

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 812**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/573** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

**C08J 3/075** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2011 PCT/CN2011/077985**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12031515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2011 E 11823038 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2614828**

54 Título: **Derivados de polímero alto, biocompatible, modificado con sulfhidrilo, de baja modificación, material reticulado del mismo y usos de dicho material**

30 Prioridad:

**09.09.2010 CN 201010277374**

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

**16.02.2017**

73 Titular/es:

**BIOREGEN BIOMEDICAL (CHANGZHOU) CO., LTD. (100.0%)  
East East Road 167, Building 5  
Changzhou, Jiangsu 213025, CN**

72 Inventor/es:

**SHU, XIAOZHENG;  
ZHONG, WEIPING;  
WANG, YUNYUN y  
YU, MEIXIA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 601 812 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

Derivados de polímero alto, biocompatible, modificado con sulfhidrido, de baja modificación, material reticulado del mismo y usos de dicho material

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un derivado de macromolécula biocompatible con un grado bajo de modificación, y particularmente a un derivado de macromolécula biocompatible, modificada con mercapto, que tiene un grado bajo de modificación con mercapto; la presente invención se refiere además a un material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro, que tiene un grado bajo de reticulación, y adicionalmente se refiere además a dicho material reticulado para uso en medicina.
- 10 Técnica antecedente
- 15 Las macromoléculas biocompatibles tienen muchas funciones fisiológicas importantes como los efectos significativos del ácido hialurónico en el tratamiento visco-suplementario de osteoartritis, promoción en la curación de heridas, etcétera. Sin embargo, las macromoléculas biocompatibles habitualmente se recambian muy rápidamente in vivo o se disuelven fácilmente en el fluido corporal lo cual limita en gran medida sus usos en muchas aplicaciones médicas. Por ejemplo, el curso de tratamiento visco-suplementario de ácido hialurónico para osteoartritis es una inyección en la rodilla cada semana durante cinco semanas consecutivas lo cual es inconveniente para los pacientes y para los trabajadores médicos y también incrementa el riesgo de infección. La modificación química, la reticulación o la reticulación después de la modificación, es el método efectivo para que las macromoléculas biocompatibles prolonguen su recambio y reduzcan su solubilidad in vivo, lo cual expande de modo significativo sus aplicaciones en la medicina clínica. Por ejemplo, en lo que
- 20 respecta al tratamiento visco-suplementario de osteoartritis, la eficacia de una inyección en la rodilla con hialuronato de sodio reticulado es igual a cinco inyecciones en la rodilla con el hialuronato de sodio no reticulado; además, el ácido hialurónico reticulado ha sido usado ampliamente para propósitos cosméticos como los rellenos dérmicos.
- Aunque la aplicación de las macromoléculas biocompatibles en medicina clínica ha sido expandida en gran medida por su modificación química y/o reticulación, aún existen conflictos entre la teoría y los procesos prácticos. Por una parte, para
- 25 prolongar su recambio y reducir su solubilidad in vivo las macromoléculas biocompatibles deben modificarse químicamente y/o reticularse hasta un cierto grado. Por lo tanto, todos aquellos derivados de macromolécula biocompatible, químicamente modificada y/o reticulada, o materiales reticulados de la misma, que se aplican ampliamente en la medicina clínica en la actualidad, tienen un alto grado, o relativamente alto grado, de modificación o de reticulación tal como el derivado altamente esterificado (100% de esterificación) de hialuronato de sodio (HYAFF, Fidia, Italia). Por otra parte, la estructura química de las macromoléculas biocompatibles cambia debido a la modificación química y/o al
- 30 reticulado, lo cual afecta y reduce su función fisiológica y propiedad biocompatible e incluso causa ciertos efectos secundarios. Por ejemplo, los resultados de estudios reportados por Jacob et al. mostraron que MeroGel® (a base de HYAFF altamente modificado) causó reacción inflamatoria y reacción de osificación (Jacob et al., Laryngoscope 112: 37-42, 2002).
- 35 Sin embargo, la mayor parte de la investigación actual todavía se enfoca en mejorar el grado de modificación y/o de reticulación para prolongar el recambio y reducir la solubilidad de la macromolécula biocompatible in vivo. En opinión de los inventores, la macromolécula biocompatible altamente modificada y/o reticulada no puede cumplir mejor los requisitos de las aplicaciones clínicas en un número considerable de casos e incluso puede causar tales efectos secundarios como una reacción inflamatoria, etcétera. Por lo tanto, la modificación química y/o la reticulación de la macromolécula
- 40 biocompatible tienen que estar balanceados entre los siguientes dos factores: reducir el grado de modificación química y/o de reticulación tanto como sea posible para que se mantengan la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad, y mientras tanto que se prolongue apropiadamente el recambio y se reduzca la solubilidad in vivo por la modificación química y/o la reticulación para cumplir los requisitos de las aplicaciones clínicas. Sin embargo, es un problema técnico balancear la modificación química y/o la reticulación de la macromolécula biocompatible entre los dos
- 45 factores anteriores.
- La modificación con mercapto y el reticulado con enlace de disulfuro de la macromolécula biocompatible es un nuevo método de modificación química y de reticulado y tiene muchas ventajas, por lo tanto, muchos usos potenciales importantes en la medicina clínica. Por ejemplo, los derivados de macromolécula biocompatible modificada con mercapto han sido utilizados en la modificación de actividad química de diversos medicamentos de moléculas pequeñas y
- 50 medicamentos de proteína de polipéptido, etcétera, y los materiales reticulados preparados a base de estos derivados de macromolécula biocompatible modificada con mercapto pueden usarse como una matriz de crecimiento celular, una matriz de curación y regeneración de heridas, un vehículo de liberación sostenida de medicamento, un vendaje para heridas, una matriz celular para incrustación in situ, etc. (Bernkop-Schnurch, WO2000/025823; Shu et al., Biomacromolecules, 3: 1304, 2002; Bulpitt et al., WO2002/068383; Prestwich et al., WO2004/037164; Prestwich et al., WO2005/056608; Prestwich et al., WO2008/008857; Song, WO2008/071058; Song, WO2008/083542; y Gonzalez et al., WO2009/132226).

En términos generales, se consideraba que se necesitaba un grado más alto de modificación con mercapto para la preparación del subsiguiente material reticulado del derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto y, por lo tanto, en las referencias divulgadas antes, tanto el grado de modificación con mercapto como el grado de reticulación de la macromolécula biocompatible son muy altos, tal como en el informe de Shu et al. en el cual 26.8%-66.8% de los grupos fueron modificados y reticulados (Shu et al., Biomacromoleculas, 3: 1304, 2002).

Divulgación de la presente invención

Problema técnico

Un problema técnico a resolverse por la presente invención es proporcionar un tipo de derivados de macromolécula biocompatible modificada con mercapto, con bajo grado de modificación con mercapto. Estos derivados de macromolécula biocompatible modificada con mercapto mantienen la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad de la macromolécula biocompatible original tanto como es posible, pero también permiten la preparación del material reticulado de macromolécula biocompatible con un bajo grado de reticulación mediante la reticulación química efectiva del grupo mercapto introducido.

Otro problema técnico a resolverse por la presente invención es proporcionar un material de macromolécula biocompatible, reticulada, enlazada a disulfuro, con un grado muy bajo de reticulación, enlazada a disulfuro. El material de la invención no solamente tiene la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad de la macromolécula biocompatible original, tanto como es posible, sino también prolonga su recambio y reduce su solubilidad in vivo, cumpliendo mejor los requisitos de diversas aplicaciones medicinales. Además, el material de macromolécula biocompatible, reticulada, enlazada a disulfuro, que permite que su proceso de reticulación se complete en un contenedor inyectable, es inyectable, conveniente para usar, libre de impurezas, biocompatible y libre de efectos secundarios tóxicos y de esta manera tiene perspectivas de aplicación muy amplias en el campo de la medicina.

Otro problema técnico a resolverse mediante la presente invención es proporcionar el material de macromolécula biocompatible, reticulada, enlazada a disulfuro, ya mencionado, para uso en medicina.

Solución técnica

Algunos de los términos usados en la presente invención se definen tal como sigue.

La macromolécula biocompatible se refiere a una macromolécula que tiene buena biocompatibilidad, que incluye polisacáridos, proteínas, macromoléculas sintéticas, etc., en cuyo caso los polisacáridos se seleccionan de sulfato de condroitina, dermatán, heparina, heparán, ácido hialurónico, sulfato de dermatán, pectina, carboximetil quitosán así como también las sales (por ejemplo sales de sodio y sales de potasio) de los mismos; las macromoléculas sintéticas se seleccionan de poli(ácido acrílico), poli(ácido aspártico), poli(ácido tartárico), poli(ácido glutámico), poli(ácido fumárico), así como también las sales (por ejemplo sales de sodio y sales de potasio) de los mismos; las proteínas se seleccionan de colágeno, gelatina alcalina, gelatina ácida, elastina, proteína de núcleo, laminina polisacárido, fibronectina, así como también las sales (por ejemplo sales de sodio y sales de potasio) de las mismas. La macromolécula biocompatible es preferiblemente sulfato de condroitina, heparina, heparán, ácido hialurónico, poli(ácido aspártico), poli(ácido glutámico), carboximetil quitosán, gelatina alcalina y gelatina ácida, así como también las sales (por ejemplo sales de sodio y sales de potasio) de los mismos, y más preferiblemente sulfato de condroitina y ácido hialurónico, así como también las sales (por ejemplo sales de sodio y sales de potasio) de los mismos.

El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto se refiere a derivado obtenido introduciendo químicamente un grupo mercapto al grupo de cadena lateral de la macromolécula biocompatible; y el grado de modificación de mercapto se refiere a un porcentaje de la cantidad del grupo mercapto introducido en la cantidad del grupo de cadena lateral disponible para modificación en la macromolécula biocompatible. Por ejemplo, cuando el grupo carboxilo de cadena lateral del ácido hialurónico se somete a modificación con mercapto, el grado de modificación con mercapto se refiere a un porcentaje de la cantidad del grupo mercapto en la cantidad total del grupo carboxilo de cadena lateral del ácido hialurónico.

El reticulado con enlace de disulfuro se refiere a que el derivado de macromolécula biocompatible modificado con mercapto forma una estructura reticular tridimensional a través del enlace de disulfuro; y el grado de reticulado de enlace de disulfuro se refiere a un porcentaje de la cantidad del grupo mercapto del derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que forma el enlace disulfuro en la cantidad del grupo de cadena lateral disponible para modificación en la macromolécula biocompatible.

El hidrogel se refiere a un composite que contiene mucha agua con una estructura de red de reticulación tridimensional que se encuentra entre líquida y sólida sin fluidez. La gelificación se refiere a un proceso por el cual el estado líquido con fluidez se convierte en gel sin fluidez.

Viscosidad dinámica se refiere a la fuerza por unidad de área de un líquido requerida para moverse una unidad de distancia a una unidad de velocidad, la cual tiene una unidad de centipoise (mPa·s) o poise (Pa·s). La viscosidad dinámica es un índice para evaluar la viscosidad; cuanto más pequeña es la viscosidad dinámica tanto mejor es la fluidez y viceversa.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un derivado de macromolécula biocompatible, modificada con mercapto, con un grado bajo de modificación con mercapto, que no solamente mantiene la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad de la macromolécula biocompatible tanto como es posible, sino que también permite la preparación del material reticulado de la macromolécula biocompatible con un grado bajo de reticulación mediante reticulación química efectiva con el grupo mercapto introducido.

10 En la presente invención, el derivado de macromolécula biocompatible modificado con mercapto, que tiene un grado bajo de modificación con mercapto, puede prepararse habitualmente mediante los siguientes métodos que han sido descritos en el documento de patente WO2009006780. Un primer método es la química de acoplamiento del grupo amino (hidrazida)/carbodiimida del grupo carboxilo de cadena lateral. La manera usual es tal como sigue: el grupo carboxilo se activa por carbodiimida para formar un producto intermedio que es seguido por sustitución nucleofílica con un enlace disulfuro que contiene diamino o dihidrazida para producir otro producto intermedio, y finalmente el enlace de disulfuro se reduce a grupo mercapto para obtener el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto (Shu et al., Biomacromolecules, 3, 1304, 2002; Aeschlimann et al., US 7,196,180B1). Una amina primaria que contiene el grupo mercapto libre (o una amina primaria protegida con mercapto) también puede usarse en lugar del enlace de disulfuro que contiene diamino o dihidrazida para obtener el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto o un producto intermedio con grupo protector mercapto que se desprotege retirando el grupo protector mercapto para obtener el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto (Gianolio et al., Bioconjugate Chemistry, 16, 1512, 2005). La carbodiimida anterior habitualmente se refiere a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato. Un segundo método es hacer la preparación por medio de una reacción directa del grupo carboxilo de cadena lateral con la carbodiimida que contiene el enlace de disulfuro (tal como 2,2'-ditiobis(N-etil-(N'-etilcarbodiimida))), con el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto preparada que tiene la estructura de la siguiente fórmula (III) (Bulpitt et al., US 6884788). Un tercer método es modificar el grupo amino de cadena lateral y generalmente se divide en dos vías, es decir modificación directa e indirecta. El método de modificación directa se refiere a introducir el grupo mercapto mediante la modificación directa del grupo amino de cadena lateral, tal como la modificación con mercapto del grupo amino de colágeno mediante el éster disuccínico bis-acilcistamina dicarbonil diimidazol activado (Yamauchi et al., Biomaterials, 22, 855, 2001; Nicolas et al., Biomaterials, 18, 807, 1997). En el tercer método, la modificación con mercapto indirecta del grupo amino generalmente se divide en dos pasos. El primer paso es la carboxilación del grupo amino, y el segundo paso es la modificación con mercapto del grupo carboxilo mediante el primero o el segundo métodos precedentes. Un cuarto método es la modificación del grupo hidroxilo de cadena lateral. La forma usual es que el grupo hidroxilo es carboxilado en condiciones básicas fuertes y luego el grupo carboxilo se modifica con mercapto de acuerdo con el primero método o el segundo método precedentes. Por ejemplo, el grupo hidroxilo de cadena lateral de tales macromoléculas como celulosa, ácido hialurónico, quitina y quitosán, puede ser carboximetilado y luego se modifica con mercapto mediante la reacción química del grupo amino (hidrazida)/carbodiimida.

Para la macromolécula biocompatible con uno o más tipos de grupo funcional (grupo carboxilo, grupo amino y grupo hidroxilo), uno o varios de los métodos anteriores pueden adoptarse para la preparación del derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto, de la presente invención.

40 En la presente invención, el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto, que tiene un grado bajo de modificación con mercapto se prepara mediante los métodos de preparación precedentes, y la presente invención puede entonces llevarse a cabo ajustando tales parámetros como la proporción de alimentación de los materiales de reacción, el tiempo de reacción y la temperatura de reacción, etc.

45 En la presente invención, la purificación del derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto es muy importante. Las impurezas residuales pueden producir no solamente efectos secundarios tóxicos, tales como inflamación in vivo, sino también interfieren con la subsiguiente reticulación enlazada a disulfuro. En la presente invención, las impurezas residuales pueden retirarse mediante diálisis y/o precipitación con solvente orgánico (por ejemplo etanol), etc.

50 En la presente invención, la macromolécula biocompatible adoptada tiene un peso molecular en un intervalo de 1,000-10,000,000 usualmente, preferiblemente de 10,000-3,000,000, más preferiblemente de 20,000-1,500,000.

55 En la presente invención, se mantiene la mayor parte de la estructura inicial de la macromolécula biocompatible, con un grado muy bajo de modificación con mercapto. El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención contiene al menos tres grupos mercapto en su cadena lateral, que tienen un grado de modificación con mercapto de  $\leq 4.5\%$ , preferiblemente  $0.5\%$ - $3.0\%$ , más preferiblemente  $0.75\%$ - $2.5\%$ .

Los investigadores generalmente tienen el prejuicio técnico respecto del derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto, que un grado superior de modificación con mercapto es esencial para la preparación del subsiguiente material reticulado y que cumple los requisitos de las aplicaciones clínicas. Por ejemplo, la investigación de Prestwich et al. mostraron que solamente el derivado de macromolécula biocompatible con un alto grado de modificación con mercapto podía rearticularse bien (Prestwich et al., WO2008/008857). Por lo tanto, los investigadores tienden por lo general a mejorar el grado de modificación con mercapto de la macromolécula biocompatible. En 1983, Sparer et al. divulgaron los derivados de glicosaminoglicano éster metílico de (ácido hialurónico y sulfato de condroitina)-cisteína, en cuyo caso el éster metílico de cisteína estaba acoplado con el glicosaminoglicano a través de un enlace de amida, y 5%-87% del grupo carboxilo de cadena lateral del glicosaminoglicano fue modificado en un grupo mercapto (Sparer et al., capítulo 6, páginas 107-119, Controlled Release Delivery System, editado por Theodore J. Roseman y S.Z. Mansdorf, Marcel Dekker Inc.). En 2005 Gianolio et al. divulgaron el derivado de ácido hialurónico-cisteamina, en cuyo caso la cisteamina estaba acoplada con el grupo carboxilo de cadena lateral del ácido hialurónico por medio de un enlace de amida y 22% del grupo carboxilo de cadena lateral del ácido hialurónico fue modificado en el grupo mercapto (Gianolio et al., Bioconjugate Chemistry, 16: 1512-1518, 2005). En 2008 Yin et al. divulgaron el derivado de ácido hialurónico-cisteamina, en cuyo caso la cisteamina estaba acoplada con el grupo carboxilo de cadena lateral del ácido hialurónico a través de un enlace de amida, el derivado contenía tanto 10-200 mmol/g de grupos mercapto, como también 120-500 mmol/g de enlace de disulfuro, y el grado de modificación con mercapto fue de 10%-48% calculado con base en que la unidad de repetición de disacárido del ácido hialurónico tenía un peso molecular de 400 (es decir 10%-48% del grupo carboxilo de cadena lateral del ácido hialurónico fue modificada con mercapto) (Yin et al., CN 101367884). El derivado de ácido hialurónico modificado con mercapto, acoplado por medio del enlace de hidrazida, divulgado por Shu et al. tenía un grado de modificación con mercapto de 26.8%-66.8% (Shu et al., Biomacromolecules, 3: 1304, 2002).

Sin embargo, cuando el grado de modificación con mercapto es alto, la estructura inicial de la macromolécula biocompatible se modifica creativamente lo cual puede comprometer su función fisiológica y biocompatibilidad. Por ejemplo, los resultados de la investigación de Wang et al. mostraron que el derivado de quitosán modificado con mercapto produjo toxicidad celular significativa a un alto grado de modificación con mercapto (Wang et al., Chemical Journal of Chinese Universities, 29: 206-211, 2008). La presente investigación también mostró que el alto grado de modificación con mercapto cambió la estructura del ácido hialurónico e interfirió en el enlazamiento con su receptor (por ejemplo CD44).

En la presente invención, el derivado de macromolécula biocompatible modificado con mercapto que tenía un bajo grado de modificación con mercapto fue purificado mediante uno más de los métodos anteriores con las impurezas residuales usualmente menores que 1/1,000 e incluso que 1/10,000 (contenido en peso).

La presente invención tiene los siguientes efectos ventajosos: el derivados de macromolécula biocompatible modificada con mercapto con un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención tiene un muy bajo grado de modificación con mercapto, no sólo manteniendo la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad de la macromolécula biocompatible tanto como es posible, sino también teniendo tales características como el bajo consumo de materias primas y un tiempo breve de reacción. Además, el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención pueden usarse convenientemente en la preparación de materiales reticulados y cumpliendo los requisitos de diversas aplicaciones clínicas. Además, la presente invención también supera el prejuicio técnico precedente de que un alto grado de modificación con mercapto es esencial para la preparación del subsiguiente material reticulado del derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto y cumple los requisitos de las aplicaciones clínicas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un material de macromolécula biocompatible reticulada, enlazada con disulfuro, con un muy bajo grado de reticulación enlazada con disulfuro, que no solamente mantiene la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad de la macromolécula biocompatible tanto como es posible, sino también prolonga su recambio y reduce la solubilidad in vivo, cumpliendo mejor los requisitos de diversas aplicaciones clínicas. El material de macromolécula biocompatible reticulada, enlazada con disulfuro de la presente invención usualmente está presente en forma de hidrogel que tiene un contenido de agua preferiblemente de más de 95% (p/v, g/ml), y más preferiblemente de más de 98% (p/v, g/ml). El hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención puede hacerse en diversas formas sólidas tales como película esponja después de secarse o liofilizarse.

El hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención fue hecha a partir del derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención. Un primer método de preparaciones tal como sigue: el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto, que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención, se disuelve en agua para obtener una solución de una concentración adecuada (habitualmente de 0.2%-5.0%), la cual se ajusta a un valor de pH específico (habitualmente neutro, es decir un valor de pH de aproximadamente 7) y luego el grupo mercapto se oxida bajo la acción del oxígeno en el aire y el oxígeno disuelto en la solución para formar gradualmente el enlace de disulfuro, lo que hace que la solución se gelatine gradualmente y se incremente gradualmente la viscosidad dinámica de la solución, lo que hace finalmente de la solución pierda fluidez para formar una estructura de red reticulada

tridimensional. Un oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno) puede agregarse además a la solución anterior para acelerar el proceso de reticulación.

5 Un segundo método de preparación del hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención es usar el método divulgado por Shu et al. (WO2010043106). En este método, el proceso de gelificación puede completarse en un contenedor inyectable y el gel tiene la ventaja de permitir la inyección, el uso conveniente, sin impurezas, con buena biocompatibilidad, sin efectos secundarios tóxicos, etc. Este método es específicamente tal como sigue: el derivado de macromolécula biocompatible modificado con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención se disuelve en agua para obtener una solución de una concentración adecuada (habitualmente de 0.2%-5.0%), la cual se ajusta a un valor de pH específico (habitualmente neutro), y luego la solución se envasa en un contenedor inyectable y se sella, y el grupo mercapto forma gradualmente el enlace de disulfuro principalmente bajo la acción de la oxidación del oxígeno disuelto en la solución, lo que hace que la solución se gelatine gradualmente y se incremente gradualmente la viscosidad dinámica de la solución, lo cual hace finalmente que la solución pierda fluidez para formar una estructura reticulada de red tridimensional. Un oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno) puede agregarse además a la solución anterior para acelerar el proceso de reticulación.

15 Un procedimiento aséptico o un procedimiento de esterilización terminal (por ejemplo el procedimiento de esterilización al calor húmedo usado comúnmente en la industria farmacéutica) pueden adoptarse en la producción cuando se adopta el segundo método de preparación del hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención para cumplir los diferentes requisitos de la medicina clínica. La línea de producción para llenado, utilizada comúnmente en la industria farmacéutica, puede usarse para realizar la producción a gran escala industrial con un rendimiento por hora que fácilmente es de más de 3000 unidades. La línea de producción de llenado puede seleccionarse de una línea de producción de pre llenado de jeringa completamente automática en línea recta o una máquina de pre llenado y taponado completamente automática de jeringa de colmena, fabricada por la compañía Groninger, y una máquina de llenado del líquido en jeringa pre-esterilizada, fabricada por la compañía Bosch de Alemania, etc.. El contenedor inyectable puede ser una jeringa hecha de vidrio o de plástico, tal como la jeringa de pre-esterilización Hypak SCF fabricada por la compañía BD, y la jeringa también puede reemplazarse por tales contenedores extrudibles como una bolsa plástica blanda.

30 En el hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada de enlace de disulfuro de la presente invención, el derivado de macromolécula biocompatible modificado con mercapto, que tiene un bajo grado de modificación con mercapto de la presente invención, se utiliza como materia prima y el grado de reticulación enlazada con disulfuro depende del grado de modificación con mercapto ( $\leq 4.5\%$ ); por lo tanto, el hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención también tiene un grado muy bajo de reticulación enlazada con disulfuro ( $\leq 4.5\%$ ). Habitualmente más de la mitad de los grupos diol en el hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención se oxida para producir el enlace de disulfuro, lo cual da lugar a la formación de la estructura de red reticulada tridimensional, pérdida de fluidez de la solución líquida y la muy alta viscosidad dinámica. Comparada con la solución no reticulada, la viscosidad dinámica del hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención se incrementa habitualmente en más de 50 veces y puede incrementarse en más de 500 veces en condiciones óptimas. El hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención tiene tales características que tiene una ventaja única en tales aplicaciones clínicas importantes como la prevención y el control de adhesión post-operativa y el tratamiento visco-suplementario de osteoartritis.

40 La viscosidad dinámica del hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención se midió con un viscosímetro de rotación a una tasa de cizallamiento de no menos de 0.25 Hz y una temperatura de  $25 \pm 0.1$  °C de acuerdo con el segundo método en el Apéndice VI G de la Farmacopea de la República Popular China (segunda parte, edición de 2005), y típicamente es de más de 10,000 centipoises (mPa·s), preferiblemente mayor que 25,000 centipoises (mPa·s), y más preferiblemente mayor que en 40,000 centipoises (mPa·s).

50 El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención puede contener uno o más derivados de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tienen un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención, así como también una o más de otras sustancias. Estas sustancias pueden ser polisacáridos, proteínas o macromolécula sintéticas tales como sulfato de condroitina, heparina, heparán, ácido alginico, ácido hialurónico, poli (ácido aspártico), poli (ácido glutámico), quitosán, carboximetil-quitosán, colágeno, gelatina alcalina y gelatina ácida y como también las sales (por ejemplo sales de sodio y sales de potasio) y derivados de los mismos, preferiblemente hialuronato de sodio, sulfato de condroitina, heparina sódica, gelatina alcalina y gelatina ácida, etc., y más preferiblemente hialuronato de sodio, sulfato de condroitina y heparina sódica; estas sustancias también pueden ser ingredientes activos que incluyen esteroides, antibióticos, medicamentos para el tratamiento de tumores y diversos medicamentos de proteína de polipéptidos tales como hormonas corticales (de esteroides), por ejemplo beclometasona, dipropionatos de beclometasona, budesonide, dexametasona, prednisolone, y prednisone; nuevamente como diversos medicamentos de proteína de polipéptido, por ejemplo diversos factores de crecimiento (un factor de crecimiento alcalino, un factor de crecimiento ácido, un factor de crecimiento de vaso sanguíneo, un factor de crecimiento de osificación, etc.),

y ácidos nucleicos (por ejemplo ARN). Estos ingredientes activos pueden dispersarse y/o disolverse en forma de partículas sólidas en el material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención.

5 En la presente aplicación en el campo de la medicina se requiere que el hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro debe tener una vida útil de almacenamiento apropiada, y sus propiedades deben ser estables. Sin embargo, el hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro que tiene un alto grado de modificación no es estable, el hidrogel se contrae gradualmente de modo que se extrae una gran cantidad de agua del hidrogel mientras se incrementa el tiempo de almacenamiento lo cual hace que la viscosidad dinámica se reduzca en gran medida y afecte seriamente las propiedades de gel, por lo cual no se cumplen las necesidades de las aplicaciones clínicas prácticas y se restringe seriamente la aplicación del hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro en el campo de la medicina. Por ejemplo, el volumen del hidrogel se contrae en aproximadamente 30% después que el hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro (que tiene un grado de modificación con mercapto de 13.5%) ha sido almacenado a temperatura ambiente durante seis meses.

10 El hidrogel de macromolécula biocompatible reticulado enlazado con disulfuro de la presente invención fue hecho a partir del derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención, los efectos técnicos inesperados se lograron y el problema anterior de inestabilidad del hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro fue resuelto. Los ensayos de estabilidad acelerada de seis meses mostraron que el hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro tenía buena estabilidad, lo cual se describirá adicionalmente con referencia a los ejemplos.

15 La presente invención tiene los siguientes efectos ventajosos: el material de macromolécula biocompatible reticulado enlazado con disulfuro de la presente invención, que tiene un muy bajo grado de reticulación, no sólo mantiene la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad de la macromolécula biocompatible tanto como es posible, sino que también tiene la viscosidad dinámica muy alta, prolonga efectivamente el recambio y reduce la solubilidad de la macromolécula biocompatible in vivo, cumple mejor los requisitos de diversas aplicaciones clínicas. La presente invención tiene además el siguiente efecto técnico ventajoso de que el hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención tiene buena estabilidad.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona además la aplicación del anterior material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro en el campo de la medicina.

25 Las aplicaciones del material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención en medicina incluyen los siguientes aspectos: puede usarse como vendaje para heridas en la piel u otras heridas para promover la curación de heridas; también puede usarse para prevenir adhesión lo cual incluye la adhesión fibrosa entre tejidos u órganos después de cirugía (por ejemplo, cirugía de sinusitis); también puede usarse en el tratamiento viscosuplementario de osteoartritis como un lubricante de rodilla.

30 Las aplicaciones del material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro, preparada mediante la presente invención en farmacia incluyen que puede usarse como un vehículo de liberación sostenida para diversas sustancias terapéuticas activas para realizar liberación sostenida. Las sustancias terapéuticas activas pueden ser un medicamento químico o un factor biológicamente activo, que incluyen antiflogísticos, antibióticos, analgésicos, anestésicos, promotores de curación de heridas, promotores o inhibidores de crecimiento celular, inmuno-estimulantes, medicamentos antivirales, etc.

#### Efectos ventajosos

35 La presente invención tiene los siguientes efectos ventajosos: el derivado de macromolécula biocompatible modificado con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención tiene un muy bajo grado de modificación con mercapto, manteniendo no solamente la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad tanto como es posible sino también teniendo características tales como consumo bajo de materia prima y un presupuesto de breve tiempo de reacción. Además, el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de la presente invención puede usarse de manera conveniente en la preparación de materiales reticulados y cumpliendo los requisitos de diversas aplicaciones clínicas. Además, la presente invención también supera el prejuicio técnico precedente de que un alto grado de modificación con mercapto es esencial para la preparación del subsiguiente material del derivado de macromolécula biocompatible reticulada modificada con mercapto y para cumplir los requisitos de las aplicaciones clínicas.

40 La presente invención tiene los siguientes efectos ventajosos: el material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención, que tiene un muy bajo grado de reticulación, no sólo mantiene la estructura inicial, la función fisiológica y la biocompatibilidad de la macromolécula biocompatible tanto como es posible, sino que también tiene la viscosidad dinámica muy alta, prolongue efectivamente el recambio y reduce la solubilidad de la macromolécula biocompatible in vivo, cumple mejor los requisitos de diversas aplicaciones clínicas. La presente

invención también tiene el siguiente efecto técnico ventajoso de que el hidrogel de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención tiene buena estabilidad.

Descripción del dibujo

5 La Fig. 1 es un diagrama esquemático de los resultados experimentales del ejemplo 12 de la presente invención (es decir un diagrama de distribución de peso de una pata trasera izquierda).

Mejor modo

Modo para invención

Los siguientes ejemplos pueden hacer que aquellos versados en la técnica entiendan más completamente la presente invención.

10 Ejemplo 1: Preparación y caracterización del derivado de ácido hialurónico modificado con mercapto

La preparación fue hecha de acuerdo con el método divulgado por Shu et al. en *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002. Se adionó dehidrazida ditiopropiónica a una solución de ácido hialurónico (11.9 g) en agua destilada (2L). La mezcla fue agitada hasta disolverse. Después se ajustó el valor de pH de la solución a 4.75 con ácido clorhídrico de 0.1 mol/L; se adionó una cierta cantidad de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDCI) (Aldrich, Estados Unidos) de acuerdo con la tabla 1 con agitación electromagnética. Se adionó continuamente una cantidad de ácido clorhídrico de 0.1 mol/L a la solución anterior para mantener la solución a pH 4.75. La reacción se terminó adionando hidróxido de sodio de 1.0 mol/L para ajustar el valor de pH 7.0. Después se adionaron 100 g de ditiotreitól (Diagnostic Chemical Limited, Estados Unidos) y una cantidad de hidróxido de sodio de 1.0 mol/L con agitación. El valor de pH de la solución se ajustó a 8.5. La reacción se agitó de modo electromagnético a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego se adionó ácido clorhídrico de 1 mol/L a la solución anterior hasta un pH de 3.0. La solución anterior se cargó a un tubo de diálisis (corte de peso molecular (MWCO) de 3,500, Sigma, Estados Unidos), y fue sometida a diálisis durante 5 días frente a gran cantidad de ácido clorhídrico de 0.001 mol/L y cloruro de sodio de 0.2 mol/L; el dializado se cambiaba cada 8 horas; luego la solución se sometió nuevamente a diálisis por 3 días frente a gran cantidad de ácido clorhídrico de 0.001 mol/L, y el dializado se cambiaba cada 8 horas. Finalmente, la solución en el tubo de diálisis se recogió para aplicación directa o liofilización para producir un sólido en forma de flóculos.

El contenido el grupo mercapto fue detectado mediante el método modificado de Ellman, reportado por Shu et al. en *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 y el grado de modificación con mercapto fue calculado, o el grado de modificación con mercapto fue medido usando resonancia magnética nuclear de espectro de hidrógeno ( $^1\text{H-RMN}$ ) (con  $\text{D}_2\text{O}$  en calidad de solvente) (tomando el pico de absorción del grupo metilo característico del grupo acetilo de ácido hialurónico como el estándar interno). El grado de modificación con mercapto se refiere a un porcentaje de la cantidad del grupo mercapto en la cantidad total del grupo carboxilo de cadena lateral del ácido hialurónico, con los resultados de medición tal como sigue:

Tabla 1: Grado de modificación con mercapto

Número de serie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cantidad de alimentación de EDCI (g)	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	2.4	9.6
Grado de modificación con mercapto (%)	0.48	1.04	1.46	2.33	3.24	4.18	4.61	10.6	37

Ejemplo 2: Preparación y caracterización del derivado de sulfato de condroitina modificado con mercapto

35 1 g sulfato de condroitina (tipo c, de cartílago de tiburón, Sigma, Estados Unidos) fue disuelto en 100 ml de agua destilada para dar una solución clara y transparente. A la solución se adionaron 0.6 gramos de dihidrazida ditiopropiónica. La mezcla se agitó hasta disolverse. Luego se ajustó el valor de pH de la solución a 4.75 con ácido clorhídrico de 0.1 mol/L y se adionó cierta cantidad de 2-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDCI) (Aldrich, Estados Unidos) de acuerdo con la tabla 2 con agitación electromagnética. Se adionó continuamente una cantidad de ácido clorhídrico de 0.1 mol/L a la solución anterior para mantener la solución a pH 4.75. La solución se agitó de modo electromagnético durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se adionaron 10 g de ditiotreitól (Diagnostic Chemical Limited, Estados Unidos) y un poco de hidróxido de sodio de 0.1 mol/L con agitación. Entretanto, continuamente fue adionado hidróxido de sodio de 0.1 mol/L para mantener la solución a pH 8.5, y la solución fue agitada de modo electromagnético durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego se agregó ácido clorhídrico de 6 mol/L a la solución anterior hasta pH 3.0. La solución anterior se cargó a tubo de diálisis (del MWCO de 2,000, Sigma, Estados Unidos), y fue sometida a diálisis durante 5 días frente a 2 L de solución de ácido clorhídrico (0.001 mol/L) y cloruro de sodio (0.3 mol/L), y el dializado se



cambió cada 8 horas; luego la solución se sometió a diálisis nuevamente por 3 días frente a 2 L de ácido clorhídrico (0.001 mol/L), y el dializado se cambió cada 8 horas. Finalmente la solución en el tubo de diálisis fue recogida para aplicación directa o liofilización para dar sólido blanco en forma de flóculos.

5 El contenido del grupo mercapto fue detectado mediante el método modificado de Ellman reportado por Shu et al. en Biomacromolecules, 3, 1304, 2002 y fue calculado el grado de modificación con mercapto, o fue medido el grado de modificación con mercapto usando la resonancia magnética nuclear de espectro de hidrógeno (<sup>1</sup>H-RMN) (con D<sub>2</sub>O en calidad de solvente) (tomando el pico de absorción del grupo metilo característico del grupo acetilo de sulfato de condroitina como el estándar interno). El grado de modificación con mercapto se refiere a un porcentaje de la cantidad del grupo mercapto en la cantidad total del grupo carboxilo de cadena lateral del sulfato de condroitina, con los resultados de medición tal como sigue:

Tabla 2: Grado de modificación con mercapto

Número de serie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cantidad de alimentación de EDCI (g)	0.01	0.015	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.12	0.48
Grado de modificación con mercapto (%)	0.88	1.54	1.96	3.33	4.50	5.18	6.81	15.6	42.1

Ejemplo 3: Preparación y caracterización del derivado de ácido hialurónico modificado con mercapto

15 Se adicionaron sal sódica de sulfo-N-hidroxi succinimida (Sulfo-NHS), cistamina diclorhidrato (CYS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDCI) a una solución de ácido hialurónico (10 g) en agua destilada (1L) respectivamente de acuerdo a las cantidades en la tabla 3. La mezcla fue agitada hasta disolverse. Luego se ajustó el valor de pH de la solución a 4.5-6.5 con ácido clorhídrico de 0.1 mol/L con agitación electromagnética para hacer reaccionar por un período de tiempo. Continuamente se adicionó una cantidad de ácido clorhídrico de 0.1 mol/L a la solución anterior para mantener la solución a pH 4.5-6.5. La reacción fue terminada adicionando hidróxido de sodio de 20 1.0 mol/L para ajustar el valor de pH a 8.5. Luego se adicionaron con agitación 50 g de ditiotreitol (Diagnostic Chemical Limited, Estados Unidos) y una cantidad de hidróxido de sodio de 1.0 mol/L. El valor de pH de la solución fue ajustado a 8.5. La solución fue agitada de modo electromagnético durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego se adicionó ácido clorhídrico de 1 mol/L a la solución anterior hasta un pH de 3.0. La solución anterior fue cargada a tubo de diálisis (el MWCO de 3,500, Sigma, Estados Unidos), y fue sometida a diálisis por 5 días frente a gran cantidad de ácido clorhídrico de 0.001 mol/L y cloruro de sodio de 0.5 mol/L, y el dializado cambió cada 8 horas; luego la solución se sometió a diálisis nuevamente durante 3 días frente a gran cantidad de ácido clorhídrico de 0.001 mol/L, y el dializado cambio cada 8 horas. Finalmente, se recogió la solución en el tubo de diálisis para aplicación directa o liofilización para producir un sólido blanco en forma de flóculos.

30 El contenido del grupo mercapto fue detectado mediante el método modificado de Ellman reportado por Shu et al. en Biomacromolecules, 3, 1304, 2002 y se calculó el grado de modificación con mercapto, o se midió el grado de modificación con mercapto usando la resonancia magnética nuclear del espectro de hidrógeno (<sup>1</sup>H-RMN) (con D<sub>2</sub>O en calidad de solvente) (tomando el pico de absorción del grupo metilo característico del grupo acetilo de ácido hialurónico como estándar interno). El grado de modificación con mercapto se refiere a un porcentaje de la cantidad del grupo mercapto en la cantidad total del grupo carboxilo de cadena lateral del ácido hialurónico, con los resultados de medición tal como sigue:

35 Tabla 3: Grado de modificación con mercapto

Número de serie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sulfo-NHS (g)	5.43	21.62	5.43	11.62	2.72	10.86	21.62	5.43	5.43
CYS (g)	22.6	11.3	33.9	17	5.625	22.6	11.3	22.6	11.3
EDCI (g)	4.8	9.6	4.8	2.4	2.4	1.2	1.2	2.4	0.72
Tiempo de reacción (horas)	12	3	1	1	1	1	8	8	8
Grado de modificación con mercapto (%)	13.5	4.83	1.54	0.84	0.73	0.51	2.14	3.97	1.28

Ejemplo 4: Preparación del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro

40 Los dos tipos de derivado de ácido hialurónico modificado con mercapto preparados en el ejemplo 1 (que tienen un grado de modificación con mercapto de 2.33% y 4.18%, y se indican como los Nos. 4 y 6 en la Tabla 1, respectivamente) fueron disueltos para dar una solución de 10 mg/ml, una solución de 15 mg/ml y una solución de 20 mg/ml, respectivamente, con los valores de pH ajustados a 7.4. Las anteriores soluciones (2 ml) se transfirieron a botellas de vidrio de 10 ml y se

sellaron respectivamente y reposar una temperatura ambiente por una semana. De esta manera las soluciones perdieron su fluidez y formaron los hidrogeles reticulados y el contenido de agua de los hidrogeles (g/ml) fue respectivamente de 99%, 98.5% y 98%.

Ejemplo 5: Preparación del hidrogel de sulfato de condroitina reticulado enlazado con disulfuro

- 5 El derivado de sulfato de condroitina modificado con mercapto, preparado en el ejemplo 2 (que tiene un grado de modificación con mercapto de 4.50%, y se indica cómo No. 5 en la Tabla 2) fue disuelto para dar una solución de 50 mg/ml y una solución de 80 mg/ml, respectivamente, con los valores de pH ajustados a 7.4. Las anteriores soluciones (2 ml) fueron transferidas a botellas de vidrio de 10 ml y selladas respectivamente, y reposar una temperatura ambiente por una semana. De esta manera, las soluciones perdieron su fluidez y formaron los hidrogeles reticulados y el contenido de agua de los hidrogeles (g/ml) fue respectivamente de 95% y 92%.

Ejemplo 6: Preparación del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro

- 15 Los cuatro tipos de derivados de ácido hialurónico modificado con mercapto, preparados en el ejemplo 3 (que tienen un grado de modificación con mercapto de 1.28%, 1.54%, 2.14% y 3.97%, y se indican como los Nos. 3, 7, 8 y 9 en la Tabla 3, respectivamente) fueron disueltos para dar una solución de 5 mg/ml solution, una solución de 7.5 mg/ml y una solución de 10 mg/ml, respectivamente, con los valores de pH ajustados a 7.4. Las anteriores soluciones (2 ml) fueron transferidas a botella de vidrio de 10 ml y selladas respectivamente y reposaron a temperatura ambiente durante 10 días. De esta manera las soluciones perdieron su fluidez y formaron los hidrogeles reticulados y el contenido de agua de los hidrogeles (g/ml) fue respectivamente de 99.5%, 99.25% y 99%.

Ejemplo 7: Preparación de hidrogel de ácido hialurónico o reticulado enlazado con disulfuro

- 20 El derivado de ácido hialurónico modificado con mercapto, preparado en el ejemplo 3 (que tiene un grado de modificación con mercapto de 2.14%, y se indica cómo el No. 7 en la Tabla 3) fue disuelto para dar una solución de 10 mg/ml y luego se adicionaron la solución de ácido hialurónico (5 mg/ml) y la solución de sulfato de condroitina (10 mg/ml) de acuerdo con una proporción del volumen de 2:1, respectivamente, con el valor de pH ajustado a 7.4. 2 ml de la solución anterior fue transferida a una botella de vidrio de 10 ml y sellada, y reposó a temperatura ambiente durante 10 días. De esta manera la solución perdió su fluidez informó el hidrogel reticulado.

Ejemplo 8: Medición de viscosidad dinámica del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro

- 30 La viscosidad dinámica del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro, preparado en el ejemplo 6, fue medida con un viscosímetro de rotación a una tasa de cizallamiento de no menos de 0.25 Hz y una temperatura de 25 ± 0.1 °C de acuerdo con el segundo método en el Apéndice VI G del volumen II, Farmacopea de la República Popular China (Edición de 2005), con los resultados tal como se muestran en la tabla 4. La viscosidad dinámica del hidrogel reticulado fue incrementada en 408-547 veces en comparación con la solución correspondiente de ácido hialurónico no modificado.

Tabla 4. Viscosidad dinámica (mPa·s)

Concentración de ácido hialurónico (mg/ml)	Grado de modificación con mercapto (%) 0	Grado de modificación con mercapto (%) 1.28	Grado de modificación con mercapto (%) 1.54	Grado de modificación con mercapto (%) 2.14	Grado de modificación con mercapto (%) 3.97
5	137	75000	78000	81000	88000
7.5	198	> 100000	> 100000	>100000	>100000
10	245	> 100000	> 100000	>100000	>100000

Ejemplo 9: Preparación y ensayo de estabilidad del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro

- 35 Hidrogel 1: El derivado de ácido hialurónico modificado con mercapto, preparado en el ejemplo 3 (que tiene un grado de modificación con mercapto de 13.5%, y se indica cómo el No. 1 en la Tabla 3) fue disuelto para dar una solución de 10 mg/ml, con el valor de pH ajustado a 7.4. 2 ml de la solución anterior se transfirieron a una botella de vidrio de 10 ml y se selló, y reposó a temperatura ambiente por 10 días. De esta manera la solución perdió su fluidez informó el hidrogel reticulado.
- 40 Hidrogel 2: El hidrogel preparado en el ejemplo 6 (el derivado modificado con mercapto de ácido hialurónico, preparado en el ejemplo 3, que tiene una concentración de ácido hialurónico de 10 mg/ml y un grado de modificación con mercapto de 1.54%, se indica como el No. 3 en la Tabla 3).

De esta manera es claro que el grado de modificación con mercapto de la materia prima de Hidrogel 2 (es decir 1.54%) es obviamente más bajo que el de la materia prima de Hidrogel 1 (es decir 13.5%); es decir, el grado de reticulación del hidrogel 2 es obviamente más bajo que el del hidrogel 1.

5 Ensayo de estabilidad: se realizó un ensayo de estabilidad acelerada en los hidrogeles de acuerdo con el Principio Guía de Ensayo de Estabilidad de Sustancias Medicamentosas y Producto Medicamentoso, tal como está dispuesto en XIX C de volumen II, Farmacopea China, edición de 2010, con la temperatura mantenida a  $40 \pm 2$  °C por 6 meses; el muestreo y la medición de la viscosidad dinámica y el porcentaje de contracción (%) del hidrogel al final de 0, 1, 2, 3 y 6 meses durante el ensayo, con los resultados tal como se muestran en la tabla 5. Para el hidrogel 1 que tiene un alto grado de reticulación, para el cual se realizaron ensayos de estabilidad acelerada, la viscosidad dinámica se redujo de manera pronunciada y el volumen del gel disminuyó de manera consecutiva; el volumen del gel tuvo un porcentaje que disminuía en 10.2%, 35.1%, 39.2% y 41.4% respectivamente después de 1, 2, 3 y 6 meses, con una gran cantidad de agua extraída del gel. Mientras que el hidrogel 2 tenía un bajo grado de reticulación según la presente invención mantuvo una buena estabilidad.

Tabla 5: Resultados de ensayos de estabilidad

		Tiempo (mes) 0	Tiempo (mes) 1	Tiempo (mes) 2	Tiempo (mes) 3	Tiempo (mes) 6
Hidrogel 1	Viscosidad dinámica	> 100000	8750	< 5000	< 5000	< 5000
Hidrogel 1	Porcentaje de contracción (%)	0	10.2	35.1	39.2	41.4
Hidrogel 2	Viscosidad dinámica	> 100000	> 100000	> 100000	> 100000	> 100000
Hidrogel 2	Porcentaje de contracción (%)	0	0	0	0	0

15

Ejemplo 10: El hidrogel de ácido hialurónico o reticulado enlazado con disulfuro para prevenir estenosis de ostium de seno después de la cirugía de sinusitis

10 conejos blancos machos, pasteurizados de Nueva Zelanda, con un peso de 3.5-4.0 kg fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de ketamina (35 mg/kg) y toluolzosin (5 mg/kg). Después de pelar el lado trasero externo de sus narices, los conejos fueron desinfectados con yodo y luego anestesiados con un líquido mezclado de 3 ml de lidocaína al 1% y adrenalina 1:100,000. En condiciones asépticas se hizo una incisión perpendicular de 2.5 mm a lo largo de la línea media y los tejidos blandos y el periósteo cubierto sobre el genianthro se levantaron se separaron. La pared anterior del genianthro se abrió con un taladro eléctrico quirúrgico y se quebró entre la pared media del genianthro y la cavidad nasal con un taladro de corte esférico de 4 mm, formando de esta manera un ostium cilíndrico de 4 mm de diámetro sin mucosa en el borde. 5 conejos en ambos lados del ostium se llenaron con el hidrogel preparado en el ejemplo 6 (que tenía una concentración de ácido hialurónico de 10 mg/ml, y un grado de modificación con mercapto de 1.54%) (el grupo tratado), y los otros 5 conejos en sus ambos lados del ostium se llenaron con nada (el grupo de control). Luego, el periósteo fue suturado de manera interrumpida con una sutura absorbible y la piel fue suturada con una sutura absorbible para sellar el genianthro. No se autorizó otro vendaje. Los animales fueron alimentados con dieta normal y agua potable después de la operación.

Los conejos fueron sacrificados después de dos semanas. Se hizo una incisión en la herida curada después de la muerte para exponer la cavidad del seno. El residuo en la cavidad deceno fue lavada con agua y se succionó suavemente con extractor. La pared media del seno se inspeccionó con un endoscopio nasal de 30° y se registró. Cada ostium fue medido con una regla de escala milimétrica. Se observó el ostium y se midió mediante el método doble-ciego. El ostium en el grupo tratado tenía un diámetro de  $2.78 \pm 1.17$  mm, mientras que el ostium del grupo de control tenía un diámetro de  $0.7 \pm 0.52$  mm.

La estenosis del ostium, como un problema importante con la cirugía clínica de sinusitis, afectará el efecto quirúrgico e incluso causará el relapso de sinusitis. Los resultados anteriores indican que el hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro, que tiene un bajo grado de reticulación según la presente invención, puede prevenir la estenosis del ostium de manera significativa y de esta manera se espera que tenga amplias aplicaciones en clínica.

Ejemplo 11: Aplicación del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro en prevención de adhesión posoperatoria

Se utilizó modelo de ciego de rata reportado por Hemadeh et al. (Surgery 114: 907-10, 1993) y Yetkin et al. (Int J Surg 7: 561-65, 2009). El procedimiento es resumido tal como sigue: se dividieron 32 ratas en 3 grupos y el brillo de serosa de la serosa del ciego fue descartada utilizando gasa estéril hasta que la superficie estaba sangrando; luego se añadió una

45

gota de etanol anhidro sobre la superficie sangrante para inducir más adhesión; el Grupo 1 fue un grupo de control sin ningún tratamiento, el grupo 2 fue tratado con 1 ml de solución de ácido hialurónico (10 mg/ml) disponible comercialmente, y el grupo 3 fue tratado con el hidrogel preparado en el ejemplo 6 (que tiene una concentración de ácido hialurónico de 10 mg/ml y un grado de modificación con mercapto de 1.54%); finalmente la herida superficial de las ratas fue suturada. Después de dos semanas las ratas fueron sacrificadas y diseccionadas para observar el estado de adhesión.

La adición fue evaluada de acuerdo con el sistema de evaluación de adhesión de Yetkin et al. (Int J Surg 2009; 7: 561-65), con los resultados tal como se muestran en la Tabla 6. El grupo de control blanco (grupo 1) tenía adhesión severa, el grupo terapéutico de ácido hialurónico disponible comercialmente (grupo 2) tenía un cierto grado de adhesión y el hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro según la presente invención (grupo 3) tenía los mejores efectos en prevención de adhesión.

Tabla 6: Puntuación de la adhesión

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Puntaje de adhesión	3.4 ± 0.699	1.333±1.231	0.4±0.699

Ejemplo 12: Aplicación del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro en el tratamiento visco-suplementario de osteoartritis

Fue utilizado el modelo de artritis de conejo reportado por Mihara et al. (Osteoarthritis y Cartilage 15: 543-549, 2007). El procedimiento se describen brevemente tal como sigue: el conejo fue anestesiado mediante inyección intramuscular de ketamina (35 mg/kg) y toluolzosin (5 mg/kg). Se cortó la articulación de la rodilla izquierda del conejo en el lado de la rótula con una incisión de 2 cm y luego fue cortado el ligamento colateral lateral expuesto; el extremo del tendón fue cortado abierto para exponer el menisco lateral seguido de un corte de 3.0-4.0 mm retirado del centro del menisco lateral; la capa de músculo subcutánea y la capa de piel fueron suturadas, y se inyectó aproximadamente 0.2 ml de ampicilina mediante inyección intramuscular en la pierna.

Después de la resección parcial de menisco los conejos se dividieron en tres grupos: el grupo 1 fue un grupo de control con suero fisiológico y respectivamente tuvo una inyección con 0.2 ml de suero fisiológico los días 0, 3, 6, 9 y 12 después de la cirugía (un total de 5 inyecciones); el grupo 2 fue un grupo tratado con ácido hialurónico, y respectivamente tuvo una inyección interacción particular con 0.2 ml de solución de ácido hialurónico comercialmente disponible (10 mg/ml) en los días 0, 3, 6, 9 y 12 después de la cirugía para tratamiento (un total de 5 inyecciones); el grupo 3 fue un grupo tratado con el hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro según la presente invención y tuvo una inyección intra-articular con el hidrogel preparado en el ejemplo 6 (que tenía una concentración de ácido hialurónico de 10 mg/ml y un grado de modificación con mercapto de 1.54%) el día 0 después de la cirugía (un total de 1 inyección); el índice de dolor fue medido para la rodilla posoperatoria en 0, 2, 5, 8, 11 y 14 días después de la cirugía, con el índice de dolor caracterizado por la distribución de peso de la pata trasera izquierda (Mihara et al., Osteoarthritis y Cartilage 15: 543-549, 2007); los conejos fueron sacrificados 15 días después y se evaluó la apariencia y la histología del daño de rodilla posoperatorio.

La evaluación de apariencia y la evaluación histológica del daño de rodilla posoperatorio indicó que el hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro según la presente invención tuvo un efecto protector equivalente en la rodilla posoperatoria al grupo tratado con ácido hialurónico pero fue significativamente mejor que el grupo de control con suero fisiológico. La distribución de peso sobre la pata trasera de izquierda indicó que 8, 11 y 14 días después de la cirugía el grupo tratado (grupo 3) del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro según la presente invención fue significativamente mejor que el grupo de control de suero fisiológico (grupo 1) ( $p < 0.05$ ); mientras que en todos los puntos de tiempo de observación posoperatoria el grupo tratado con ácido hialurónico (grupo 2) no tuvo diferencia estadísticamente significativa en efectos con el grupo de control con suero fisiológico (grupo 1) ( $p > 0.05$ ), y el grupo (grupo 3) tratado con hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro según la presente invención no tuvo diferencia estadísticamente significativa en efectos con el grupo tratado con ácido hialurónico (grupo 2) ( $p > 0.05$ ) (véase Fig. 1).

Los resultados anteriores indican que el hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro según la presente invención tiene efectos significativos en el tratamiento visco-suplementario de osteoartritis, con una inyección en la rodilla capaz de lograr la eficacia equivalente de cinco inyecciones en la rodilla con el ácido hialurónico no reticulado.

Ejemplo 13: Preparación y caracterización del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro que contiene medicamento

5 En el procedimiento de preparación del hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro del ejemplo 6 (que tiene una concentración de ácido hialurónico de 10 mg/ml y un grado de modificación con mercapto de 3.97%), 0.1-10 mg de hormonas corticales (por ejemplo beclometasona, dipropionato de beclometasona, budesonide, dexametasona, prednisolone, y prednisone) se adicionaron respectivamente para hacer las hormonas corticales uniformemente dispersadas en el hidrogel reticulado preparado.

10 Se adicionaron 10 ml de solución de regulador de pH de fosfato a 0.2 ml del anterior hidrogel reticulado que contiene medicamento colocado en un tubo plástico de centrifuga de 15 ml. Luego estuvo de centrifuga se colocó en un agitador (37 °C, 100 rpm), y la absorción de ultravioleta de los medicamentos en el sobrenadante se midió a intervalos regulares. Las longitudes de onda de medición fueron tal como sigue: Beclometasona 246 nm, dipropionato de beclometasona 240 nm, budesonida 248 nm, dexametasona 242 nm, prednisolona 248 nm, y prednisone 244 nm.

Tabla 7. Porcentaje acumulado de liberación de los medicamentos en diferentes puntos de tiempo

Tiempo (día)	Beclometasona	Dipropionato de beclometasona	Budesonide	Dexametasona	Prednisolone	Prednisone
7	68%	< 1%	26%	41%	95%	86%
14	87%	< 1%	43%	63%	100%	99%
21	94%	< 1%	61%	75%	100%	100%

15 De los resultados de la tabla 7 anterior puede verse que el hidrogel de ácido hialurónico reticulado enlazado con disulfuro es un buen vehículo de liberación sostenida de medicamento que tiene buenos efectos de liberación sostenida para las seis hormonas corticales. Debido a la diferencia en la característica hidrófuga de los medicamentos, las conductas de liberación de los medicamentos del hidrogel son muy diferentes. Mientras más fuerte sea la característica hidrófuga del medicamento más sostenida es la liberación. Por ejemplo, la prednisolone más hidrofílica fue liberada básicamente en su totalidad en 7 días, mientras que para el dipropionato de beclometasona muy hidrófugo la liberación fue raramente detectada.

20 **Aplicabilidad industrial**

25 Las aplicaciones en medicina del material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de la presente invención incluyen los siguientes aspectos: es capaz de mejorar la curación de heridas, puede usarse como vendaje para heridas en la piel u otras heridas; también puede usarse para prevenir la adhesión, lo que incluye la adición fibrosa entre tejidos u órganos después de cirugía (por ejemplo una cirugía de sinusitis); también puede usarse en el tratamiento visco-suplementario de osteoartritis como un lubricante de rodilla.

30 Las aplicaciones en farmacia del material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro, preparado según la presente invención incluyen que puede usarse como un vehículo de liberación sostenida para diversas sustancias terapéuticas activas para realizar una liberación sostenida. Las sustancias terapéuticas activas pueden ser medicamentos químicos o factores biológicamente activos, incluyendo antiflogísticos, antibióticos, analgésicos, anestésicos, promotores de curación de heridas, promotores o inhibidores de crecimiento celular, inmuno-estimulantes, medicamentos antivirales, etc.

Texto listado de secuencias

## REIVINDICACIONES

1. Un derivado de macromolécula biocompatible modificado con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto, caracterizado porque: el derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto contiene al menos tres grupos mercapto en su cadena lateral y tiene un grado de modificación con mercapto  $\leq 4.5\%$ ; el derivado de macromolécula biocompatible modificado con mercapto se refiere a un derivado obtenido introduciendo químicamente el grupo mercapto al grupo de cadena lateral de la macromolécula biocompatible; el grado de modificación con mercapto se refiere a un porcentaje de la cantidad del grupo mercapto introducido en la cantidad del grupo de cadena lateral disponible de la macromolécula biocompatible para modificación; y la macromolécula biocompatible se refiere a sulfato de condroitina, dermatán, heparina, heparán, ácido hialurónico, sulfato de dermatán, pectina, y carboximetil quitosán, poli (ácido acrílico), poli (ácido aspártico), poli (ácido tartárico), poli (ácido glutámico) y poli (ácido fumárico), colágeno, gelatina alcalina, gelatina ácida, elastina, proteína de núcleo, laminina de polisacárido y fibronectina, o las sales de los mismos.
2. El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el grado de modificación con mercapto es de 0.5%-3.0%.
3. El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el grado de modificación con mercapto es de 0.75%-2.5%.
4. El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la macromolécula biocompatible es sulfato de condroitina, heparina, heparán, ácido hialurónico, poli (ácido aspártico), poli (ácido glutámico), carboximetil quitosán, gelatina alcalina y gelatina ácida, con las sales de los mismos.
5. El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque la macromolécula biocompatible es sulfato de condroitina y ácido hialurónico, con las sales de los mismos.
6. El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la macromolécula biocompatible tiene un peso molecular en un intervalo de 1,000-10,000,000.
7. El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque la macromolécula biocompatible tiene un peso molecular en un intervalo de 10,000-3,000,000.
8. El derivado de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tiene un grado bajo de modificación con mercapto de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque la macromolécula biocompatible tiene un peso molecular en un intervalo de 20,000-1,500,000.
9. Materiales de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro hechos de uno o demás derivados de macromolécula biocompatible modificada con mercapto que tienen un grado bajo de modificación con mercapto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque el material incluye película y esponja en una forma sólida.
11. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque el material es hidrogel.
12. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque el hidrogel en el contenido de agua de más de 95%, el cual es un porcentaje de peso/volumen.
13. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque el hidrogel tiene un contenido de agua de más de 98%, el cual es un porcentaje de peso/volumen.
14. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque el hidrogel tiene una viscosidad dinámica de más de 10,000 mPa·s.
15. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque el hidrogel tiene una viscosidad dinámica de más de 25,000 mPa·s.

## ES 2 601 812 T3

16. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el hidrogel tiene una viscosidad dinámica de más de 40,000 mPa·s.
- 5 17. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-16, caracterizado porque el material contiene además uno o más de polisacáridos, proteínas, macromoléculas sintéticas e ingredientes activos.
18. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque el polisacárido, la proteína y la macromolécula sintética son sulfato de condroitina, heparina, heparán, ácido algínico, ácido hialurónico, poli (ácido aspártico), poli (ácido glutámico), quitosán, carboximetil quitosán, colágeno, gelatina alcalina y gelatina ácida, con las sales de los mismos.
- 10 19. El material reticulado de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque el polisacárido, la proteína y la macromolécula sintética son hialuronato de sodio, sulfato de condroitina, heparina sódica, gelatina alcalina y gelatina ácida.
- 15 20. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado porque el polisacárido, la proteína y la macromolécula sintética son hialuronato de sodio, sulfato de condroitina y heparina sódica.
21. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque los ingredientes activos pueden estar dispersos en el material reticulado en forma de partículas sólidas, o disueltos en el material reticulado.
- 20 22. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 17 o 21, caracterizado porque los ingredientes activos incluyen esteroides, antibióticos, medicamentos antitumorales y diversos medicamentos de proteína de péptidos.
23. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizado porque los ingredientes activos son hormonas corticales que incluyen beclometasona, propionato de beclometasona, budesonide, dexametasona, prednisolone, y prednisone.
- 25 24. Un material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-23 para usar en medicina.
- 30 25. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro para usar de acuerdo con la reivindicación 24, caracterizado porque el uso incluye un uso en la preparación de una formulación de prevención de adhesión posoperatoria, un uso en preparación de una formulación para el tratamiento visco-suplementario de osteoartritis, y un uso como vehículo de liberación sostenida de sustancias terapéuticas activas.
26. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro para usar de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizado porque las sustancias terapéuticas activas son medicamentos químicos o factores biológicamente activos.
- 35 27. El material de macromolécula biocompatible reticulada enlazada con disulfuro para usar de acuerdo con la reivindicación 26, caracterizado porque las sustancias terapéuticas activas son antiflogísticos, antibióticos, analgésicos, anestésicos, promotores de curación de heridas, promotores o inhibidores de crecimiento celular, inmuoestimulantes, o medicamentos antivirales.

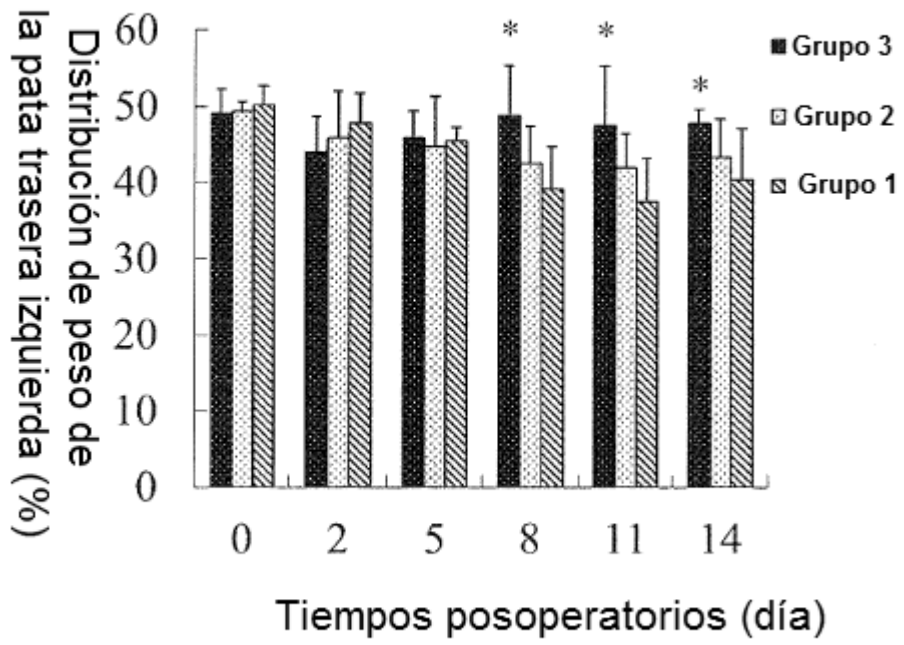


Fig. 1