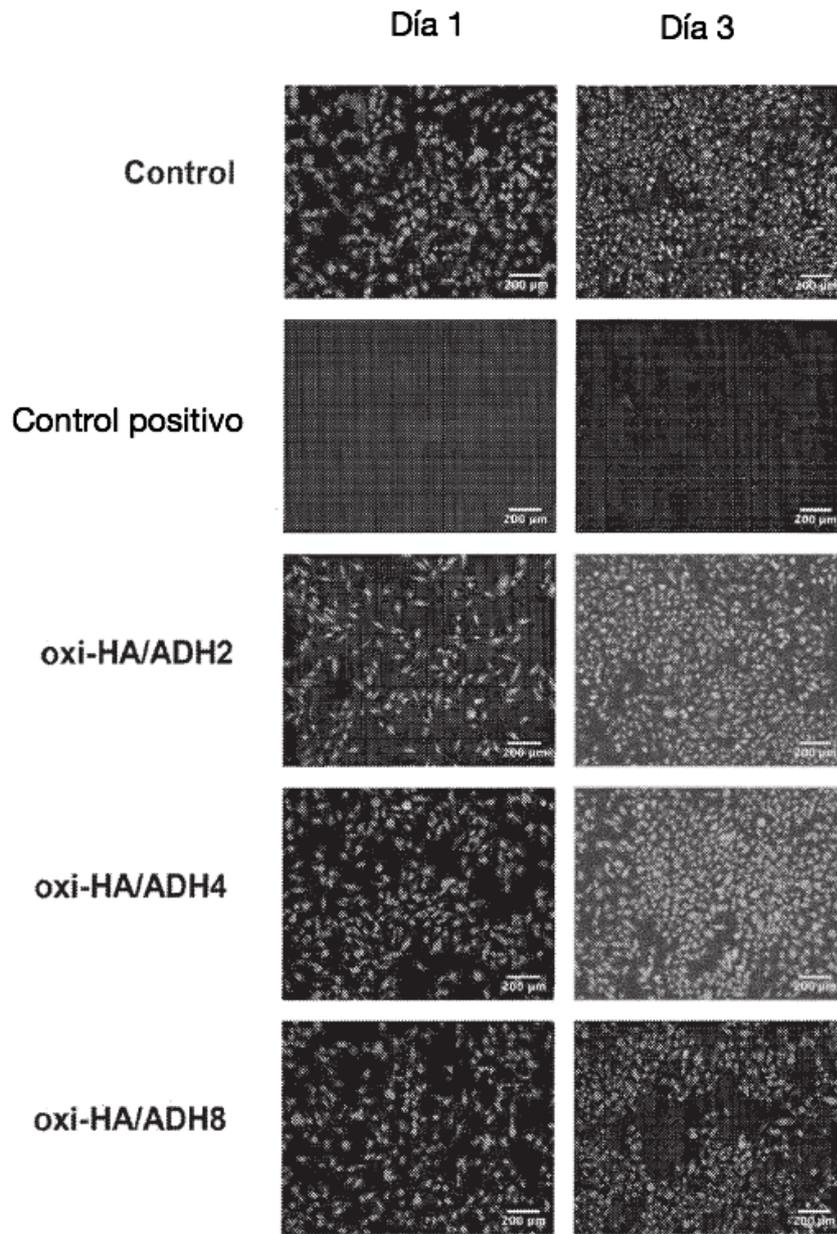


FIG. 6

FIG. 7A

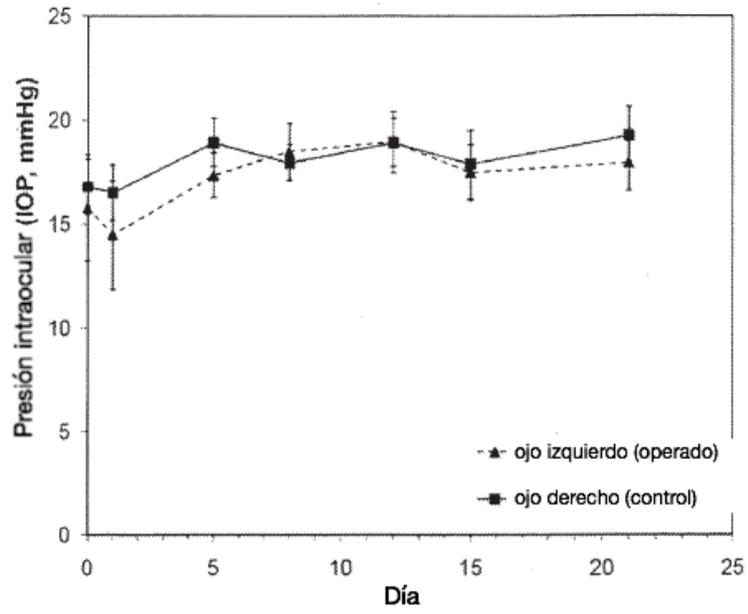
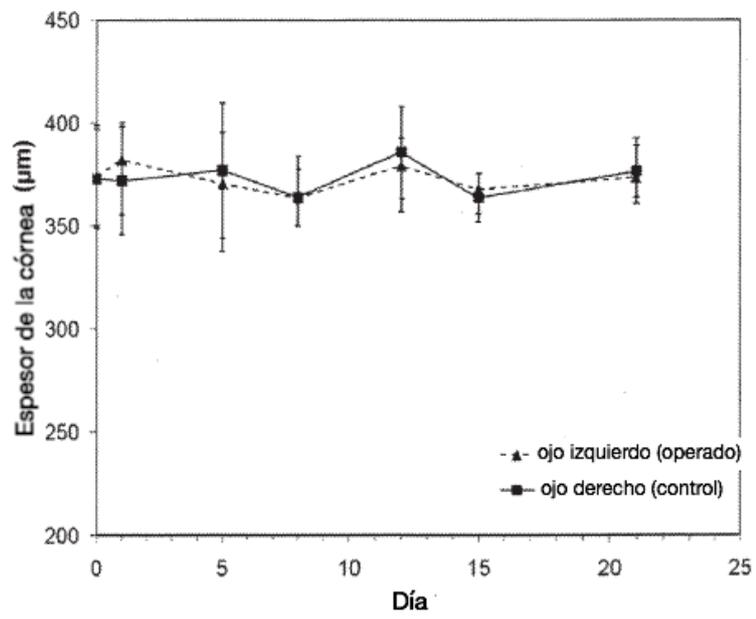


FIG. 7B



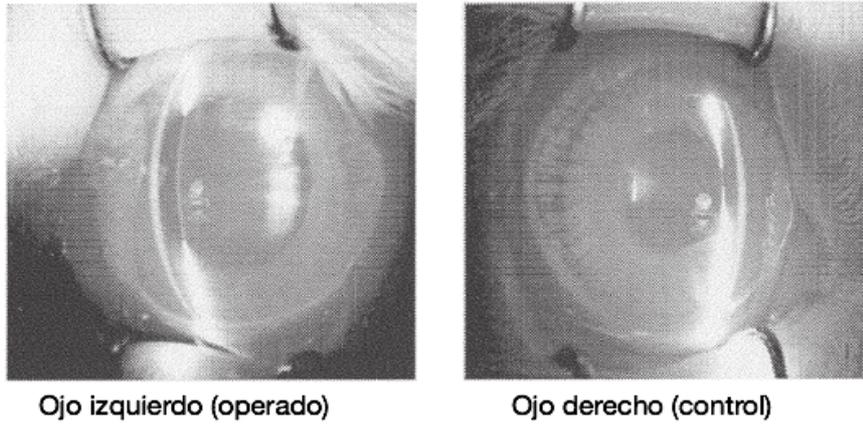


FIG. 8A

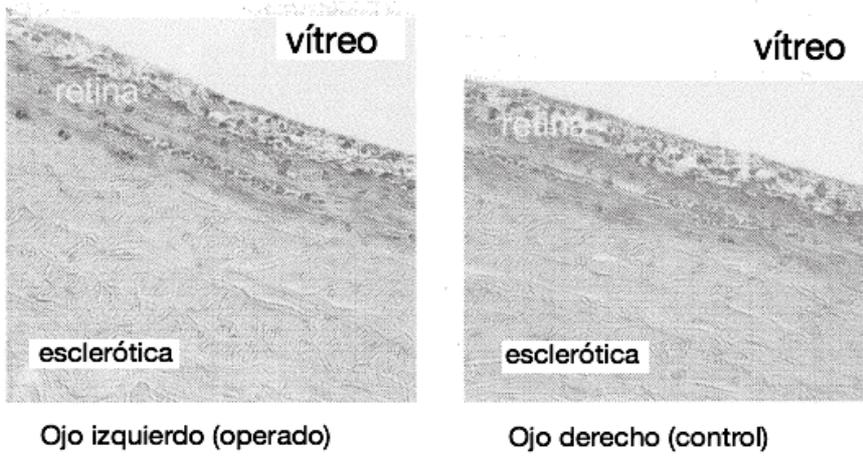


FIG. 8B