

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 568 781**

51) Int. Cl.:

A61K 8/49	(2006.01)	A61K 8/60	(2006.01)	C08K 5/053	(2006.01)
A61K 8/67	(2006.01)	A61K 8/73	(2006.01)		
A61K 47/18	(2006.01)	A61K 8/04	(2006.01)		
A61K 47/36	(2006.01)	A61K 47/38	(2006.01)		
A61K 47/42	(2006.01)	A61Q 19/08	(2006.01)		
A61K 31/715	(2006.01)	A61K 31/717	(2006.01)		
A61K 31/737	(2006.01)	A61K 31/721	(2006.01)		
C08B 37/08	(2006.01)	A61K 31/727	(2006.01)		
C08J 3/075	(2006.01)	A61K 31/728	(2006.01)		
C08L 5/08	(2006.01)	A61K 31/738	(2006.01)		

12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2008** **E 08855758 (2)**

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016** **EP 2219595**

54) Título: **Formulación de geles de polisacáridos**

30) Prioridad:

30.11.2007 US 991473 P
21.11.2008 US 276167

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

04.05.2016

73) Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 DUPONT DRIVE
IRVINE, CA 92612, US

72) Inventor/es:

STROUMPOULIS, DIMITRIOS;
MUDD, CHRISTOPHER, S. y
TEZEL, AHMET

74) Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 568 781 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

Formulación de geles de polisacáridos

5 CAMPO DE LA INVENCION

En general se divulgan formulaciones útiles para incrementar la longevidad del gel de polisacáridos para aplicaciones cosméticas o médicas, y procedimientos relacionados de preparación y uso de las mismas.

10 ANTECEDENTES

Los polisacáridos son hidratos de carbono relativamente complejos. Son polímeros constituidos por muchos monosacáridos unidos entre sí por enlaces glucosídicos. Por tanto son macromoléculas grandes, a menudo ramificadas. Los polisacáridos, especialmente el ácido hialurónico (AH), han sido útiles en aplicaciones cosméticas y 15 médicas. Estos polímeros se han usado, por ejemplo, como rellenos en el aumento de los tejidos blandos.

Al residir en el espacio extracelular, el AH funciona como una molécula citoprotectora, de estabilización estructural y de relleno de espacios con propiedades físicas de singular maleabilidad y una excelente biocompatibilidad. Las matrices de AH son extremadamente viscoelásticas a la vez que conservan un alto nivel de hidratación. Existe una 20 fuerte correlación entre el contenido de agua de la piel y los niveles de AH en el tejido dérmico. A medida que la piel humana envejece, se conocen alteraciones en el contenido de AH y el metabolismo. Con estos cambios, existe un deterioro significativo en las propiedades mecánicas de la piel. Parece existir una relación entre la piel joven y la presencia de una fuerte red de AH en la matriz intercelular.

Por desgracia, tanto las cadenas de polisacáridos no reticuladas como las reticuladas tales como el AH están sujetas a degradación a través de diferentes rutas (por ejemplo, enzimática, de radicales libres) limitando así la longevidad del polímero *in vivo*. Por tanto, es importante desarrollar procedimientos y composiciones que reduzcan la velocidad de descomposición natural y aumenten la persistencia del producto *in vivo*. La necesidad de tener una formulación de polisacárido que tenga una mayor longevidad siendo resistente a la degradación todavía no se ha 30 satisfecho.

RESUMEN

En la presente memoria descriptiva se describen formulaciones de geles de polisacáridos (por ejemplo, ácido hialurónico, AH) con mayor la longevidad, o un tiempo de degradación incrementado, *in vivo*. Este aumento en el tiempo de degradación se proporciona mediante la incorporación de moléculas que actúan como inhibidores de la degradación. Además, la presente descripción proporciona procedimientos para encapsular estas formulaciones y sostener una longevidad o un tiempo de degradación prolongados *in vivo*. La presente descripción se refiere también a la preparación de geles que pueden tener aplicaciones farmacéuticas o cosméticas. 40

Una realización de la invención es una formulación de geles de polisacáridos que comprende al menos un polisacárido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, celulosa, quitosano, AH o-sulfatado, dextrano, sulfato de dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, heparina, sulfato de heparina y alginato, y al menos un inhibidor de degradación de polisacáridos que es un flavonoide. En una 45 realización, el polisacárido está reticulado. En una realización, el al menos un polisacárido es ácido hialurónico.

En una realización, el flavonoide se selecciona de entre el grupo que consiste en luteolina, apigenina, tangeritina, quercetina, kaempferol, miricetina, fisetina, isoramnetina, paquipodol, ramnacina, hesperetina, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, taxifolina, dihidroquercetina, dihidrokaempferol, ácido tánico, tanino, tanino condensado, 50 tanino hidrolizable y combinaciones de los mismos. En otra realización, el flavonoide es ácido tánico y está presente en una concentración de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 1% en peso.

En una realización, la formulación comprende además un recipiente biocompatible o biodegradable donde el inhibidor está dentro o forma parte de dicho recipiente, donde el recipiente es un liposoma, una micela o una 55 vesícula polimerizada. En otra realización, el inhibidor proporciona a la formulación propiedades reológicas mejoradas que conducen a una menor fuerza de extrusión requerida para la administración de la formulación en comparación con una formulación de geles de polisacáridos reticulada.

Otra realización de la invención es un procedimiento de producción de una formulación de geles de polisacáridos 60 que tiene un tiempo de degradación incrementado que comprende la etapa que consiste en: proporcionar al menos un polisacárido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, celulosa, quitosano, AH o-sulfatado, dextrano, sulfato de dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, heparina, sulfato de heparina y alginato, e incorporar en el polisacárido al menos un inhibidor de degradación de polisacáridos que es un flavonoide.

En una realización del procedimiento, la etapa de incorporación comprende 1) la mezcla del inhibidor con el polisacárido en un estado altamente hidratado encapsulando así el inhibidor en una red de polisacáridos, y 2) la deshidratación de la red de polisacáridos controlando así la cinética de liberación o la relación de hinchamiento final.

5

En otra realización del procedimiento, el al menos un polisacárido se reticula antes de la incorporación del al menos un inhibidor de degradación de polisacáridos usando un agente de reticulación seleccionado de entre el grupo que consiste en éter 1,4-butanodioldiglicidílico (BDDE), 1,2-bis (2,3-epoxipropoxi) etileno, 1-(2,3-epoxipropil)-2,3-epoxiciclohexano y combinaciones de los mismos.

10

En una realización del procedimiento, la etapa de incorporación comprende 1) el encapsulado del inhibidor en un recipiente biocompatible o biodegradable y 2) la combinación del al menos un polisacárido y el recipiente para formar una formulación de gel.

15 Una realización adicional de la invención es una formulación de geles de polisacáridos con un tiempo de degradación incrementado que comprende ácido tánico y ácido hialurónico reticulado, donde el ácido tánico está presente en una concentración de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 1%.

20 Las formulaciones de geles de polisacáridos descritas anteriormente pueden incluirse en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un ingrediente activo. En una realización, el ingrediente activo se selecciona de entre el grupo que consiste en agentes antiprurícticos, agentes anticelulíticos, agentes anticicatrizantes, agentes antiinflamatorios, agentes antioxidantes, vitaminas, agentes de humectación y combinaciones de los mismos.

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 ilustra gráficamente la magnitud de la degradación enzimática de geles de polisacáridos que incluyen sulfato de condroitina A (SCA) usando un ensayo colorimétrico.

30 La figura 2 ilustra gráficamente la magnitud de la degradación enzimática de geles de polisacáridos que incluyen ácido tánico (AT) usando un ensayo colorimétrico.

La figura 3 ilustra gráficamente la magnitud de la degradación enzimática de geles de polisacáridos con y sin SCA usando un ensayo de AH soluble.

35

La figura 4 ilustra gráficamente la magnitud de la degradación enzimática de geles de polisacáridos con y sin AT usando un ensayo de AH soluble.

40 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

40

En la presente memoria descriptiva se describen formulaciones de geles de polisacáridos (por ejemplo, ácido hialurónico, AH) con aumento de la longevidad, o tiempo de degradación incrementado, *in vivo* proporcionado mediante la incorporación de moléculas que actúan como inhibidores de la degradación. En algunas realizaciones, los geles de polisacáridos están reticulados. Además, la presente descripción está relacionada también con procedimientos para el encapsulado de estas formulaciones para sostener una longevidad o tiempo de degradación prolongados *in vivo*. La presente descripción está relacionada también con la preparación de geles que pueden tener aplicaciones farmacéuticas o cosméticas.

45

Un aspecto de la presente invención consiste en formulaciones de geles de polisacáridos que comprenden al menos un polisacárido y al menos un inhibidor de degradación de polisacáridos que es un flavonoide. La presente invención se refiere además al aumento del tiempo de degradación de geles de polisacáridos mediante la incorporación de inhibidores de degradación. "Polisacárido" se refiere a un polímero de más de dos moléculas de monosacáridos, en las cuales los monosacáridos pueden ser idénticos o diferentes. El polisacárido de la presente invención puede ser reticulado o no reticulado. El polisacárido se selecciona de entre AH, celulosa, quitosano, AH o-sulfatado, dextrano, sulfato de dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, heparina, sulfato de heparina y alginato.

55

Los inhibidores son moléculas que actúan mediante el direccionamiento y la neutralización de mecanismos de degradación específicos tales como degradación enzimática y de radicales libres.

60

Los inhibidores son normalmente moléculas unos órdenes de magnitud menores que los polímeros de polisacáridos reticulados. Debido a su pequeño tamaño y a su mayor difusividad, son propensos a una adsorción rápida *in vivo* que podría limitar potencialmente su rendimiento. Un procedimiento para aumentar la vida media local de dichas moléculas *in vivo* consiste en inyectarlas químicamente en la red de polímeros de polisacáridos y en suministrarlas

simultáneamente. Una desventaja de este procedimiento es que la molécula ligada puede mostrar una actividad significativamente inferior en comparación con la no ligada. En la presente formulación de geles de polisacáridos, la concentración del inhibidor puede estar en el intervalo de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 99% en peso, de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 75% en peso, de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 60% en peso, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 50% en peso, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 40% en peso, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 30% en peso, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 20% en peso, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% en peso, de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30% en peso, de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 0,01% en peso, de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 0,1% en peso, de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 1% en peso, de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 1% en peso, de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 1% en peso o de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10% en peso.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de una formulación de geles de polisacáridos que tiene una degradación reducida que comprende el suministro de un polisacárido tal como se describe anteriormente y el encapsulado de un inhibidor de degradación tal como se describe anteriormente en el polisacárido.

Tanto las cadenas de polisacáridos no reticulados como los reticulados están sujetas a degradación a través de diferentes rutas (por ejemplo, enzimática, de radicales libres) que limita a menudo la longevidad del polímero *in vivo*. Por tanto es importante desarrollar formas que reduzcan la velocidad de este proceso de descomposición natural y aumenten la persistencia del producto en los tejidos.

Un procedimiento para conseguir una mayor persistencia de los polisacáridos consiste en encapsular las moléculas del inhibidor en la red de polímeros de polisacáridos en sí o en grandes recipientes dentro de la red que permitirían una liberación local (sitio de inyección), sostenida y controlada de los inhibidores de degradación. Ello permitiría también evitar los mecanismos de degradación natural. El presente procedimiento de encapsulado proporciona un suministro constante de inhibidores de degradación a la red de polímeros de polisacáridos durante un periodo de semanas. En otras realizaciones, se proporciona un suministro constante de inhibidores de degradación durante un periodo de meses. Un procedimiento de encapsulado consiste en incorporar los inhibidores de degradación en la red de polímeros de polisacáridos ya sea por adsorción o por un proceso de encapsulado. En el último caso, se permite que los inhibidores se mezclen con la red de polisacáridos en un estado altamente hidratado, seguido por deshidratación de la red para controlar la cinética de liberación (por ejemplo, relación de hinchamiento final del polímero). Un estado altamente hidratado corresponde a una concentración de AH que es inferior a aproximadamente 20 mg/ml.

La relación de hinchamiento final puede controlarse ajustando el pH o deshidratando parcialmente la red de polisacáridos. La red contraída puede dimensionarse en partículas, mezclarse con los geles de polisacáridos y suministrarse en el sitio de la inyección. La lenta rehidratación de las partículas de polisacáridos cargadas con inhibidor puede proporcionar un suministro sostenido y controlado de su contenido activo.

La formulación de geles de polisacáridos puede comprender además un recipiente biocompatible o biodegradable donde el inhibidor está dentro o forma parte del recipiente. Dichos recipientes pueden estar compuestos por moléculas autoensambladas por enlaces covalentes o no covalentes tales como liposomas, micelas y vesículas polimerizadas.

Un liposoma es una vesícula compuesta por una o más membranas bicapa formadas por fosfolípidos obtenidos de forma natural con cadenas lipídicas mezcladas (tales como fosfatidiletanolamina de huevo), o de componentes tensioactivos puros como dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Los liposomas contienen, habitualmente pero no por definición, un núcleo de solución acuosa; las estructuras lipídicas que no contienen material acuoso se denominan micelas. Una micela es un agregado de moléculas tensioactivas dispersas en un coloide líquido. Una micela típica en solución acuosa forma un agregado con las regiones hidrófilas de "cabeza" en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones hidrófobas de "cola" en el centro de la micela. Este tipo de micela se conoce como micela de fase normal (micela de aceite en agua). Las micelas inversas tienen los grupos de cabeza en el centro con las colas extendiéndose hacia el exterior (micela de agua en aceite). A menudo las micelas tienen forma aproximadamente esférica, aunque son posibles también otras formas, que incluyen formas como elipsoides, cilindros y bicapas. La forma y el tamaño de una micela es una función de la geometría molecular de sus moléculas tensioactivas y las condiciones de la solución tales como la concentración de tensioactivo, la temperatura, el pH y la fuerza iónica. El proceso de formación de micelas se conoce como micelización y forma parte del comportamiento de fase de muchos lípidos de acuerdo con su polimorfismo.

El procedimiento para producir la formulación de geles de polisacáridos que tienen degradación reducida puede comprender las etapas que consisten en 1) proporcionar un polisacárido, 2) incorporar un inhibidor en un recipiente biocompatible o biodegradable y 3) combinar dicho polisacárido y recipiente en una formulación de gel. Este

procedimiento de encapsulado incorpora así los inhibidores en recipientes biocompatibles y biodegradables que podrían suministrarse al mismo tiempo con el polisacárido. Dichos recipientes pueden estar compuestos por moléculas autoensambladas unidas por enlaces no covalentes o covalentes (por ejemplo, micelas, liposomas y vesículas polimerizadas). En la presente memoria descriptiva el término autoensamblaje se usa para describir
5 procesos en los que un sistema desordenado de componentes preexistentes forma una estructura o distribución organizada como consecuencia de interacciones locales específicas entre los propios componentes, sin dirección externa.

Una ventaja adicional de la formulación propuesta es el incremento de la capacidad de ajuste de las propiedades reológicas del producto final. Los geles de polisacáridos reticulados tienen normalmente alta viscosidad y necesitan
10 una fuerza considerable para su extrusión a través de una aguja fina. Los polisacáridos no reticulados se usan a menudo como lubricantes para facilitar este proceso de extrusión. Sin embargo, especialmente en rellenos dérmicos de AH, el AH no reticulado no contribuye a la persistencia del producto final *in vivo*. De hecho, cuanto más AH reticulado se sustituye por AH no reticulado para ajustar las propiedades reológicas del relleno dérmico (para una
15 concentración total fija de AH), menor será la resistencia a la degradación del producto. En cambio, de acuerdo con la formulación propuesta, los GAG no reticulados que son también inhibidores de degradación (por ejemplo, sulfato de condroitina, ácido hialurónico o-sulfatado) pueden usarse tanto para extender la longevidad como para mejorar las propiedades reológicas del producto final.

Los polisacáridos descritos en la presente memoria descriptiva pueden estar reticulados o no reticulados. Puede usarse un agente de reticulación para reticular los polisacáridos de acuerdo con la presente descripción. El agente de reticulación puede ser cualquier agente conocido que sea adecuado para la reticulación de polisacáridos y sus derivados a través de sus grupos hidroxilo. Los agentes de reticulación adecuados incluyen pero no se limitan a, por
20 ejemplo, éter 1,4-butanodioldiglicídico (o 1,4-bis (2,3-epoxipropoxi) butano o 1,4-bisglicidiloxibutano, todos los cuales son conocidos comúnmente como BDDE), 1,2-bis (2,3-epoxipropoxi) etileno y 1-(2,3-epoxipropil)-2,3-epoxiciclohexano. El uso de más de un agente de reticulación o un agente de reticulación diferente no se excluye del alcance de la presente descripción. En una realización, el agente de reticulación comprende o consiste en BDDE.

Los rellenos dérmicos pueden usarse para tratar arrugas o pliegues faciales moderados o graves tales como pliegues nasolabiales (líneas que se extienden desde la nariz a las comisuras de los labios). Los rellenos dérmicos pueden ser un implante de gel que incluye AH, un azúcar complejo natural que refuerza la elasticidad de la piel, proporcionando un aspecto liso y flexible. Es biocompatible y puede complementar el AH natural del organismo, que el envejecimiento puede agotar.

Puede inyectarse un gel dérmico con una jeringa en la dermis media o profunda de la cara. La dermis es la capa subsuperficial de la piel que contiene tejido conjuntivo, terminaciones nerviosas, glándulas sudoríparas y oleosas y vasos sanguíneos. Los rellenos dérmicos pueden mejorar el aspecto de la piel al levantar y añadir volumen a las arrugas y los pliegues en la zona de tratamiento.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición cosmética que comprende la presente formulación de geles de polisacáridos, un vehículo cosmético y un ingrediente activo. Los ingredientes activos cosméticos pueden incluir pero no se limitan a antioxidantes, vitaminas y agentes de humectación.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "cosmético" es un adjetivo que se refiere a mejorar el aspecto de una superficie o cubrir los defectos. Normalmente, las composiciones cosméticas pueden usarse para mejorar la estética más que los aspectos funcionales de una superficie. Más frecuentemente, las composiciones cosméticas se formulan para su aplicación como un tratamiento de salud y belleza o para influir en el aspecto personal del cuerpo, por ejemplo, superficies queratínicas tales como la piel, el cabello, las uñas y similares.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "vehículo cosméticamente aceptable" se refiere a un material que es adecuado para su aplicación en superficies queratínicas u otras zonas del cuerpo. Tras la aplicación, los vehículos cosméticamente aceptables están sustancialmente libres de reacciones adversas en la piel y otras superficies queratínicas. Por ejemplo, los vehículos cosméticos pueden adoptar la forma de cremas grasas o no grasas, suspensiones lácteas o tipos de emulsión en aceite o de aceite en agua, lociones, geles o gelatinas,
50 soluciones acuosas u oleosas coloidales o no coloidales, pastas, aerosoles, comprimidos solubles o varitas.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "formulación" y "composición" pueden usarse indistintamente y se refieren a una combinación de elementos que se presenta conjuntamente para un objetivo dado. Estos términos son bien conocidos para los expertos en la materia.

60 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "vehículo", "vehículo inerte" y "vehículo aceptable" pueden usarse indistintamente y se refieren a un vehículo que puede combinarse con los geles de polisacáridos divulgados en la presente descripción con el fin de proporcionar una composición deseada. Los expertos en la materia reconocerán una serie de vehículos que son bien conocidos para preparar composiciones farmacéuticas y/o

cosméticas curativas.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende la formulación de geles de polisacáridos, un vehículo farmacéutico y un ingrediente activo. Tal como se usa en la presente memoria
5 descriptiva, un ingrediente activo incluye pero no se limita a un fármaco. Un fármaco puede definirse generalmente como una sustancia química usada en el tratamiento, la cura, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o usada para mejorar por otros medios el bienestar físico o mental.

Algunos ejemplos de ingredientes activos que pueden incluirse en la presente composición farmacéutica son
10 agentes antiprurífticos, agentes anticelulíticos, agentes anticicatrizantes y agentes antiinflamatorios. Los agentes antiprurífticos pueden incluir metilsulfonilmetano, bicarbonato de sodio, calamina, alantoína, caolín, menta, aceite del árbol del té y combinaciones de los mismos. Los agentes anticelulíticos pueden incluir forskolina, compuestos de xantina tales como, pero sin limitarse a, cafeína, teofilina, teobromina y aminofilina, y combinaciones de los mismos. Los agentes anticicatrizantes pueden incluir IFN- γ , fluorouracilo, poli (ácido láctico-coglicólico), polietilenglicol
15 metilado, poliácido láctico, polietilenglicol y combinaciones de los mismos. Los agentes antiinflamatorios pueden incluir dexametasona, prednisolona, corticosterona, budesonida, estrógeno, sulfasalacina, mesalamina y combinaciones de los mismos.

Un polisacárido como AH se encuentra naturalmente en muchos tejidos del organismo tales como, pero sin limitarse
20 a, la piel, el cartílago y el humor vítreo. Por tanto está bien adaptado a aplicaciones biomédicas dirigidas a estos tejidos. El AH puede usarse en cirugía ocular (es decir, trasplante de córnea, cirugía de catarata, cirugía de glaucoma y cirugía para reparación de desprendimiento de retina). El AH se usa también para tratar la artrosis de la rodilla. Dichos tratamientos, denominados viscosuplementación, se administran como un curso de inyecciones en la articulación rotuliana y según se cree suplementan la viscosidad del líquido articular, lubricando así la articulación,
25 almohadillando la articulación y produciendo un efecto analgésico. También se ha sugerido que el AH tiene efectos bioquímicos positivos en las células de los cartílagos. Últimamente se ha sugerido el uso oral del AH, aunque es preciso demostrar su eficacia. En la actualidad, existen algunos estudios clínicos preliminares que sugieren que la administración oral del AH tiene un efecto positivo en la artrosis.

Debido a su alta biocompatibilidad y a su presencia común en la matriz extracelular de los tejidos, el AH puede
30 usarse como un esqueleto de biomaterial en investigación de ingeniería tisular. En algunos cánceres, los niveles de AH guardan una buena correlación con la malignidad y el pronóstico infausto. Así, el AH se usa a menudo como un marcador tumoral para el cáncer de próstata y de mama. También puede usarse para vigilar la progresión de la enfermedad. El AH puede usarse también de forma postoperatoria para inducir la curación del tejido, en particular
35 después de cirugía por cataratas. Los modelos actuales de curación de heridas proponen que los mayores polímeros de AH aparecen en las fases tempranas de la curación para dejar espacio físicamente a los leucocitos que median en la respuesta inmunitaria.

Una composición farmacéutica puede incluir opcionalmente uno o más agentes tales como, sin limitación, agentes
40 de emulsión, agentes de humectación, agentes edulcorantes o saborizantes, agentes de ajuste de la tonicidad, conservantes, tampones, antioxidantes y flavonoides. Los agentes de ajuste de la tonicidad útiles en una composición farmacéutica de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, sales tales como acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o glicerina y otros agentes de ajuste de la tonicidad farmacéuticamente aceptables. Los conservantes útiles en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente
45 memoria descriptiva incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico y nitrato fenilmercúrico. Pueden usarse diversos tampones y medios para ajustar el pH con el fin de preparar una composición farmacéutica, lo que incluye pero sin limitarse a, tampones acetato, tampones citrato, tampones fosfato y tampones borato. Análogamente, los antioxidantes útiles en las composiciones farmacéuticas
50 son bien conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, acetilcisteína, hidroxianisol butilado y hidroxitolueno butilado. Los flavonoides son compuestos presentes en las plantas que son bien conocidos por tener diversos efectos bioquímicos y antioxidantes beneficiosos. Entre las subcategorías de los flavonoides se incluyen: flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanonoles. Entre los ejemplos de flavonoides se incluyen: luteolina, apigenina, tangeritina, quercetina, kaempferol, miricetina, fisetina, isoramnetina, paquipodol, ramnacina, hesperetina, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, taxifolina, dihidroquercetina, dihidrokaempferol,
55 ácido tánico, tanino, tanino condensado y tanino hidrolizable. Debe entenderse que estas y otras sustancias conocidas en la técnica de la farmacología pueden incluirse en una composición farmacéutica de la invención. Véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences Mac Publishing Company, Easton, PA 16ª Edición 1980.

A continuación se ilustran algunas de las ventajas de la invención usando ejemplos que describen la preparación de
60 un gel de relleno de AH de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva, la preparación de un gel de relleno de AH de acuerdo con la técnica anterior y las pruebas de degradación realizadas en estas muestras.

El peso molecular (P_m) tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a la suma de los pesos

atómicos de los átomos de una molécula. Por ejemplo, la de metano (CH₄) es 16,043 g/mol, siendo los pesos atómicos carbono = 12,011 g/mol e hidrógeno = 1,008 g/mol. El Dalton (Da) es una unidad de masa igual a 1/12 de la masa de ¹²C y un millón de Da puede denotarse como 1 MDa.

5 **EJEMPLO COMPARATIVO 1**

Preparación de un gel de relleno de AH

- 10 Se mezclan de 1 a 5 g de relleno de polisacárido con una concentración de AH de 24 mg/mL, aproximadamente a un grado del 6% de reticulación y un G' de aproximadamente 180 (JUVÉDERM® 24HV, (Allergan Inc., Irvine, California)) con 1.000 µl de una solución salina de tampón de fosfato (PBS) (pH~ 7) que es suplementada con 10-200 mg de sulfato de condroitina A (SCA - P_m = 5.000-120.000 Da). La mezcla se homogeneiza mecánicamente.

EJEMPLO 1

- 15 Preparación de un gel de relleno de ácido hialurónico de acuerdo con la presente invención

- Se mezclan de 1 a 5 g de relleno de polisacárido con una concentración de AH de 24 mg/mL, aproximadamente a un grado del 6% de reticulación y un G' de aproximadamente 170 (JUVÉ-DERM® 30) con 50 µl de solución PBS (pH~ 7) que es suplementada con 1-20 mg de ácido tánico (AT - P_m = 800-4.000 Da). La mezcla se homogeneiza mecánicamente.
- 20

EJEMPLO COMPARATIVO 2

- 25 Preparación de un gel de relleno de ácido hialurónico por el proceso de la técnica anterior

Se mezclan de 1 a 5 g de relleno de polisacárido con una concentración de AH de 24 mg/mL, aproximadamente a un grado del 6% de reticulación y un G' de aproximadamente 170 (JUVÉ-DERM® 30) con 50 µl de PBS de tal manera que la concentración final de AH es la misma que en el Ejemplo 1. La mezcla se homogeneiza mecánicamente.

EJEMPLO 2

Estudio de degradación enzimática (prueba colorimétrica)

- 35 Se evaluó la resistencia a la degradación enzimática de los geles de relleno de AH preparados en el Ejemplo 1 y los Ejemplos comparativos 1 y 2, usando el ensayo colorimétrico de Morgan-Elson. Este ensayo se usa para estimar el peso molecular medio de las cadenas de AH antes y después de la degradación enzimática.

- Se añadió hialuronidasa (0,1-10 mg) a las muestras de AH durante 10-250 min a 37°C seguido por 0,1 ml de a 0,8 M de solución de tetraborato de potasio y calentamiento a 100°C durante 10 min. Las muestras se suplementario con 3 ml de una solución al 10% (en peso) de p-dimetilaminobenzaldehído en ácido acético y se incubó a 37°C durante 10-120 min. Se usó el cambio en la densidad óptica (DO) a 585 nm después y antes de la degradación para cuantificar la extensión de la degradación en cada muestra.
- 40

- 45 Los resultados de las medidas realizadas en el gel de relleno que contiene SCA del Ejemplo comparativo 1 se muestran en la Figura 1.

- Los valores de DO de los geles suplementados con AT preparados por el procedimientos de la presente descripción, tal como se muestra en la Figura 2 (*Ejemplo 1*: 0,063-1,000 mg/mL AT) son menores que los del gel preparado por el procedimiento de la técnica anterior (*Ejemplo comparativo 2*: 0 mg/mL AT). Además, la disminución en los valores de DO es proporcional a la concentración de AT. Dado que el valor de DO representa la magnitud de la degradación, los resultados sugieren que los geles preparados de acuerdo con la presente invención muestran una resistencia un 15-90% superior a la degradación enzimática que el gel preparado de acuerdo con la técnica anterior. Puede verse además que AT posee una actividad inhibitora mayor que SCA dado que en general tiene un orden de magnitud
- 50
- 55 menos de cantidad de AT para obtener la misma inhibición que con SCA.

EJEMPLO 3

Estudio de degradación enzimática (ensayo de AH soluble)

- 60 Para evaluar adicionalmente la resistencia a la degradación enzimática de los geles de relleno de AH preparados en el Ejemplo 1 y los Ejemplos comparativos 1 y 2, se usó un ensayo de AH soluble basado en SEC-MALS (Size Exclusion Multi-Angle Light Scattering, dispersión de luz ángulos múltiples de exclusión por tamaño). Este ensayo

puede usarse para cuantificar la degradación evaluando el porcentaje de AH (definido como la parte del gel que puede pasar a través de un filtro de 0,2-1,0 μm) contenido en cada muestra. El cambio en la cantidad de AH soluble, antes y después de la degradación, puede usarse para cuantificar la magnitud de degradación en cada muestra.

- 5 Las pruebas SEC-MALS se realizaron usando un sistema de cromatografía de exclusión por tamaño Agilent con dispersión luminosa de Wyatt y unidades de índice de refracción. Se añadió hialuronidasa (0,1-10 mg) a las muestras de AH durante 10-250 min a 37°C seguido por 0,1 ml de una solución 0,8 M de tetraborato de potasio y con calentamiento a 100°C durante 10 min. Se diluyeron las muestras en PBS, se filtró a través de un filtro de 0,2-1,0 μm y se inyectó en el sistema SEC-MALS. El contenido de AH soluble antes y después de la degradación
10 enzimática así como su diferencia se muestran en las Figuras 3 y 4.

- El aumento después de degradación en el contenido de AH soluble de los geles suplementados con AT preparados por los procedimientos de la presente invención (*Ejemplo 1*: 0,063-1,000 mg/mL AT) es menor que el del gel preparado mediante el proceso de la técnica anterior (*Comparativo 2*: 0 mg/mL AT). Estos resultados concuerdan
15 con el procedimiento colorimétrico resumido en la Figura 4. Además, puede verse de nuevo que la actividad inhibidora de AT es un orden de magnitud mayor que la de SCA.

- Salvo que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, las condiciones de reacción, y así sucesivamente usados en la memoria descriptiva y las
20 reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los aspectos por el término "aproximadamente". En consecuencia, salvo que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe entenderse al menos a la
25 luz del número de cifras significativas referidas y mediante la aplicación de las técnicas comunes de redondeo. Sabiendo que los intervalos y parámetros numéricos expuestos en el alcance extenso de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se refieren con la máxima precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene intrínsecamente algunos errores resultantes de la desviación típica encontrada en sus medidas de prueba respectivas.

- 30 Los términos "un", "una", "el", "la" y referentes similares usados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben entenderse como extensivos tanto al singular como al plural, salvo que se indique lo contrario en la presente memoria descriptiva o esté en clara contradicción con el contexto. La indicación de intervalos de valores en la presente memoria descriptiva pretende
35 servir tan solo como un procedimiento abreviado de referirse individualmente a cada valor separado situado dentro del intervalo. Salvo que se indique lo contrario en la presente memoria descriptiva, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se indicara individualmente en la presente memoria descriptiva. Todos los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden realizarse en cualquier orden adecuado salvo que se indique lo contrario en la presente memoria descriptiva o esté en clara contradicción con el contexto. El uso
40 de cada uno y de todos los ejemplos, o el lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") que se proporcionan en la presente memoria descriptiva pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación en el alcance de la invención reivindicado. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativa de ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de geles de polisacáridos que comprende al menos un polisacárido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, celulosa, quitosano, AH o-sulfatado, dextrano, sulfato de dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, heparina, sulfato de heparina y alginato, y al menos un inhibidor de degradación de polisacáridos que es un flavonoide.
2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho polisacárido está reticulado.
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho al menos un polisacárido es ácido hialurónico.
4. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho flavonoide se selecciona de entre el grupo que consiste en luteolina, apigenina, tangeritina, quercetina, kaempferol, miricetina, fisetina, isoramnetina, paquipodol, ramnacina, hesperetina, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, taxifolina, dihidroquercetina, dihidrokaempferol, ácido tánico, tanino, tanino condensado, tanino hidrolizable y combinaciones de los mismos.
5. La formulación de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho flavonoide es ácido tánico.
6. La formulación de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho ácido tánico está presente en una concentración de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 1% en peso.
7. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un recipiente biocompatible o biodegradable donde dicho inhibidor está dentro o forma parte de dicho recipiente, donde dicho recipiente es un liposoma, una micela o una vesícula polimerizada.
8. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho inhibidor proporciona a dicha formulación propiedades reológicas mejoradas que conducen a una menor fuerza de extrusión requerida para la administración de dicha formulación en comparación con una formulación de geles de polisacáridos reticulada.
9. Una formulación de geles de polisacáridos con un tiempo de degradación incrementado que comprende ácido tánico y ácido hialurónico reticulado, donde dicho ácido tánico está presente en una concentración de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 1%.
10. Un procedimiento de producción de una formulación de geles de polisacáridos que tiene un tiempo de degradación incrementado que comprende las etapas que consisten en:
proporcionar al menos un polisacárido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, celulosa, quitosano, AH o-sulfatado, dextrano, sulfato de dextrano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, heparina, sulfato de heparina y alginato, e incorporar en dicho polisacárido al menos un inhibidor de degradación de polisacáridos que es un flavonoide.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha etapa de incorporación comprende 1) la mezcla de dicho al menos un inhibidor con dicho al menos un polisacárido en un estado altamente hidratado encapsulando así dicho al menos un inhibidor en una red de polisacáridos, y 2) la deshidratación de dicha red de polisacáridos controlando así la cinética de liberación o la relación de hinchamiento final.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho al menos un polisacárido es reticulado antes de la incorporación de dicho al menos un inhibidor de degradación de polisacáridos usando un agente de reticulación seleccionado de entre el grupo que consiste en éter 1,4-butanodioldiglicídico (BDDE), 1,2-bis(2,3-epoxipropoxi) etileno, 1-(2,3-epoxipropil)-2,3-epoxiciclohexano y combinaciones de los mismos.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha etapa de incorporación comprende 1) el encapsulado de dicho al menos un inhibidor en un recipiente biocompatible o biodegradable y 2) la combinación de dicho al menos un polisacárido y dicho recipiente para formar una formulación de gel.

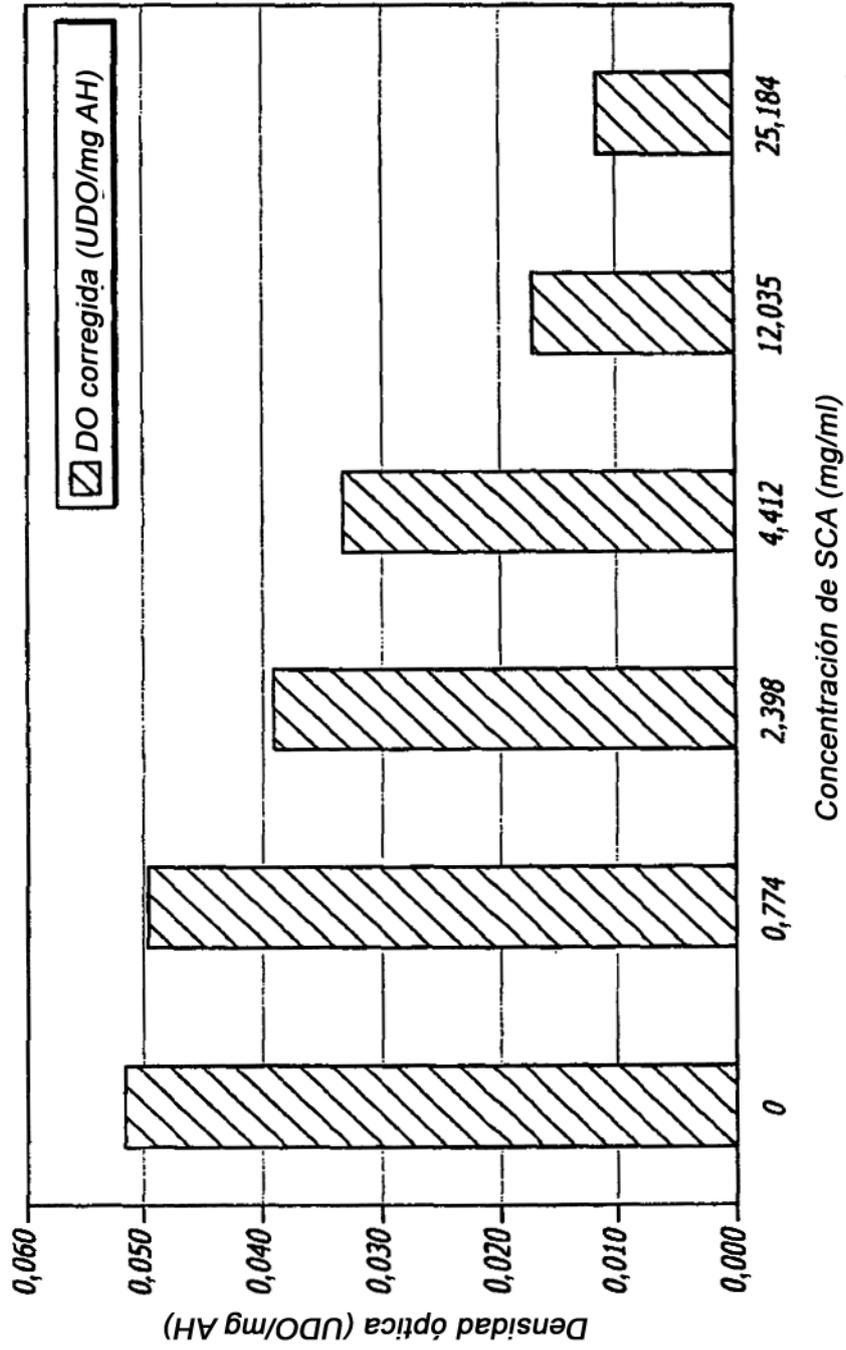


FIG. 1

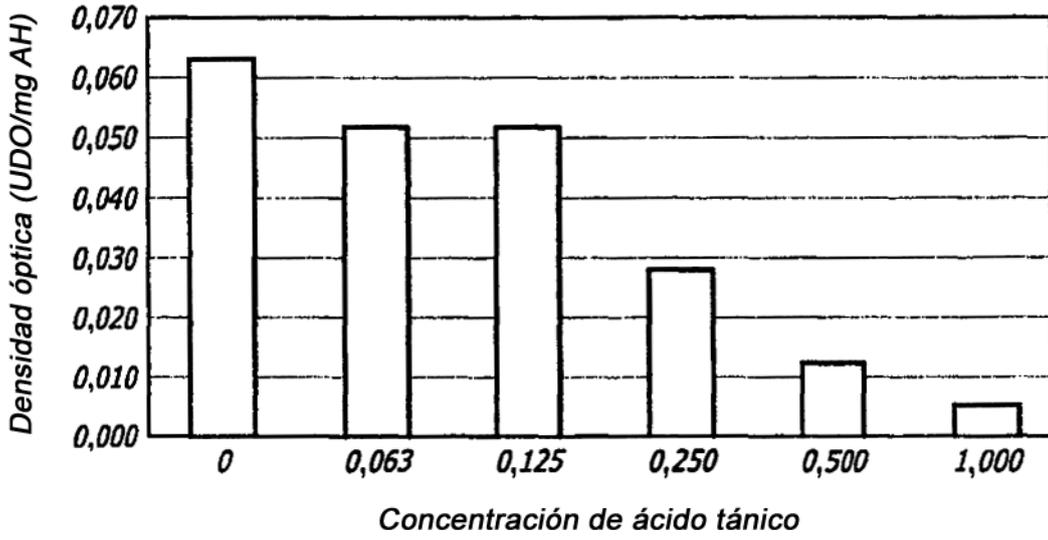


FIG. 2

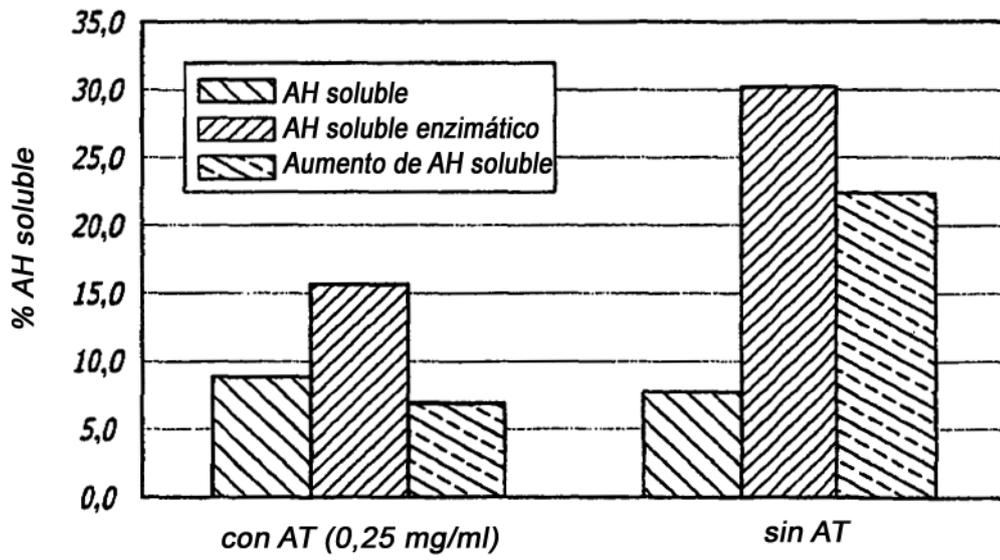


FIG. 4

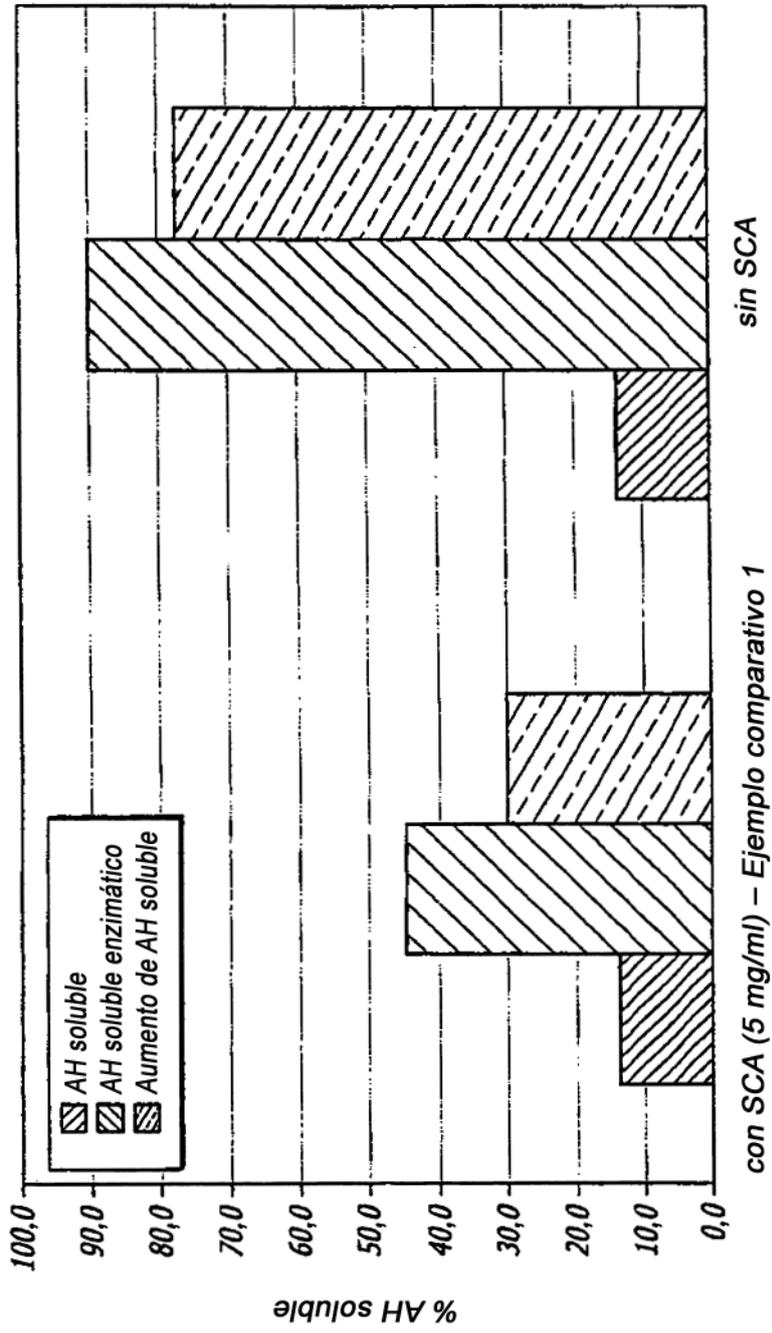


FIG. 3