

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 933**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/728** (2006.01)

**A61K 31/738** (2006.01)

**A61P 27/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2013 E 13194011 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2737908**

54 Título: **Geles viscoelásticos en cirugía oftálmica**

30 Prioridad:

**30.11.2012 IT PD20120360**

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

**15.06.2015**

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)  
Via Ponte della Fabbrica 3/A  
35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**RENIER, DAVIDE y  
GUARISE, CRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 537 933 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

Geles viscoelásticos en cirugía oftálmica

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a geles viscoelásticos para aplicaciones en cirugía oftálmica.

10

Antecedentes tecnológicos

El humor acuoso es un líquido transparente, producido por el cuerpo ciliar; él humedece las estructuras internas del ojo, las lubrica y nutre parcialmente, y, junto con el humor vítreo, mantiene el globo ocular "hinchado". Después se drena por diversos mecanismos, el más importante de los cuales es el flujo de salida trabecular; la malla trabecular es una estructura esponjosa situada a lo largo de toda la circunferencia del ojo, en el espacio entre la parte más externa de la córnea y la parte más externa del iris.

15

Las otras rutas de drenaje son el flujo uveoescleral y el flujo posterior (resorción a través de un sistema de bomba por el humor vítreo, la retina y el epitelio pigmentario de la retina). Una vez producido, el humor acuoso fluye adentro de la cámara posterior (el espacio entre el iris y los lentes) y desde ahí, a través de la pupila, pasa adentro de la cámara anterior (el espacio entre el iris y la córnea), para alcanzar el ángulo de la cámara y la malla trabecular.

20

El humor vítreo y el humor acuoso contribuyen a generar la tensión interna del ojo y, como el humor vítreo no cambia de volumen en la vida del individuo, las oscilaciones en la presión ocular dependen principalmente del balance entre la producción y el drenaje del humor acuoso. La presión ocular por lo tanto aumenta como un resultado de la producción aumentada y el flujo de salida disminuido del humor acuoso, pero es el último caso el que tiene la mayor importancia clínica.

25

El glaucoma se puede definir como "una enfermedad degenerativa del nervio óptico con un origen multifactorial", porque existen diversas formas de glaucoma. La más común involucra un aumento en la presión intraocular; en otras formas, el factor desencadenante es debilidad en el nervio óptico debido a causas vasculares o estructurales.

30

El nervio óptico consiste de 1,200,000 fibras que salen del globo ocular a través de una abertura circular en el fondo de ojo. En este punto, las fibras se doblan por 90°, y la tensión ocular aumentada puede fácilmente empujarlas y apretarlas hacia los bordes del foramen escleral. La estrangulación de las fibras causa que fallen, y para cada grupo de fibras interrumpidas, un área correspondiente de sensibilidad visual más baja aparece en el campo de visión. El nervio óptico se desgasta desde el interior, y su excavación central se agranda. Cuando la presión ocular alta lleva a la erosión del nervio óptico y la aparición de un campo de visión dañado, el trastorno se llama la enfermedad glaucomatosa o glaucoma.

35

La clasificación de los diversos tipos de glaucoma es compleja, pero se puede hacer una distinción básicamente entre el glaucoma de ángulo cerrado y el glaucoma de ángulo abierto.

40

En el glaucoma de ángulo cerrado, la presión ocular se eleva repentinamente de los valores normales (por debajo de 18 mmHg) a valores muy altos valores (40-50 mmHg y por encima), mientras en el glaucoma de ángulo abierto el aumento en la presión es lento y gradual; en el primer caso, los síntomas son evidentes (dolor en el ojo, ojo rojo y reducida agudeza visual, globo ocular con una textura muy dura, pedregosa), mientras en el segundo, el paciente está prácticamente asintomático.

45

Cuando se trata un ataque agudo de glaucoma, es importante reducir la presión rápidamente con un tratamiento local (por ejemplo con gotas para los ojos que contienen bloqueadores -beta, agonistas alfa-adrenérgico o colinérgico basados en pilocarpina) y el tratamiento sistémico (infusión de manitol) para aliviar la compresión del nervio óptico; además es esencial descongestionar el globo ocular con cortisona y antiinflamatorios.

50

La iridectomía con láser de argón y la iridectomía con láser YAG son tratamientos paraquirúrgicos ambulatorios que abren una brecha en el iris, así crean una ruta alternativa para la circulación del humor acuoso adicional al paso normal a través de foramen pupilar. La trabeculoplastia con láser de argón (ALT) y su variante trabeculoplastia con láser selectivo (SLT) crea agujeros en la malla trabecular para facilitar el paso del humor acuoso a través de dicha malla.

55

Hay dos tipos de tratamiento quirúrgico de glaucoma: cirugía perforante y no-perforante, y operaciones para colocar implantes de drenaje.

60

La cirugía perforante (trabeculectomía) involucra crear una brecha/fístula en la pared del ojo que permita el paso directo del humor acuoso desde la cámara anterior al espacio subconjuntival. Una iridectomía basal se realiza además en la fístula quirúrgica. Este tipo de cirugía muy frecuentemente involucra eventos adversos, que pueden ser serios y su éxito depende de la permeabilidad de la fístula y la creación de una ampolla de filtrado conjuntival. Sin embargo, el proceso

65

de curación excesivo, incorrecto del tejido afectado frecuentemente perjudica el resultado de la operación, y el área esclerótica en que se realiza la operación (específicamente la abertura quirúrgica y el espacio subconjuntival) debe necesariamente pre-tratarse con antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo o mitomicina C (MMC) para reducir la proliferación de fibroblastos y células vasculares, que de otra forma obstruirían la brecha quirúrgica, requiriendo así cirugía adicional (tal como la punción de la ampolla).

El 5-fluoroacilo y la mitomicina-C son potencialmente fármacos anti-tumorales tóxicos; muchas complicaciones post-operatorias se atribuyen a ellos, tales como hipotonía ocular, toxicidad epitelial (del fluorouracilo), toxicidad al cuerpo ciliar (de MMC) y finalmente, un aumento del riesgo de endoftalmitis postoperatoria.

La cirugía no-perforante se usa para aumentar el mecanismo de filtración controlado. La viscocanalostomía se diseña para restaurar el flujo de salida a través de las rutas naturales (el canal de Schlemm, canales colectores y venas episclerales), mientras en la esclerectomía profunda, la filtración además se crea en el espacio subconjuntival. En la cirugía de glaucoma, se usan normalmente sustancias diseñadas para mantener los espacios de filtración permeables; en la trabeculectomía, viscocanalostomía y esclerectomía, polímeros tales como el ácido hialurónico de alto-peso molecular (HA), posiblemente combinado con colágeno, se inyectan, colocados bajo el colgajo escleral para mantener la cámara/ampolla de descompresión permeable, y promover la filtración subconjuntival.

El ácido hialurónico (HA) es un heteropolisacárido que consiste de residuos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Es un polímero de cadena lineal con un peso molecular en el intervalo entre 50,000 y  $13 \times 10^6$  Da, en dependencia de la fuente de la que se obtiene y de los métodos de preparación usados. Está presente en la naturaleza en geles pericelulares, en la sustancia fundamental del tejido conjuntivo de los vertebrados, en el humor vítreo y en el cordón umbilical.

El HA juega una papel importante en los organismos biológicos como soporte estructural y mecánico para los tejidos, y como un componente activo en la fisiología celular de tejidos tales como la piel, los tendones, los músculos y el cartílago.

El HA además juega un papel crucial en el proceso de reparación de tejidos, desde el punto de vista estructural y como una sustancia que estimula / regula una amplia gama de procesos fisiológicos en las que dicho polisacárido está implicado directamente y/o indirectamente. Se conoce que el ácido hialurónico se usa no solamente en la cicatrización del tejido, sino además como un relleno en la cirugía estética de la piel y como un viscosuplemento en el tratamiento de la osteoartritis, porque es inmunológicamente inerte, no tóxico, biodegradable y bioreabsorbible.

Los productos que se encuentran actualmente en el mercado para usar en la cirugía de glaucoma descrita anteriormente se basan en HA no modificado (Healon 5, Pharmacia) y HA reticulado con BDDE (1,4-butanodiol diglicidil éter) (HEALA-flow<sup>®</sup>, ANTEIS, US2010069938). Los dos productos han demostrado igual eficacia cuando se usan y comparan en la cirugía de glaucoma combinada con mitomicina C (MMC) (Foscarini B. y otros, ARVO 2012 Annual Meeting Abstracts).

La presente invención se refiere a geles viscoelásticos para aplicaciones en cirugía oftálmica que comprenden HA reticulado en diferentes formas, para conferir *in vivo* una capacidad antifibrótica y tiempo de descomposición mayores que aquel de los productos de referencia especificados anteriormente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a geles viscoelásticos formados por la mezcla de dos derivados de HA reticulados en formas diferentes pero complementarias (ACP y HBC), previamente conocidos como rellenos para usar en dermatocosmetología (EP2470230), para usar en cirugía oftálmica, particularmente en todos los tipos de cirugía de glaucoma, ya sea perforante o no-perforante, en la técnica llamada "la punción de la ampolla" (lo cual es necesario en el caso de fibrosis post-quirúrgica), o para la colocación de los implantes de drenaje.

Los geles viscoelásticos de la invención garantizan:

- la permeabilidad de los canales de drenaje y la ampolla de filtración de humor acuoso llenados quirúrgicamente por dichos geles, ya que sus tiempos de degradación *in vivo* probaron ser muy largos, y más largos que aquellos de los geles de HA reticulados con BDDE comparativos;
- la función de filtración correcta de dichos canales y ampolla de filtración, ya que los geles que resultan de mezclar dichos derivados de HA son geles viscoelástico de una sola fase cuyas características reológicas el Solicitante demuestra más abajo, y que son completamente comparables a aquellos de los productos basados en HA reticulado con 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) usados en la cirugía de glaucoma;
- una reducción en la fibrosis del área esclerótica sometida a cirugía oftálmica, particularmente colateral a la cirugía de glaucoma, ya que ellos reducen significativamente (en comparación con geles HA reticulado con BDDE) la proliferación de las células en el área esclerótica afectada, pero sin ser citotóxicos, lo que permite al cirujano usar dicho geles sin tratar simultáneamente la zona quirúrgica con fármacos antiproliferativos, o en

cualquier caso permite reducirlos en las formas y por las cantidades necesarias para lograr el resultado deseado.

Dichos geles viscoelásticos (como se describe en EP2470230) están formados por:

- ácido hialurónico autoreticulado (ACP) mezclado con
- ácido hialurónico reticulado con BDDE (HBC).

El ACP usado en la presente invención, preparado como se describe en EP0341745, tiene un grado promedio de reticulación en el intervalo de 4 hasta 5%, y se prepara preferentemente con HA que tiene un promedio ponderado de peso molecular (MW) de 200 KDa. Cuando se hidrata, se presenta como un gel autoreticulado, sin moléculas extrañas para el polisacárido nativo, ya que está basado en el enlace éster entre los grupos carboxilo e hidroxilo de la misma cadena de polisacárido y/o de las cadenas adyacentes. Por lo tanto carece de inmunotoxicidad, es tan biocompatible como el HA nativo, altamente hidratante, y fácilmente degradable por hialuronidasa.

A la inversa, el HA reticulado con BDDE (una molécula que contiene grupos epoxi para la formación de éteres en los hidroxilos primarios de HA) contiene la molécula de reticulación, y por lo tanto es más resistente a la degradación enzimática ya que posee enlaces éter que estabilizan el polisacárido, lo que da al producto obtenido un largo tiempo de permanencia *in situ*.

El HBC de acuerdo con la invención tiene una relación molar BDDE/HA que cae en el intervalo de 2 hasta 7 moles de BDDE por 100 moles (2% - 7% moles/mol) del dímero de HA (es decir ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina), preferentemente desde 4% hasta 5% moles/mol del dímero, y se prepara como se describe en EP2470230 (preferentemente de acuerdo con el proceso de preparación B) y Ejemplos 1-3.

El HA usado en la presente invención para preparar los derivados descritos anteriormente preferentemente toma la forma de sales de sodio, se puede obtener de cualquier fuente, tales como la extracción a partir de crestas de gallo (EP0138572) o fermentación (por ejemplo a partir de *Streptococcus equi*, como se conoce por los expertos), o por medios tecnológicos (por ejemplo a partir de *Bacillus*, WO2012/032154), y tiene un promedio ponderado de peso molecular (MW) (determinado por el método del Número de viscosidad límite: Terbojevich y otros, Carbohydrate Research, 1986, 149:363-377) en el intervalo de 400 hasta  $3 \times 10^6$  Da, preferentemente desde  $1 \times 10^5$  Da hasta  $1 \times 10^6$  Da, con la máxima preferencia desde 200,000 hasta 750,000 Da.

La cantidad total de HA presente en los geles de la invención, en la forma de ambos ACP y HBC, puede estar en el intervalo de 10 hasta 40 mg/ml, preferentemente desde 20 hasta 30 mg/ml, preparados en la forma de un gel viscoelástico con portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables (tales como salina y soluciones fisiológicas que consisten de NaCl y/o sales fosfato; dichos geles son consecuentemente hidrogeles), ya que ellos mantienen la osmolaridad y el valor de pH deseados (generalmente entre 5.5 y 7).

La naturaleza químicamente heterogénea del gel viscoelástico (ACP+HBC) permite modular las propiedades del producto final por la variación adecuada de la relación de peso entre los integrantes. Los dos HAs se pueden mezclar en una relación de peso ACP:HBC en el intervalo de 5:95 hasta 50:50, preferentemente desde 5:95 hasta 25:75, con mayor preferencia puede ser 25:75 de ACP:HBC; la relación de peso se seleccionará de acuerdo con la viscosidad final deseada, que dependerá del tipo de cirugía oftálmica realizada.

La mezcla de los dos sustancias reticuladas lleva a la formación de un gel viscoelástico de una sola fase, con características de biocompatibilidad comparable con aquella del ácido hialurónico nativo, pero con una biodegradabilidad diferente de forma que, cuando se implantan *in vivo*, su tiempo de permanencia *in situ* es mucho más largo que aquel del HA no modificado o los geles formados por el HA reticulado con BDDE usados actualmente en cirugía oftálmica, como se muestra en la Figura 1 de la presente invención, y como se describe y demuestra en EP2470230.

Como se planteó previamente, el éxito de la cirugía de glaucoma (ya sea perforante o no-perforante) se debe al hecho de que limita la fibrosis del área esclerótica y conjuntiva, y mantiene la permeabilidad (y consecuentemente la capacidad de filtración) de las rutas de filtración y de la ampolla de filtración/descompresión creada en la esclerótica y/o en el espacio subconjuntival.

El uso de geles basado en HA reticulado actualmente contribuye al éxito quirúrgico, pero la aplicación del HA reticulado con BDDE (HEALA-*flow*<sup>®</sup>) no ha probado ser útil en limitar/reducir significativamente la administración de MMC durante la cirugía de glaucoma (Roy S. y otros, Eur J Ophthalmol, 2012, 22(1):70).

El Solicitante perfeccionó el uso del gel viscoelástico de una sola fase/hidrogel ACP:HBC para usar en cirugía oftálmica, particularmente en cirugía de glaucoma, porque (como se demuestra en las Figuras 2 y 3 más abajo) descubrió que dicho gel tiene un efecto significativo (comparado con geles basados en HA y BDDE usados como controles) en reducir la fibrosis después de ambas cirugías de glaucoma perforante y no-perforante, y está completamente desprovisto de

citotoxicidad (como se indica por la Figura 4), permitiendo así la eliminación del tratamiento con anti-metabolitos (o al menos limitarlo).

5 Este resultado es particularmente importante en vista de las conocidas complicaciones post-operatorias asociadas con el uso de antimetabolitos (como se describió anteriormente), porque el uso de los geles produce la misma eficacia anti-fibrosis que dichos medicamentos, sin sus efectos tóxicos.

10 Finalmente, el Ejemplo 14 más abajo muestra que los geles viscoelásticos de una sola fase de la invención garantizan la correcta función de filtración de los canales tratados, ya que ellos tienen características reológicas completamente comparables con aquellas de los productos basados en HA reticulado con BDDE actualmente en el mercado.

15 La presente invención por lo tanto reivindica los geles viscoelásticos de una sola fase/hidrogeles formados por ácido hialurónico autoreticulado (ACP) mezclado con ácido hialurónico reticulado con BDDE (HBC) en una relación de peso ACP:HBC en el intervalo de 5:95 hasta 50:50, preferentemente desde 5:95 hasta 25:75, con la mayor preferencia una relación de peso ACP:HBC de 25:75, para usar como geles anti-fibrosis para aplicaciones en cirugía oftálmica, particularmente en todos los tipos de cirugía de glaucoma (ambas perforante y no-perforante), en la técnica conocida como "punción de la ampolla" o para la colocación de implantes de drenaje.

20 La presente invención por lo tanto se refiere a una composición farmacéutica que contiene geles viscoelásticos de una sola fase/hidrogeles formados por ácido hialurónico autoreticulado (ACP) mezclado con ácido hialurónico reticulado con BDDE (HBC) en una relación de peso ACP:HBC en el intervalo de 5:95 hasta 50:50, preferentemente desde 5:95 hasta 25:75, con la mayor preferencia una relación de peso ACP:HBC de 25:75, que contiene portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, para usar como composiciones anti-fibrosis para aplicaciones en cirugía oftálmica, particularmente para aplicaciones en cirugía de glaucoma, opcionalmente combinados con antiinflamatorios, antibióticos, antimetabolitos, anestésicos locales, o fármacos capaces de normalizar la presión ocular.

25 Algunos ejemplos de preparaciones de geles viscoelásticos de la invención se exponen más abajo:

30 Ejemplo 1: Síntesis de HBC (4.5%) 25 mg/ml

0.01 moles de sales de sodio de HA con un promedio ponderado MW en el intervalo de 500 hasta 750 KDa se dispersaron en 30 ml de 0.25M NaOH que contenía 0.196 ml de BDDE (10% en moles comparado con el dímero GlcUA - GlcNAc). La mezcla se calentó a 42°C y se dejó reaccionar por 4.5 horas. El gel resultante después se hidrató a temperatura ambiente por 24 horas con 75 ml de HCl 0.1M y 55 ml de agua que contiene 1.0 g de NaCl, y el pH se ajustó a 5-6 con HCl 0.1M. Después de agitar, se produjo un gel homogéneo (volumen final: 160 ml), y se analizó por NMR. La Figura 5 muestra el espectro de <sup>1</sup>H NMR (Bruker Advance 300 MHz) en DMSO-d<sub>6</sub>, procesado con el software XWinNMR. Resultado: 4.5% moles/mol de BDDE por dímero GlcUA - GlcNAc (1/16,521x3H/4H x 100).

40 Ejemplo 2: Síntesis de HBC (2.4%) 25 mg/ml

0.01 moles de sales de sodio de HA con un promedio ponderado MW en el intervalo de 500 hasta 750 KDa se dispersaron en 30 ml de NaOH 0.25M que contenía 0.098 ml de BDDE (5% en moles comparado con el dímero GlcUA - GlcNAc). La mezcla se calentó a 42°C y se dejó reaccionar por 4.5 horas. El gel resultante después se hidrató a temperatura ambiente por 24 horas con 75 ml de HCl 0.1M y 55 ml de agua que contiene 1.0 g de NaCl, y el pH se ajustó a 5-6 con HCl 0.1M. Después de agitar, se produjo un gel homogéneo (volumen final: 160 ml), y se analizó por NMR. La Figura 6 muestra el espectro de <sup>1</sup>H NMR (Bruker Advance 300 MHz) en DMSO-d<sub>6</sub>, procesado con el software XWinNMR. Resultado: 2.4% moles/mol de BDDE por dímero GlcUA - GlcNAc (/4H x 100).

50 Ejemplo 3: Síntesis de HBC (6.18%) 25 mg/ml

0.01 moles de sales de sodio de HA con un promedio ponderado MW en el intervalo de 500 hasta 750 KDa se dispersaron en 30 ml de NaOH 0.25M que contenía 0.294 ml de BDDE 15% en moles comparado con el dímero GlcUA - GlcNAc). La mezcla se calentó a 42°C y se dejó reaccionar por 5 horas. El gel resultante después se hidrató a temperatura ambiente por 24 horas con 75 ml de HCl 0.1M y 55 ml de agua que contiene 1.0 g de NaCl, y el pH se ajustó a 5-6 con HCl 0.1M. Después de agitar, se produjo un gel homogéneo (volumen final: 160 ml), y se analizó por NMR. La Figura 7 muestra el espectro de <sup>1</sup>H NMR (Bruker Advance 300 MHz) en DMSO-d<sub>6</sub>. Procesado con el software XWinNMR. Resultado: 6.18% moles/mol de BDDE por dímero GlcUA - GlcNAc (/4H x 100).

60 Ejemplo 4: Preparación del gel ACP

6.5 gramos (10 milimoles) de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico, preparada a partir de sal de sodio de HA como se describe en EP216453, se solubilizaron en 260 ml de N-metil-2-pirrolidona (NMP) a temperatura ambiente. 1.4 ml (10 milimoles) de trietilamina se añadieron, y la solución resultante se agitó por 30 minutos. Se añadieron 0.256 gramos de yoduro de 2-cloro-1-metil-piridinio (CMPJ), iguales a 10% de los moles iniciales de HA, disueltos en 2.5 ml de NMP. La solución se mantuvo bajo agitación por 4 horas a temperatura ambiente, después se mezcló con una solución

salina 2.5% de NaCl en agua (p/l). La mezcla resultante se vertió lentamente en 750 ml de etanol 95% y se mantuvo bajo agitación continua. El precipitado formado se filtró y se lavó tres veces con 100 ml de etanol/agua (9:1 relación), y dos veces más con 100 ml de acetona, y finalmente se secó bajo alto vacío por 24 horas a 30°C. Así se obtuvieron 3.9 gm del producto deseado, con reticulación de 4.5-5%.

5

Ejemplo 5: Preparación del gel ACP:HBC en la relación 25:75, con una concentración total de HA de 25 mg/ml

10

0.0033 moles de polvo de ACP, preparado como en el Ejemplo 4, se hincharon durante la noche en 53 ml de solución salina. Ellos después se mezclaron con 160 ml de HBC (4.5%) 25 mg/ml preparados como se describe en el Ejemplo 1, por 3 horas a temperatura ambiente, y el gel homogéneo así obtenido se filtró a través de cartuchos de 100  $\mu\text{m}$ . Finalmente, las muestras así preparadas se distribuyeron en jeringas de cristal de 1 ml y se esterilizaron en la autoclave con un ciclo de F0=13 a 121.5°C. El gel resultante es un gel de una sola fase con una viscosidad de cizallamiento cero de 2418 Pas.

15

El análisis se llevó a cabo en un reómetro Thermo Haake Mars II a 25°C por medio del uso de un cono/placa (placa de 6 cm de diámetro y 1° de ángulo), que rota desde 1000 hasta 0.0005  $\text{s}^{-1}$ . El BDDE residual fue menos de 2 ppm (el análisis se llevó a cabo por GC contra un estándar).

20

Ejemplo 6: Preparación del gel ACP:HBC en la relación 50:50, con una concentración total de HA de 25 mg/ml

25

0.0033 moles de polvo de ACP, preparado como en el Ejemplo 4, se hincharon durante la noche en 53 ml de solución salina. El ACP después se mezcló con 53 ml de HBC (4.5%) 25 mg/ml preparado como se describe en el Ejemplo 1, por 3 horas a temperatura ambiente, y el gel homogéneo así obtenido se filtró a través de cartuchos de 100  $\mu\text{m}$ . Finalmente, la muestra distribuida en jeringas de cristal de 1 ml, se esterilizó en la autoclave con un ciclo de F0=13 a 121.5°C. El producto obtenido es un gel de una sola fase con un contenido de BDDE de menos de 2 ppm (el análisis se llevó a cabo por GC contra un estándar).

30

Ejemplo 7: Preparación del gel ACP:HBC en la relación 5:95, con una concentración total de HA de 25 mg/ml

35

0.00052 moles de polvo de ACP, preparado como en el Ejemplo 4, se hincharon durante la noche en 8.4 ml de solución salina. El ACP después se mezcló con 160 ml de HBC (4.5%) 25 mg/ml preparados como se describe en el Ejemplo 1, por 3 horas a temperatura ambiente, y el gel homogéneo así obtenido se filtró a través de cartuchos de 100  $\mu\text{m}$ . Finalmente, la muestra distribuida en jeringas de cristal de 1 ml, se esterilizaron en la autoclave con un ciclo de F0=13 a 121.5°C. La preparación obtenida es un gel de una sola fase con una viscosidad de cizallamiento cero de 3566 Sbp (el análisis se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 5), y un contenido BDDE de menos de 2 ppm (el análisis se llevó a cabo por GC contra un estándar).

40

Ejemplo 8: Preparación del gel ACP:HBC en la relación 5:95, con una concentración total de HA de 25 mg/ml

45

0.00052 moles de polvo de ACP, preparado como en el Ejemplo 4, se hincharon durante la noche en 8.4 ml de solución salina. El ACP después se mezcló con 160 ml de HBC (6.18%) 25 mg/ml preparados como se describe en el Ejemplo 3, por 3 horas a temperatura ambiente, y el gel homogéneo así obtenido se filtró a través de cartuchos de 100  $\mu\text{m}$ . Finalmente, la muestra, distribuida en jeringas de cristal de 1 ml, se esterilizó en la autoclave con un ciclo de F0=13 a 121.5°C. El producto obtenido es un gel de una sola fase con un contenido de BDDE de menos de 2 ppm (el análisis se llevó a cabo por GC contra un estándar).

50

Ejemplo 9: Preparación del gel ACP:HBC en la relación 5:95, con una concentración total de HA de 15 mg/ml

55

96 ml de HBC (4.5%) 25 mg/ml, preparado como se describió en el Ejemplo 1, se mezclaron con 64 ml de salina durante la noche a temperatura ambiente, hasta que se obtuvieron 160 ml de un gel a la concentración de HA de 15mg/ml. 0.00031 moles de polvo de ACP, preparado como en el Ejemplo 4, se hincharon durante la noche en 8.4 ml de solución salina. El ACP después se mezcló por 3 horas a temperatura ambiente con 160 ml de dicho HBC, y el gel homogéneo así obtenido se filtró a través de un cartucho de 100  $\mu\text{m}$ . Finalmente, la muestra, distribuida en jeringas de cristal de 1 ml, se esterilizó en la autoclave con un ciclo de F0=13 a 121.5°C. El producto obtenido es un gel de una sola fase con un contenido de BDDE de menos de 2 ppm (el análisis se llevó a cabo por GC contra un estándar).

60

Ejemplo 10: Preparación del gel ACP:HBC (6.18%) en la relación 5:95, concentración total de HA 25 mg/ml, con 3 mg/ml de lidocaína, en amortiguador fosfato pH 7.0

65

0.005 moles de sales de sodio de HA con un promedio ponderado MW en el intervalo de 500 hasta 750 KDa se dispersaron en 15 ml de NaOH 0.25M que contenía 0.147 ml de BDDE (15% en moles comparado con el dímero GlcUA - GlcNAc). La mezcla se calentó a 42°C y se dejó reaccionar por 4.5 horas. El gel después se hidrató a temperatura ambiente por 24 horas con 37 ml de HCl 0.1M y 28 ml de H<sub>2</sub>O que contenía 0.27 gm de cloruro de lidocaína, 0.47 gm de NaCl, 0.042 gm de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O y 0.0076 mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, se ajustó el pH a 5-6 con HCl 0.1M. Después de agitar, el gel homogéneo (con un volumen final de 80 ml) así obtenido se mezcló con 4.2 ml del gel de ACP (obtenido

5 por hinchar 0.00025 moles de polvo de ACP, preparado como se describe en el Ejemplo 4, en 4.2 ml de H<sub>2</sub>O por 10 horas), y se dejó a 70°C por 7 horas para eliminar el contenido de BDDE. El producto así preparado después se mezcló, filtró a través de cartuchos de 100 µm y finalmente se distribuyó en jeringas de 1 ml y se esterilizó en la autoclave con un ciclo de F0=13 a 121.5°C. La muestra final es un gel viscoelástico de una sola fase con un contenido de BDDE de menos que 2 ppm (el análisis se llevó a cabo por GC contra un estándar).

Ejemplo 11

10 Prueba de irritación del ojo de acuerdo con las directrices (ISO 10993-10) sobre dos productos de HA reticulados con BDDE mezclado con ACP, tales como:

1. ACP:HBC en la relación 25:75 preparado en salina, como se describe en el Ejemplo 5;
2. ACP:HBC en la relación 5:95 preparado en amortiguador fosfato pH 7.0, como se describe en el Ejemplo 10.

15 La prueba de irritación del ojo se llevó a cabo en los Laboratorios del Centro de Pruebas PRIMM srl (Dosson di Casier (TV), Italia), por la administración ocular de dichos 2 productos, cada producto se evalúa en 3 animales.

20 La prueba se realizó en conejos de laboratorio NZW (el conejo NZW se considera el modelo animal más adecuado para la administración intraconjuntiva del producto con acción ocular).

Los dos productos de prueba se administraron intraconjuntivamente; el ojo de los animales tratados se examinó una hora después de la administración y 24, 48 y 72 horas después de eso, y se comparó el ojo contralateral no tratado que actuó como control de referencia.

25 Las observaciones llevadas a cabo fueron:

- a) estado clínico de la conjuntiva,
- b) estado clínico del iris y la córnea.

30 Resultados: Para cada animal y cada período de observación, las evaluaciones llevadas a cabo dieron una indicación macroscópica de tolerabilidad clínica excelente, y no indicaron ninguna diferencia del control no tratado.

Ejemplo 12: Relleno cutáneo y tiempo de permanencia del gel ACP:HBC en el modelo de administración intradérmica en el conejo.

35 El propósito del experimento fue evaluar el relleno cutáneo y el tiempo de permanencia *totalin situ* determinado por el gel ACP:HBC preparado como se describió en el Ejemplo 5, inyectado en el tejido intradérmico del conejo, por comparación con el gel de referencia que consiste de HA reticulado con iguales cantidades de BDDE (gel control).

40 Para dicha evaluación, los geles probados se administraron intradérmicamente a conejos machos NZW-KBL que pesaban 1.8-2.3 kg.

Diseño del experimento

45 Los animales se anestesiaron por administración intravenosa de ketamina y xilazina. 3 animales se usaron para cada muestra probada.

Día 0: T0

- 50
- Inyección de las muestras (1 ml de gel por muestra) después de afeitar la espalda de los conejos;
  - Medición del hinchamiento en todos los conejos y observaciones macroscópicas para eventos adversos.

Día 28 y 85: T28 y T85

- 55
- Medición del volumen de hinchamiento y observaciones macroscópicas para eventos adversos.

El volumen de hinchamiento se calculó con la fórmula:

$$(2/3 \times \pi) \times (r1) \times (r2) \times (r3)$$

60 en donde: (r1), (r2) y (r3) representan el ancho, longitud y altura del hinchamiento respectivamente, medido con un calibrador.

Resultados

El gel viscoelástico ACP:HBC no causó ningún evento inflamatorio en la dermis tratada; los resultados del tiempo de permanencia *in situ* se muestran en la Figura 1; el tamaño del hinchamiento inicial (expresado como mm<sup>3</sup>) demostró que el gel de acuerdo con la invención es capaz de inducir un volumen de hinchamiento mayor que el gel control, que permanece significativamente alto incluso después de 28 y 85 días. Como se demostró previamente en EP2470230, este efecto se puede atribuir a la presencia del derivado de ACP que, en vista de las características químicas/reológicas, probó ser esencial para promover el relleno cutáneo inmediato y estable.

Ejemplo 13: Evaluación de la eficacia anti-fibrosis del gel ACP:HBC

El propósito de la prueba fue evaluar la eficacia antifibrótica de los geles de acuerdo a la invención, probar al mismo tiempo su citotoxicidad.

El gel ACP:HBC producido como se describe en el Ejemplo 5 se usó para este propósito, por comparación con el producto de referencia representado por el gel formado por HA reticulado con iguales cantidades de BDDE, ambos probados a la misma concentración total de HA.

Procedimiento de la operación

Para probar la actividad de los geles descritos anteriormente *in vitro*, las pruebas de viabilidad/proliferación se realizaron con células de tejido conectivo humano sembradas en pozos (100,000 células/pozo) incubadas con las muestras ACP:HCB y HCB a las concentraciones de 125 µl y 250 µl de gel/ml de medio, para tiempos de incubación de 2 y 5 días, en una incubadora a 37°C.

Preparación de cultivos celulares: brevemente, el tejido conectivo humano obtenido de biopsias, después de varios lavados en PBS (Solución Amortiguada con Fosfato) con la adición de antibióticos, se corta en tiras pequeñas que se digieren con tripsina por 10-20 minutos a 37°C. Al final del tratamiento las células se extrajeron por centrifugación y se sembraron en un medio de cultivo que consiste de DMEM suplementado con suero fetal bovino 20%, P/S 1% (penicilina/estreptomicina) y 1% glutamina.

Después de 2 y 5 días de tratamiento, la prueba de MTT se llevó a cabo para evaluar el efecto de las muestras sobre la proliferación/viabilidad.

Prueba de MTT

La prueba de MTT mide cuantitativamente la presencia de actividad succinato deshidrogenasa en los cultivos celulares. La actividad de esta enzima, que está presente solamente en la mitocondria de las células viables, se usa normalmente como un marcador para investigar la actividad metabólica, viabilidad y/o crecimiento de cultivos celulares. La prueba se basa en la conversión del compuesto químico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium), un colorante azoico amarillo, a sales de formazán azul, por la succinato deshidrogenasa mitocondrial. La cantidad de formazán determinada espectroscópicamente es proporcional a la presencia de dicha enzima en el cultivo celular, y es por lo tanto directamente proporcional al número de células viables. Las células se incuban con solución de 0.5 mg/ml MTT por 3 horas. Al final de la incubación el colorante se extrae de las células viables con una solución de extracción que consiste de isopropanol 90% y DMSO 10%. El colorante después se lee a una longitud de onda, D.O., de 540 nm.

RESULTADOS

Los resultados demuestran claramente que después de 2 días de tratamiento, el gel ACP:HBC inhibió la proliferación celular en casi el 40% contra el control no tratado (a la concentración más alta), mientras el gel HCB determinó una respuesta de poco más de 10% de inhibición. Después de 5 días de tratamiento el % de inhibición aumentó a 50% del control, mientras el gel de referencia permaneció alrededor del 30%.

Finalmente, la Figura 4 muestra que dichos geles carecen completamente de citotoxicidad, aun a las mayores dosis probadas; aun después de 5 días de tratamiento, la viabilidad de las células permanece sin cambio, mientras su capacidad proliferativa se inhibe.

Estos descubrimientos confirman lo que se planteó previamente: los geles viscoelásticos de acuerdo con la invención reducen significativamente (contra geles comparativos que contienen HA reticulado con BDDE) la proliferación celular en el área esclerótica (es decir las células del tejido conectivo) sometida a cirugía oftálmica, pero sin ser citotóxicos, lo que permite al cirujano usar dichos geles sin simultáneamente tratar el área afectada con fármacos antiproliferativos, o al menos permitir una reducción en la cantidad usada.

Ejemplo 14: Propiedades reológicas



Los geles viscoelásticos de la invención garantizan la correcta función de filtración de los canales tratados y la ampolla de filtración creada, porque ellos poseen características reológicas completamente comparables con aquellas de los productos basados en HA reticulado con BDDE actualmente en el mercado para la cirugía de glaucoma.

5

HA exhibe ambas propiedades viscosa y elástica que principalmente dependen de su peso molecular. Dichas características viscoelásticas se pueden cuantificar por la medición de sus módulos: el primer módulo se llama  $G'$  o módulo de elasticidad, porque representa la energía almacenada cuando el polisacárido se somete a una tensión/deformación, y el segundo módulo se llama  $G''$  o módulo de viscosidad, porque representa la energía disipada cuando la molécula se somete a una tensión.

10

Las mediciones de  $G'$  y  $G''$  se tomaron a 25°C con un reómetro Thermo Haake Mars II (cono/placa) equipado con un cono de 6 cm de diámetro y un ángulo de 1°. Las mediciones se tomaron en modo oscilatorio, en un intervalo de frecuencia medido desde 0.001 hasta 1000 rad/s. Las muestras se procesaron con el software Haake Rheowin Job Manager 4.0.

15

#### RESULTADOS

ACP:HBC, preparado y esterilizado como se describe en el Ejemplo 5, a una concentración final de 25 mg/ml en HA:

20

$$G' \text{ a } 0,628 \text{ rad/s} = 31,4 \text{ Pa}$$

$$G'' \text{ a } 0,628 \text{ rad/s} = 12,9 \text{ Pa}$$

HBC, preparado y esterilizado como para HBC en la muestra anterior, a la misma concentración de 25 mg/ml en HA:

25

$$G' \text{ a } 0,628 \text{ rad/s} = 32,82 \text{ Pa}$$

$$G'' \text{ a } 0,628 \text{ rad/s} = 11,95 \text{ Pa}$$

Los resultados obtenidos prueban que los dos módulos del gel ACP:HBC son comparables con aquellos del gel control (representativo del producto basado en HA reticulado con BDDE actualmente en el mercado para el glaucoma), lo que demuestra así que los geles tienen la misma viscosidad y elasticidad, y por lo tanto la misma capacidad de filtración.

30

Básicamente, estos descubrimientos confirman que la combinación del gel ACP y el gel HBC aumentan el tiempo de permanencia *in situ* de dicho gel pero especialmente reducen la fibrosis en el área tratada y mantienen sin cambio la eficiencia de filtración del gel de la invención.

35

## Reivindicaciones

- 5 1. Geles viscoelásticos e hidrogeles hechos de ácido hialurónico autoreticulado (ACP) mezclado con ácido hialurónico reticulado con 1,4-butanodiol diglicidil éter, BDDE (HBC) en una relación de peso desde 5:95 hasta 50:50, para usar en cirugía oftálmica como geles antifibróticos.
- 10 2. Geles viscoelásticos e hidrogeles para usar de acuerdo con la reivindicación 1 para aplicaciones en cada tipo de cirugía de glaucoma, ambas penetrante y no-penetrante, y en "punción de la ampolla" o para la colocación de implantes de drenaje.
- 15 3. Geles viscoelásticos e hidrogeles para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, preferentemente en una relación ACP:HBC de peso desde 5:95 hasta 25:75, con la mayor preferencia de 25:75.
- 20 4. Geles viscoelásticos e hidrogeles para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el ácido hialurónico usado para la preparación de los derivados de ACP y HBC es preferentemente una sal de sodio de ácido hialurónico y tiene un promedio ponderado de peso molecular desde 400 hasta  $3 \times 10^6$  Da, preferentemente desde  $1 \times 10^5$  Da hasta  $1 \times 10^6$  Da, con la mayor preferencia desde 200,000 hasta 750,000 Da.
- 25 5. Geles viscoelásticos e hidrogeles para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la relación de peso ACP:HBC de 25:75, en donde el ácido hialurónico tiene un promedio ponderado de peso molecular desde 200,000 hasta 750,000 Da.
- 30 6. Geles viscoelásticos e hidrogeles para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde ACP tiene un grado de reticulación medio desde 4% hasta 5%, y se prepara con ácido hialurónico que tiene un promedio ponderado de peso molecular de 200 KDa.
- 35 7. Geles viscoelásticos e hidrogeles para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde HBC tiene una relación molar BDDE/ácido hialurónico desde 2% hasta 7% moles/mol de dímero de ácido hialurónico, preferentemente desde 4% hasta 5% moles/mol del dímero.
- 40 8. Geles viscoelásticos e hidrogeles para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el ácido hialurónico tiene una concentración total desde 10 hasta 40 mg/ml, preferentemente desde 20 hasta 30 mg/ml.
- 45 9. Geles viscoelásticos e hidrogeles para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en la relación de peso ACP:HBC de 25:75, en donde ACP posee un grado de reticulación desde 4% hasta 5% y se prepara comenzando a partir de un ácido hialurónico que tiene un promedio ponderado de peso molecular de 200 KDa, HBC tiene una relación molar BDDE/ácido hialurónico desde 4% hasta 5% moles/mol de dímero de ácido hialurónico, y la concentración total de ácido hialurónico está en el intervalo de 20 hasta 30 mg/ml, para usar en aplicaciones en todo tipo de cirugía de glaucoma como geles antifibróticos.
- 50 10. Composiciones farmacéuticas que comprenden geles viscoelásticos e hidrogeles hechos de ácido hialurónico autoreticulado (ACP) mezclado con ácido hialurónico reticulado con BDDE (HBC) en una relación de peso desde 5:95 hasta 50:50, preferentemente desde 5:95 hasta 25:75 con la mayor preferencia de 25:75, que contienen portadores y/o excipiente farmacéuticamente aceptables, para usar en cirugía oftálmica como composiciones antifibróticas.
- 55 11. Composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo a la reivindicación 10, para usar específicamente en cirugía de glaucoma como composiciones antifibróticas.
- 60 12. Composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-11, combinadas con fármacos antiinflamatorios, antibióticos, antimetabolitos, anestésicos locales o fármacos que regulan la presión ocular.
13. Composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12 en la forma de hidrogeles viscoelásticos en donde los portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables son salina y soluciones fisiológicas de NaCl y/o sales fosfato.
14. Composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la reivindicación 13, que tienen un pH en el intervalo de 5.5 hasta 7.

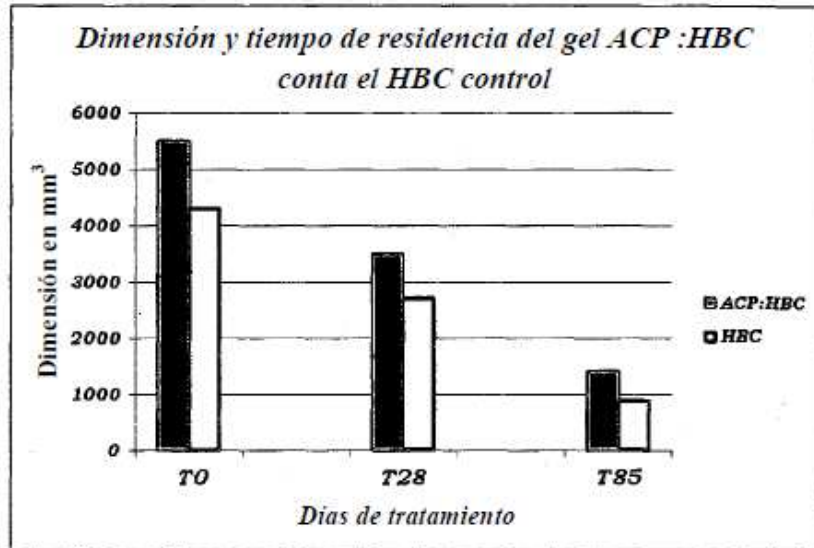


Figura 1

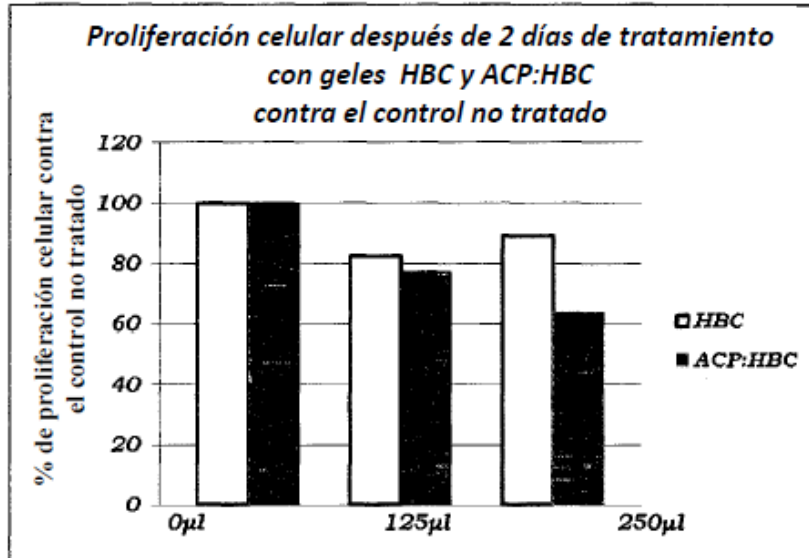


Figura 2

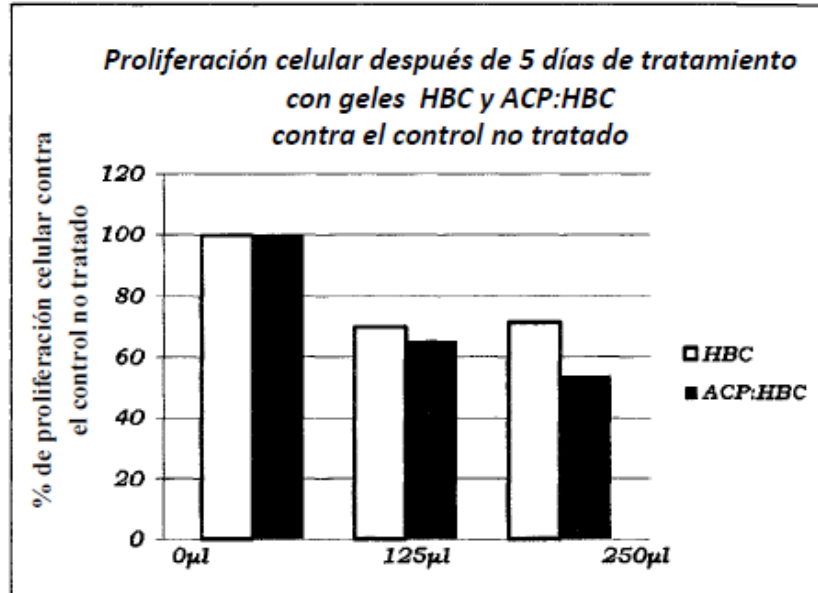


Figura 3

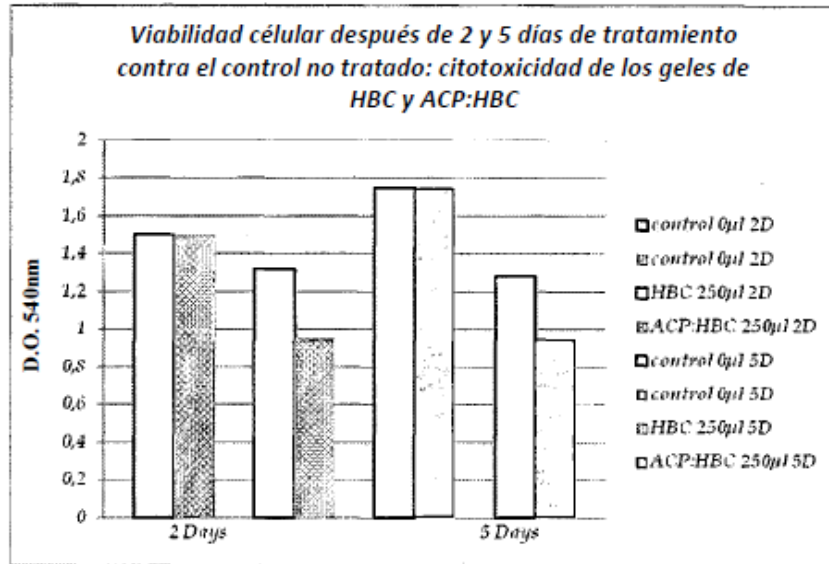


Figura 4

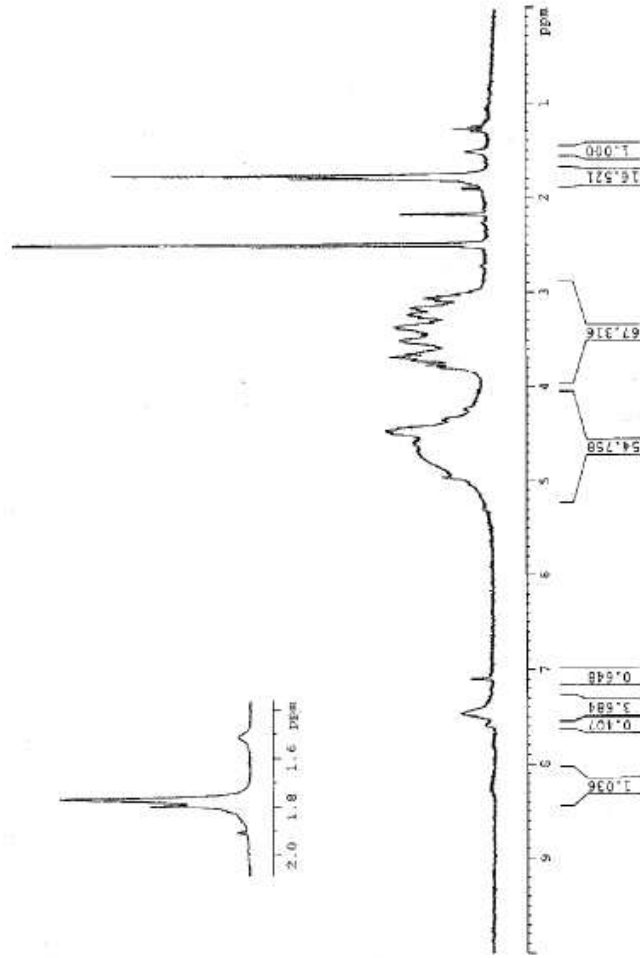


Figura 5

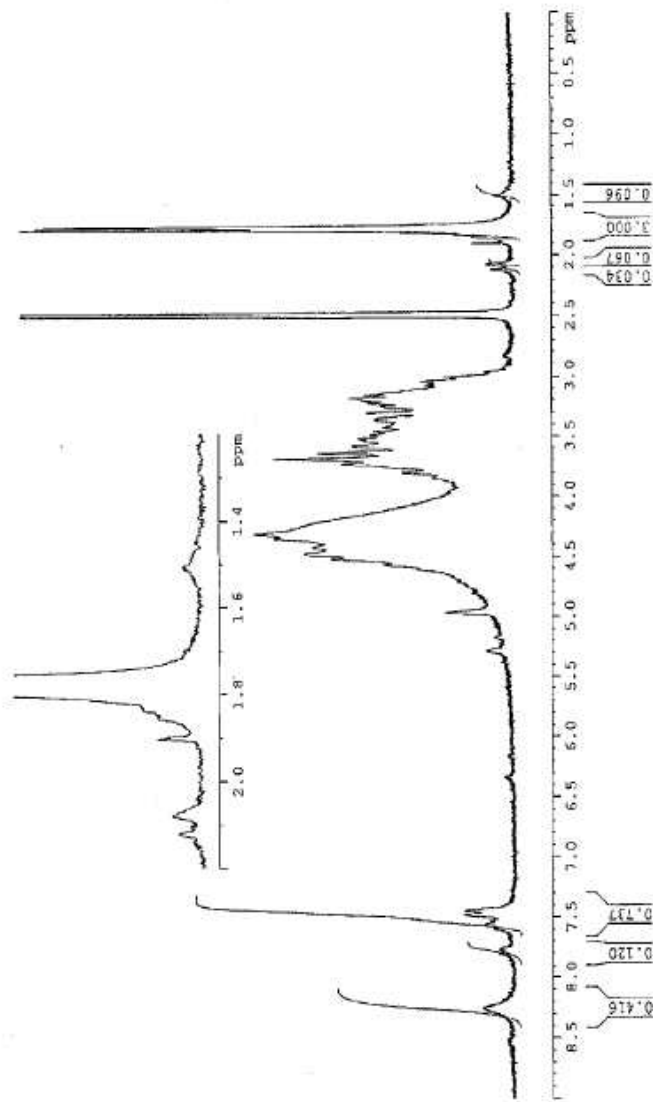


Figura 6



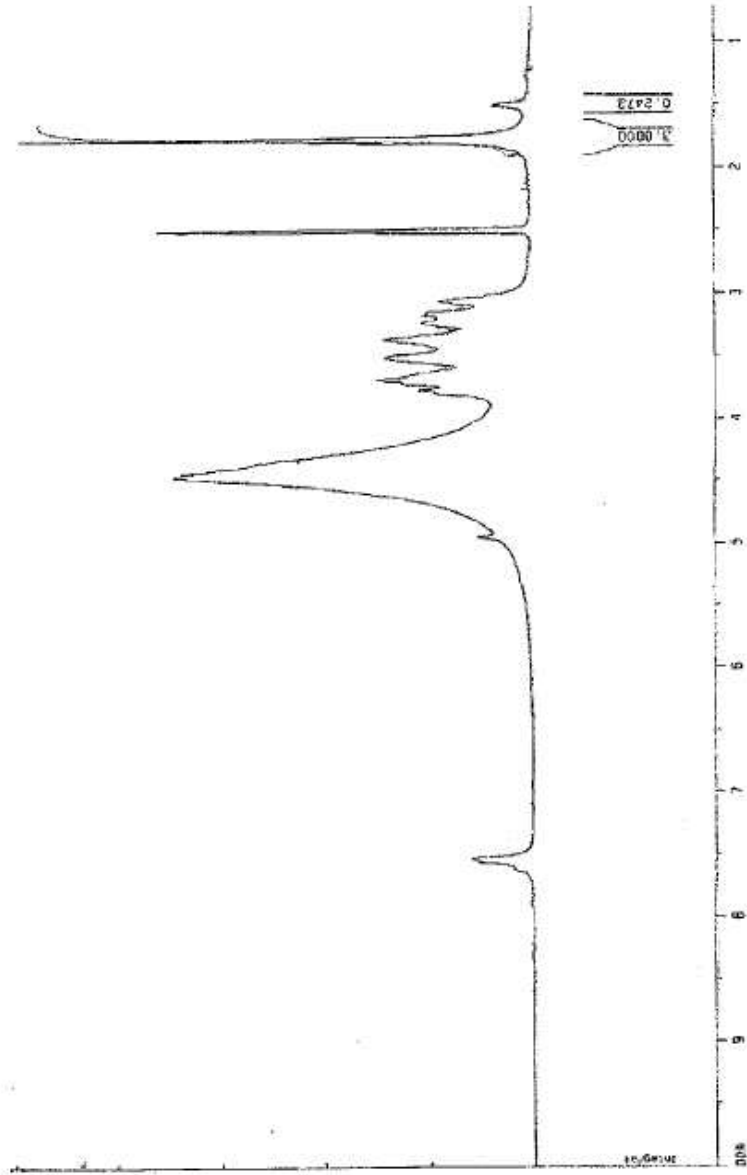


Figura 7