

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 105**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2005 PCT/US2005/017498**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2005 WO05113608**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2005 E 05751911 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 1753787**

54 Título: **Método de enlace covalente de ácido hialurónico y quitosano**

30 Prioridad:

20.05.2004 US 572669 P

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

18.04.2017

73 Titular/es:

**MENTOR WORLDWIDE LLC (100.0%)
33 Technology Drive
Irvine, CA 92618, US**

72 Inventor/es:

WANG, WEI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 609 105 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).

Método de enlace covalente de ácido hialurónico y quitosano**Descripción****5 REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/572.669, presentada el 20 de mayo de 2004.

10 CAMPO TÉCNICO

[0002] Este documento se refiere a procedimientos para la reticulación de ácido hialurónico y quitosano, así como a los productos generados usando los procedimientos descritos en el presente documento y los usos de los productos.

15 FONDO

[0003] El ácido hialurónico es un miembro de una clase de polímeros conocidos como glicosaminoglicanos. Es un polisacárido lineal natural integrado de alternancia de unidades de monosacárido de ácido N-acetilo-D-glucosamina y D-glucurónico unidos a través de β -1,4-bonos, con las unidades de disacáridos con enlaces a través de enlaces β -1,3 glicósido. El ácido hialurónico generalmente se presenta como sales tales como hialuronatos de sodio y potasio. La sal de sodio tiene una fórmula molecular de $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$ donde n puede variar en función de la fuente, procedimiento de aislamiento y método de determinación. El peso molecular cae generalmente entre aproximadamente 6×10^4 y aproximadamente $1,4 \times 10^7$. El término "hialuronano" (HA) generalmente se refiere tanto al ácido hialurónico como a sus sales.

[0004] HA está presente en el líquido sinovial y el cuerpo vítreo del ojo. También se distribuye ampliamente en los tejidos conectivos de los vertebrados, tales como cordón umbilical humano, peines de gallo y cartílago articular. HA puede ser aislado de todas estas fuentes. También puede ser biosintetizado, y puede obtenerse utilizando métodos de fermentación. Por ejemplo, US 5.411.874 describe un método para la producción de ácido hialurónico por fermentación continua de *Streptococcus equi*.

[0005] El HA es no inmunogénico y no tóxico. Sin embargo, cuando se implantan o se inyectan en un cuerpo vivo, la HA se degrada típicamente por oxidación y por enzimas tales como hialuronidasa. Debido a que HA es un polímero soluble en agua y se degrada y elimina rápidamente *in vivo*, las aplicaciones potenciales para HA en fines biomédicos han sido un tanto limitadas.

[0006] El documento WO-A- 2004/022603 describe derivados de ácido hialurónico con ácido hialurónico reticulado 5 a un polímero de glicol por enlaces de amida que incluye un derivado en el que un ácido hialurónico está reticulado a un polímero de glicol a través de quitosano y su proceso de preparación.

[0007] El documento WO-A-2004/011503 da a conocer geles de derivado del ácido hialurónico en el que el ácido hialurónico 10 está unido a un compuesto sacárido que contiene un grupo amina, y un método para la preparación de tales geles.

[0008] Documento no patente "Aplicación de biomateriales basados en polisacáridos quitosano en ingeniería del tejido de cartílago: una revisión" Francis Suh J-K et al. (Biomaterials, Elsevier 15 Science Publishers BV.) vol. 21, n° 24, páginas 2589-2598, describe un hidrogel de polisacárido basado en quitosano y sus aplicaciones en la ingeniería de tejidos de cartílago.

50 RESUMEN

[0009] Complejos de polielectrolitos que contienen, por ejemplo, HA y quitosano, típicamente son sólidos nublados que tienen una capacidad muy limitada para adsorber agua, y sólo son moderadamente estables en un intervalo de pH normal. Este documento se basa en parte en el descubrimiento de que mediante el control del pH, la formación de complejos polielectrolito puede evitarse. Por ejemplo, ajustando el pH de soluciones de hialuronano y quitosano de glicol para que el pH de la solución mixta sea de 7,2 a 7-8, se puede prevenir la formación del complejo entre hialuronano y quitosano de glicol. Esto puede confirmarse mediante la observación de una solución mixta clara y transparente, independientemente de si las soluciones individuales están diluidas o concentradas, y la disolución completa de la película colada secada en agua destilada.

[0010] El hialuronano y polímeros quitosánicos se pueden reticular covalentemente en presencia de agentes tales como 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo) hidrocloruro de carbodiimida (EDC). En solución acuosa, los grupos de carboxilo de hialuronano pueden activarse, seguido de adición nucleofílica por grupos de amino de polímeros quitosánicos para formar un enlace de amida intermolecular. El grupo de carboxilo del ácido hialurónico puede ser máximamente activo mediante el control del pH de la solución, mientras que grupos $-NH_2$ suficientes son no protonados de modo que la adición nucleofílica se produce de manera eficiente.

[0011] En un aspecto, este documento presenta un método para la unión covalente de hialuronano y quitosano. El método comprende las etapas de: (a) proporcionar una solución de hialuronano con un pH de 4,0 a 4,3; (b) añadir una solución de quitosano tal que la solución mixta resultante tenga un pH de 7,1 a 7,8 y (c) añadir una carbodiimida soluble en agua. El método puede incluir además la etapa de: (d) lavar el producto de (c) con agua o PBS. El pH de la solución mixta es 7,2 a 7,8.

[0012] El método puede incluir además las etapas de (d) agitar la solución formada en (c) durante 3 horas a temperatura ambiente.; y (e) lavar el hidrogel resultante en PBS. Alternativamente, el método puede incluir además las etapas de (d) agitar la solución formada en (c) durante 3 horas a temperatura ambiente; (e) lavar el hidrogel resultante en PBS o agua; y (f) liofilizar el hidrogel. En otra alternativa, el método puede incluir además las etapas de: (d) agitar la solución formada (c) durante 30 minutos a temperatura ambiente; (e) moldear la solución en una forma deseada y dejar que se seque; y (f) lavar la película resultante con agua o PBS.

[0013] La carbodiimida soluble en agua puede ser 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida o metiodida 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC), o un derivado del mismo. El pH de la solución mixta puede ser de 7,2 a 7,5.

[0014] En otro aspecto, este documento presenta un producto que contiene hialuronano transversal relacionado con quitosano formado por los métodos descritos en el presente documento. El producto puede ser para uso farmacéutico, médico o cosmético, o para uso en medicina o cirugía. El producto puede ser para la administración de agentes anti-inflamatorios, antibióticos, analgésicos, anestésicos, promotores de curación de heridas, agentes citostáticos, inmunostimulantes, inmunosupresores o antivirales. Por ejemplo, el producto puede ser para la administración de un anestésico tal como lidocaína.

[0015] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí para practicar la invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

[0016] Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017]

FIG. 1 muestra el mecanismo de la reacción entre ácido carboxílico y carbodiimida, con y sin aminas primarias.

FIG. 2 muestra las propiedades reológicas de un gel inyectable de HA reticulado y quitosano de glicol (T = 25°C).

FIG. 3 muestra un espectro Fourier Transform Infrared (FTIR) de una película colada de HA reticulado y gel de quitosano de glicol

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0018] Mediante el control de pH, la formación de complejos de polielectrolitos se pueden evitar. Por ejemplo, ajustando el pH de las soluciones de ácido hialurónico y quitosano de glicol de modo que el pH de la solución mixta es 7,2 a 7,8 (p.ej., 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8), formación de un complejo de polielectrolito entre hialuronano y quitosano de glicol puede prevenirse. Los polímeros de hialuronano y quitosano pueden reticularse covalentemente en presencia de agentes tales como EDC. Así, se describen aquí métodos para reticular covalentemente HA a quitosano usando una reacción de amidación, así como productos reticulados fabricados por los métodos descritos.

[0019] Como se usa en el presente documento "hialuronano" abarca el ácido hialurónico y sus sales de hialuronato, incluyendo, pero no limitado a, hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de magnesio y hialuronato de calcio.

[0020] "Quitosano" como se utiliza aquí se refiere a cualquier quitosano o derivado de quitosano capaz de disolver pH neutro, incluyendo, pero no limitado al quitosano tiene un grado de desacetilación de aproximadamente 50% y derivado de desacetilación homogénea de la quitina, quitosano de glicol, quitosano de N-metilglicol, quitosano re-N-acetilado, quitosano O-acetilado, quitosano de carboximetilo, quitosano oxidado, quitosano sulfonado y derivados de injerto tales como híbrido de quitosano-PEG.

[0021] Carbodiimida soluble en agua puede ser, por ejemplo, 1-metilo-3-(3-dimetilaminopropilo) metiodida de carbodiimida o 1-metilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida, o derivados de los mismos.

[0022] Reacciones de reticulación pueden tener lugar en solución de pH casi neutra en la que complejos de

polielectrolitos, es decir, productos que contienen enlaces iónicos, no pueden formarse. Un pH adecuado es de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,8 (*por ejemplo*, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, o 7,8), o de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,5 (*por ejemplo*, 7,2, 7,3, 7,4, o 7,5). A tal pH, la mayoría de los grupos de carboxilo del hialuronano se puede disociar y la mayoría del grupo -NH₂ de polímeros quitosánicos no son capaces de ser protonados, de modo que los complejos de polielectrolitos no pueden formarse. En tales condiciones, los grupos de carboxilo del ácido hialurónico se pueden activar por EDC, seguida de la reacción nucleófila con grupos NH₂ de polímeros quitosánicos en solución (véase la FIG. 1). Durante la reacción, la solución mezclada puede permanecer clara y el pH de la solución puede aumentar gradualmente hasta aproximadamente 9,0. A este pH, casi todos los grupos -NH₂ son no protonados, por lo que cada grupo -NH₂ tiene la oportunidad de reaccionar por adición nucleófila para formar un enlace de amida, lo que resulta en HA reticulado a polímeros quitosánicos.

[0023] Los métodos proporcionados en el presente documento comprenden las etapas de:

- (a) proporcionar una solución de hialuronano con un pH de 4,0 a 4,3;
- (b) añadir una solución de quitosano tal que la solución mixta resultante tenga un pH de 7,2 a 7,8 y
- (c) añadir una carbodiimida soluble en agua

[0024] En tales condiciones suaves, un hidrogel claro y fuerte puede ser obtenido utilizando ácido hialurónico y polímeros quitosánicos solubles en agua neutra en presencia de EDC. El gel más fuerte se puede obtener después de aproximadamente 2 o 3 horas de adición de EDC controlando la relación en peso y las concentraciones de los dos polímeros y EDC. Los métodos pueden incluir adicionalmente (d) la agitación de la solución formada en (c) durante 2 a 4 horas (*por ejemplo*, 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 3,5 horas, o 4 horas) a una temperatura adecuada (*por ejemplo*, temperatura ambiente, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C o 25°C); y/o (e) lavar el producto resultante con agua o con PBS (*por ejemplo*, PBS con un pH de 7,4), con o sin agitación. Estos pasos pueden eliminar productos secundarios y EDC sin reaccionar sin pérdida de las propiedades físicas del gel.

[0025] El producto de hidrogel se puede formular en un gel inyectable para diversos fines biomédicos. Un hidrogel se puede romper fácilmente en un microgel adecuado para inyecciones subcutáneas, intramusculares o intraperitoneales usando, *por ejemplo*, una aguja de calibre 30. Tales geles se pueden usar, *por ejemplo*, para el aumento, la viscosuplementación, el suministro de fármacos u otros fines.

[0026] La relación de hinchamiento de los geles puede ser 4.500 a 6.000%. Los resultados reológicos han indicado que un gel puede ser blando y muy elástico, y puede tener el comportamiento típico y distinto de una estructura de red reticulada. El módulo elástico G' puede ser más alto que el módulo viscoso G'', y pueden ser casi paralelos entre sí sin una intersección de las curvas respectivas (FIG. 2).

[0027] La reticulación entre el ácido hialurónico y polímeros quitosánicos puede ser confirmada además por FTIR. Como se describe aquí, *por ejemplo*, el pico -NH₂ de polímero quitosánico puede disminuir en gran medida o incluso casi desaparecer, y un nuevo pico debido al enlace de amida entre HA y quitosano se puede detectar claramente.

[0028] Los materiales reticulados HA/quitosano proporcionados en este documento pueden usarse en una variedad de formas, incluyendo, sin limitación, membranas, perlas, esponjas, tubos, láminas e implantes conformados. Por lo tanto, los métodos proporcionados aquí también pueden usarse para formar láminas, membranas o láminas insolubles en agua. Tales láminas se pueden utilizar, *por ejemplo*, para prevenir la formación de adherencia postoperatoria en el vendaje de heridas y en los implantes. Las láminas de biomateriales se pueden preparar fácilmente moldeando soluciones de polímero de hialuronano/quitosánico que contienen EDC como cualquier forma, tamaño y grosor deseados a un pH inicial de 7,2 a 7,8, típicamente de 7,2 a 7,5. *Por ejemplo*, los procedimientos para formar una lámina de hialuronano reticulada con quitosano pueden incluir las etapas de:

- (a) proporcionar una solución de hialuronano con un pH de 4,0 a 4,3;
- (b) añadir una solución de quitosano tal que la solución mixta resultante tenga un pH de 7,2 a 7,5;
- (c) añadir una carbodiimida soluble en agua;
- (d) agitar la solución formada en (c) durante 15 minutos a 2 horas (*por ejemplo*, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1,5 horas, o 2 horas) a una temperatura adecuada (*por ejemplo*, temperatura ambiente, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C o 25°C);
- (e) moldear la solución en la forma deseada, y dejar secar; y
- (f) lavar la lámina formada con exceso de PBS

[0029] Después del secado, las láminas o membranas u hojas pueden ser completamente transparentes y/o de color si es necesario. Las láminas pueden ser lavadas con agua o con PBS (*por ejemplo*, PBS con un pH de 7,4), y se pueden almacenar ya sea en PBS o en forma seca. Las láminas pueden tener una buena resistencia mecánica. Además de su uso en la prevención de la adhesión o acreción de tejido corporal durante el período postoperatorio o de cicatrización, las láminas pueden usarse para el vendaje dérmico de heridas o cicatrización de heridas. Además, las láminas pueden atrapar fármacos y después implantarse en el lugar donde se necesita o se desea liberar. Las láminas también se pueden usar como materiales de lentes de contacto, o para cultivo celular y otros fines de ingeniería de tejidos.

[0030] El grado de hinchamiento de las láminas realizadas por los métodos proporcionados en este documento pueden ser de entre 440% y 1300% (por ejemplo, 440%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1100%, 1200%, o 1300%). Las láminas pueden ser estables en soluciones acuosas de 6 M HCl y 6 M NaOH durante al menos una semana. Por ejemplo, algunas de las láminas hechas como se describe aquí no muestran ninguna pérdida de peso después del almacenamiento durante dos meses en PBS (p.ej., PBS con un pH de 7,4).

[0031] Otros biomateriales formados a partir de ácido hialurónico reticulado con polímeros quitosánicos se pueden preparar, tal como matrices, polvos, fibras y esponjas. Por ejemplo, las esponjas de biomaterial se pueden preparar liofilizando los geles preparados como se describe en la presente memoria. Los polvos pueden formarse inyectando un gel en un disolvente orgánico tal como acetona o alcohol isopropílico (IPA), o pueden prepararse cortando y triturando las láminas reticuladas. Las fibras se pueden preparar extruyendo las soluciones mixtas o haciendo girar un gel. Se puede obtener una matriz secando un gel en aire o precipitando un gel con disolventes orgánicos.

[0032] Los métodos proporcionados en la presente para la formación de esponjas de hialuronano reticulado con quitosano puede incluir las etapas de:

- (a) proporcionar una solución de hialuronano con un pH de 4,0 a 4,3;
- (b) añadir una solución de quitosano tal que la solución mixta resultante tenga un pH de 7,2 a 7,5;
- (c) añadir una carbodiimida soluble en agua;
- (d) agitar la solución formada en (c) durante 2 a 4 horas (por ejemplo, 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 3,5 horas, o 4 horas) a una temperatura de temperatura apropiada (por ejemplo, temperatura ambiente, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C o 25°C);
- (e) lavar el hidrogel formado en PBS; y
- (f) liofilizar del hidrogel.

[0033] Materiales reticulados Ha/quitosano preparados usando los métodos descritos en el presente documento puede ser biocompatible y biodegradable para la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos. Pueden tener una excelente bioestabilidad contra las enzimas, debido a que el ácido hialurónico es de manera covalente con polímeros quitosánicos, que son biopolímeros mucho más estables que HA *in vivo*. La bioestabilidad de materiales reticulados HA/quitosano puede ser probada utilizando hialuronidasa y la lisozima a 37°C durante 24 a 48 horas. De hecho, los materiales reticulados preparados como se describe en los ejemplos mostraban una excelente bioestabilidad frente a enzimas. La velocidad de degradación se puede controlar según sea necesario cambiando la relación de polímeros y EDC utilizados.

[0034] Además de la bioestabilidad mejorada de polímeros quitosánicos en comparación a hialuronano, los materiales reticulados de HA/quitosano proporcionados en este documento también pueden combinar otras ventajas de los polímeros quitosánicos, Tales como, por ejemplo, buenas propiedades de bioadhesión.

[0035] Los materiales reticulados HA/quitosano descritos en el presente documento puede contener grupos de amino, cuyo contenido puede ser controlado mediante el ajuste de las cantidades de polímeros quitosánicos y EDC. Los grupos de amino son importantes para la conjugación de agentes bioactivos tales como fármacos, proteínas y ADN.

[0036] Materiales reticulados HA/quitosano se pueden hacer a un costo más bajo que otros materiales compuestos de hialuronano reticulado a sí mismo, ya que el quitosano es más barato que el hialuronano. Por lo tanto, los procedimientos descritos en la presente memoria pueden ser simples, baratos y eficientes, proporcionando un rendimiento del 100% del producto deseado.

[0037] Materiales reticulados Ha/quitosano preparados como se describe en el presente documento pueden usarse en una variedad de productos farmacéuticos, médicos (incluyendo quirúrgicos) y aplicaciones cosméticas. Por ejemplo, pueden ser útiles para promover la cicatrización de heridas, por ejemplo, como apósitos dérmicos para heridas. Las esponjas, por ejemplo, pueden ser particularmente útiles como vendajes para heridas dérmicas o como andamios tridimensionales para la ingeniería de tejidos. Los materiales aquí proporcionados también pueden ser útiles en la prevención de la adhesión, por ejemplo, previniendo el crecimiento del tejido entre los órganos después de la cirugía. Estos materiales también pueden encontrar aplicación en el campo oftálmico, por ejemplo, para el reemplazo de fluido vítreo, como escudos corneales para el suministro de fármacos al ojo o como lenticulas. **[0038]** Materiales reticulados HA/quitosano pueden también ser útiles en cirugía como, por ejemplo, implantes sólidos para el aumento de tejido duro (por ejemplo, reparación o reemplazo de cartílago u hueso), o para el aumento de tejidos blandos, como implantes mamarios o como revestimiento para implantes destinados al uso a largo plazo en el cuerpo, tales como implantes mamarios, catéteres, cánulas, prótesis óseas, reemplazos de cartílagos, mini bombas y otros dispositivos de liberación de fármacos, órganos artificiales y vasos sanguíneos, mallas para refuerzo de tejido, etc. También pueden usarse como lubricantes conjuntos en el tratamiento de la artritis.

[0039] Un uso adicional para los materiales preparados por los métodos descritos en el presente documento es en el suministro de agentes terapéuticamente activos incluidos en cualquiera de las aplicaciones antes mencionadas. Los agentes terapéuticamente activos pueden ser, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos o factores biológicamente

activos (por ejemplo, citoquinas), y pueden incluir agentes antiinflamatorios, antimicóticos, analgésicos, anestésicos (por ejemplo, lidocaína), promotores de curación de heridas, agentes citostáticos, inmunoestimulantes, inmunosupresores, ADN y antivirales. Los factores terapéuticamente activos pueden unirse físicamente o químicamente al material reticulado de HA/quitosano usando, por ejemplo, métodos conocidos en la técnica.

[0040] Productos de los métodos proporcionados en este documento pueden ser caracterizados utilizando, por ejemplo, los métodos siguientes.

[0041] Para medir la capacidad de absorción de agua, aproximadamente 20 mg de muestra totalmente seca se pueden sumergir en agua destilada durante 24 horas. Los geles completamente hidratados se pueden filtrar y el agua residual en la superficie se elimina con papel de seda. La capacidad de absorción de agua (WAC) o grado de hinchamiento (SD) se puede calcular como sigue:

$$WAC = (W - W_0)/W_0 \times 100\%,$$

donde W_0 es el peso de la muestra seca inicial y W es el peso del gel hidratado completamente.

[0042] Para medir la estabilidad química, las muestras secas se pueden pesar y poner en soluciones acuosas de PBS (pH 7,4), 0,1 M y 6 M HCl o solución acuosa de 6 M NaOH, respectivamente. A varios intervalos, se puede observar la disolución de la muestra. Si es necesario, las muestras pueden filtrarse y lavarse con agua hasta pH neutro y después secarse y pesarse.

[0043] La resistencia a la digestión por hialuronidasa se puede medir como sigue: muestras reticuladas y purificados (geles, láminas, esponjas, etc.) se pueden esterilizar a 121°C durante 15 minutos, secarse mediante secado por congelación, y cortarse en piezas. Una porción (por ejemplo, 20 mg) de cada muestra se puede poner en 6 ml de PBS (pH: 7,4) que contiene 1000 U de hialuronidasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se incuba a 37°C durante 24 horas. El sólido puede eliminarse y enjuagarse con PBS. La solución de PBS enjuagada e incubada se puede juntar y hervir durante 15 minutos para precipitar hialuronidasa y después se prepara hasta 25 ml con PBS. La solución opaca se puede centrifugar a 4000 RPM durante 20 minutos y el sobrenadante transparente se puede tomar para medir la concentración de hialuronano usando, por ejemplo, un ensayo de Carbozol. Se pueden utilizar 6 ml de solución de PBS que contiene 1000 U de hialuronidasa como control. La pérdida de peso de hialuronano se puede calcular usando la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso de hialuronano} = \{[HA] \times 25/[HA]_0\} \times 100\%,$$

donde $[HA]$ (mg/ml) es la concentración de hialuronano determinada por el ensayo de carbozol y $[HA]_0$ es el contenido de ácido hialurónico original (mg).

[0044] La resistencia a la lisozima se puede medir utilizando un método basado en el descrito por Imoto et al. (Agric. Biol. Chem., 1971, 35: 1154) y Kurita et al. (Carbohydrate Polymers, 1993, 20: 239-245).

[0045] Lisozima (15 mg de clara de huevo, por ejemplo, disponible de Sigma), se puede disolver en 500 ml de tampón acetato 0,1 M de pH 4,5. Se puede preparar una solución de ferricianuro disolviendo 0,5 g de ferricianuro potásico en 1000 ml de 0,5 M de carbonato sódico.

[0046] Las muestras (*por ejemplo*, muestras de 25 mg) que se han esterilizado (*por ejemplo*, a 121°C durante 15 minutos), secado (*por ejemplo*, mediante secado por congelación), y cortado en piezas, se pueden dispersar en 50 ml de 0,1 M de acetato a pH 4,5. Se puede añadir 25 ml de la solución de lisozima y la mezcla se puede incubar a 37°C durante 48 horas. Se puede extraer una muestra (*por ejemplo*, 3 ml) del sobrenadante, se puede añadir una solución de ferricianuro (*por ejemplo*, 4 ml) y la mezcla se puede hervir durante 15 minutos. La mezcla se puede enfriar con agua durante 5 minutos y la absorbancia a 420 nm se puede medir usando UV/Vis. Se puede llevar a cabo una reacción de control en ausencia de lisozima. La hidrólisis de los enlaces glucosídicos de los polímeros quitosánicos puede calcularse usando calibración con N-acetilglucosamina de concentración conocida.

[0047] Las propiedades reológicas de un gel se pueden analizar utilizando, por ejemplo, un reómetro TA Instruments CSL 500 (New Castle, DE) equipado con una geometría de 4 cm y cono-placa de 4°. Las mediciones se pueden llevar a cabo a 25°C.

[0048] Los espectros de FTIR de láminas moldeadas, por ejemplo, se pueden obtener usando un instrumento FTIR de la serie Perkin-Elmer 1600. Las láminas de muestra se pueden preparar moldeando soluciones que contienen hialuronano y polímeros quitosánicos, así como EDC antes de la reticulación.

[0049] La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0050] Este ejemplo ilustra la reticulación de ácido hialurónico y quitosano de glicol en solución acuosa para preparar un hidrogel usando EDC.

[0051] El hialuronano sólido (0,3 g, MW: $2,06 \times 10^6$, Vitrolife UK Ltd) se disolvió en 30 ml de agua destilada durante la noche a temperatura ambiente para obtener una solución homogénea y transparente (1%). 1,5 g de quitosano de glicol (MW: 5×10^5 , grado de desacetilación: 86%, Sigma) se disolvió en 100 ml de agua destilada durante la noche. La solución (1,5%, pH: 9,1) se filtró a continuación para eliminar cualquier material insoluble. El valor de pH de la solución de hialuronano se ajustó a 4,0-4,3 añadiendo 0,1 M HCl con agitación. Se añadieron diecisiete ml de la solución de glicol-quitosano a la solución de hialuronano. La solución mixta permaneció clara y el pH debe estar entre 7,2 y 7,5. Después de agitarse durante 30 minutos, se disolvieron 0,26 g de metioduro de 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida o 0,17 g de clorhidrato de 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida en 2 ml de agua destilada y después se añadieron a la mezcla bajo agitación. La solución mixta transparente se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas y se formó un hidrogel fuerte. Este hidrogel se lavó entonces exhaustivamente con PBS (pH: 7,4) para eliminar reactivos residuales y otras moléculas pequeñas sin pérdida de sus propiedades. La capacidad de adsorción de agua fue 5.400%.

Ejemplo 2

[0052] Este ejemplo ilustra la formulación de un gel inyectable en un hidrogel a través de una aguja de calibre 30.

[0053] Se preparó un hidrogel según el método descrito en el Ejemplo 1. El gel se homogeneizó durante 2 minutos a velocidad máxima (30k RPM) utilizando un homogeneizador Omino EZ Connect (Omino International Inc.). El gel resultante se inyectó fácilmente a través de una aguja de calibre 30. La concentración de polímero medida por liofilización fue del 1,3%, muy próxima a la concentración teórica del 1,2% calculada a partir del peso inicial del polímero utilizado. Las medidas reológicas indicaron que el módulo elástico G' (6-19 Pa) era más alto que el módulo viscoso G'' (2-11 Pa) y el delta era 22-30 (FIG. 1), mostrando que el gel era un Hidrogel suave y elástico.

[0054] La pérdida de peso de ácido hialurónico del gel esterilizado fue del 18% después de la digestión con hialuronidasa a 37°C durante 24 horas. Sólo el 0,08% del enlace glicosídico de quitosano de glicol se hidrolizó después de la digestión con lisozima a 37°C durante 48 horas.

[0055] Este ejemplo ilustra los efectos de la solución de pH en la reticulación y formación de hidrogel de ácido hialurónico y quitosano de glicol.

[0056] La solución de hialuronano y solución de quitosano de glicol se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Cinco soluciones de ácido hialurónico (1%) se ajustaron a pH 3,5, 4,1, 5,2, 6,4 y 7,5 usando 0,1 M HCl. A continuación se añadió solución de quitosano de glicol (1,5%) con agitación. Los efectos de los diversos pHs se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1
Efectos del pH de solución en la reacción de reticulación

Nº	1	2	3	4	5
PH de solución de HA	3,5	4,1	5,2	6,4	7,5
PH de solución mezclada	6,6	7,3	7,7	8,3	8,6
Aspecto de solución mezclada	nublado, complejo	claro	claro	claro	claro
Tiempo de gelificación	-	3 días	1 semana	no	no
Propiedad de gel		fuerte	débil		

Ejemplo 4

[0057] Este ejemplo ilustra que el tiempo de gelificación disminuye al aumentar la concentración de la solución para reticular hialuronano y quitosano de glicol.

[0058] Tres soluciones al 1% de ácido hialurónico se prepararon como se describe en Ejemplo 1. Soluciones de quitosano de glicol del 1%, 1,5% y 2,5% se prepararon. Las soluciones de hialuronano y quitosano de glicol se mezclaron con agitación y el pH de las soluciones mixtas se ajustó a 7,2-7,5. Después se añadió EDC. Los tiempos requeridos para la gelificación fueron durante la noche, 3 horas y 2 horas, respectivamente, con una concentración creciente de quitosano de glicol

Ejemplo 5

[0059] Este ejemplo ilustra los efectos de diversas relaciones en peso de quitosano de hialuronano/glicol en la reticulación de ácido hialurónico y quitosano de glicol.

[0060] Soluciones de hialuronano (1%) y quitosano de glicol (1%) se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Las soluciones se ajustaron el pH y después se mezclaron juntos con diferentes relaciones de volumen de las soluciones respectivas. Se añadió EDC siguiendo la relación molar 1:1,2 del grupo de carboxilo a EDC. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2
Efecto de la proporción de quitosano de hialuronano/glicol en su reticulación

Proporción de volumen (1% de HA:1% de GC)	10:5	10:8	10:7	10:10	5:10
Relación de peso	2:1	1.8:1	1,5:1	1:1	0,5:1
Tiempo de gelificación	una semana	durante la noche	durante la noche	una semana	No
Propiedades del gel	débil	fuerte	fuerte	débil	-

Ejemplo 6

[0061] Este ejemplo ilustra los efectos de la sal en la reticulación y formación de hialuronano y quitosano de glicol.

[0062] Sales de NaCl, KCl y CaCl se añadieron en soluciones mixtas de hialuronano y quitosano de glicol. Concentraciones de sal variaron de 5% a 20% del peso de hialuronano utilizado. La presencia de sal no afectó la reticulación de hialuronano y quitosano de glicol. El WAC estaba entre 4.500 y 5.500%, casi igual que para los geles obtenidos bajo la misma reacción sin adición de sal.

Ejemplo 7

[0063] Este ejemplo ilustra la preparación de láminas reticuladas de ácido hialurónico y quitosano de glicol usando solución mixta que contiene EDC.

[0064] Hialuronano sólido (0,2 g) se disolvió en 20 ml de agua destilada durante la noche a temperatura ambiente para producir una solución homogénea y clara de hialuronano al 1%. El valor de pH de la solución se ajustó a 4,0-4,3 añadiendo 0,1 M HCl con agitación. Se mezclaron once a doce ml de solución de glicol-quitosano al 1,5% a esta solución de hialuronano. La solución mixta permaneció clara. Después de agitarse durante 30 minutos, se disolvieron 0,18 g de 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida-metoduro en agua destilada y se añadió la solución mixta bajo agitación. La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se moldeó sobre una placa de petri o una lámina de vidrio. Después de secarse al aire, la lámina se lavó exhaustivamente con agua destilada para eliminar reactivos residuales y otras moléculas pequeñas. La lámina era totalmente transparente y la capacidad de adsorción de agua era de 440%. La lámina era estable en 6 M HCl y 6 M NaOH durante al menos una semana. No se observó pérdida de peso después del almacenamiento durante 2 meses en PBS (pH:7,4). La pérdida de peso de hialuronano de la lámina esterilizada fue de 2,4% después de la digestión con hialuronidasa a 37°C durante 24 horas.

[0065] Los espectros FTIR de las láminas finas de hialuronano, el quitosano de glicol y su producto reticulado

mostró claramente que el pico a $1591,9\text{ cm}^{-1}$, asignado al grupo -NH_2 de quitosano de glicol, se disminuyó en gran medida, y un nuevo pico a $1482,5\text{ cm}^{-1}$ apareció (FIG. 3). El nuevo pico fue asignado al nuevo enlace de amida formado entre ácido hialurónico y quitosano de glicol.

5 **[0066]** De acuerdo con la Patente de Estados Unidos número 5.527.893, FTIR reveló que la absorción a 1700 cm^{-1} se encuentra en todas las láminas producidas cuando ningún componente de amina se ha añadido. Este pico se ha asignado a un aducto de N-acilurea. En el presente trabajo, sin embargo, ningún pico se identificó en 1700 cm^{-1} , lo que confirma, además, que la reacción principal era de amidación entre un grupo de carboxilo y un grupo amina en lugar de adición N-acilurea de hialuronano y EDC.

10

Ejemplo 8

[0067] Este ejemplo ilustra la preparación de biomateriales de la esponja de ácido hialurónico y quitosano de glicol reticulado.

15

[0068] El hidrogel purificado preparado en el Ejemplo 1 se utiliza para llenar un tubo cilíndrico, que después se secó por congelación. El producto era una esponja cilíndrica porosa. El WAC era del 710%.

Ejemplo 9

20

[0069] Este ejemplo ilustra la reticulación de ácido hialurónico y quitosano N-re-acetilado en solución acuosa utilizando EDC para preparar un hidrogel. **[0070]** Quitosano re-N-acetilado se preparó siguiendo el método descrito por Maghami et al. (Macromol Chemie, 1988, 189:1953-1956) y Wei Wang (tesis doctoral, Universidad de Nottingham Trent, Reino Unido, 1997, p 60.) utilizando un quitosán comercial (Aber Technologies, MW: $5,05 \times 10^5$, grado de desacetilación: 98%).

25

[0071] Hialuronano sólido (0,2 g, MW: $2,06 \times 10^6$, Vitrolife UK Ltd.) se disolvió en 20 ml de agua destilada durante la noche a temperatura ambiente para obtener una solución homogénea y transparente (1%). A continuación se ajustó el pH a 7,2-7,8. Quitosano re-N-acetilado (1,8 g, MW: $5,7 \times 10^5$, grado de desacetilación: 48%) se disolvió en 12 ml de agua destilada durante la noche. La solución (1,5%, pH:6,95) se añadió a la solución de hialuronano con agitación. Si había un precipitado, se añadió solución de 0,1 M NaOH gota a gota para obtener una solución mixta clara. Después de agitarse durante 30 minutos, se añadió 0,175 g 1-etilo-3-(3 aminopropilo-dimetilo) carbodiimida metiodida bajo agitación. La solución mezclada transparente se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas, hasta que se formó un hidrogel. Este hidrogel se lavó exhaustivamente con PBS (pH:7,4) para eliminar los reactivos residuales y otras moléculas pequeñas sin pérdida de sus propiedades. El WAC era 6.000%.

30

35

[0072] La pérdida de peso de ácido hialurónico del gel esterilizado después de la digestión con hialuronidasa a 37°C durante 24 horas era de 28%. Sólo 0,44% del enlace glicosídico de quitosano re-N-acetilado se hidrolizó después de la digestión con lisozima a 37°C durante 48 horas.

40

Ejemplo 10

[0073] Este ejemplo ilustra la preparación de láminas reticuladas de ácido hialurónico y quitosano re-N-acetilado (grado de desacetilación:48%). utilizando soluciones bien mezcladas que contienen EDC.

45

[0074] Hialuronano sólido (0,2 g) se disolvió durante la noche en 20 ml de agua destilada a temperatura ambiente para obtener una solución homogénea y transparente (1%). El valor pH de la solución de ácido hialurónico se ajustó a 7,2 a 7,8, en caso necesario mediante la adición de 0,1 M HCl con agitación. Doce ml de 1,5% de quitosano re-acetilado se mezcló con la solución de ácido hialurónico anterior. La solución mixta se mantuvo clara (añadiendo un poco de solución de 0,1 M NaOH si la solución mezclada estuviera nublada). Después de agitarse durante 30 minutos, 0,175 g 1-metilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida metiodida se disolvió en agua destilada y se añadió a la solución mezclada con agitación. La solución transparente se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, a continuación, se coló sobre una placa de Petri o portaobjetos de vidrio. Después de secarse en el aire, la lámina se lavó exhaustivamente con agua destilada para eliminar los reactivos residuales y otras moléculas pequeñas. La lámina era totalmente transparente y la capacidad de adsorción de agua era de 1.200%. La lámina era estable en 6 M HCl y 6 M NaOH durante al menos una semana. Ninguna pérdida de peso se encontró después de un almacenamiento durante 2 meses en PBS (pH:7,4).

50

55

[0075] La pérdida de peso de ácido hialurónico del gel esterilizado después de la digestión con hialuronidasa a 37°C durante 24 horas era de 16,7%.

60

[0076] Los espectros FTIR de las láminas finas de hialuronano, quitosano re-N-acetilada y su producto reticulado mostró claramente que el pico a 1558 cm^{-1} asignado al grupo -NH_2 de quitosano re-N-acetilado se había reducido, y un nuevo pico en $1479,6\text{ cm}^{-1}$ apareció (véase FIG. 3). El nuevo pico se asignó a un nuevo enlace de amida formado entre ácido hialurónico y quitosano re-N-acetilado. Además, no se detectó derivado N-acilurea a 1700 cm^{-1} .

65

Ejemplo 11

5 **[0077]** Este ejemplo ilustra la reticulación de ácido hialurónico y quitosano de glicol por moldeo de sus soluciones bien mezcladas y después la inmersión de las láminas de mezcla formadas en medios que contienen EDC, en los que las láminas de mezcla no puede disolver.

10 **[0078]** El hialuronano (0,6 g) disuelto en 60 ml de agua destilada se mezcló con solución acuosa de quitosano de glicol 40 ml 1%. La solución mezclada se agitó durante 2 horas y una lámina se moldeó sobre una placa de Petri. Después del secado, la lámina era clara y soluble en agua. Se prepararon cinco muestras de 20 ml 65% de IPA + 35% de agua, conteniendo cada uno 0,12 g EDC. A cada muestra se le añadió 0,1 g de lámina anterior, y el pH se ajustó a 4,75, 7,11, 8,05, 9,04, y 10,10, respectivamente. Después de dejarse durante la noche, se filtraron las láminas, se lavaron con agua y se secaron. Las láminas reticuladas eran piezas opacas rotas y pequeñas. Los WAC eran de 400 a 600%.

15

Ejemplo 12

20 **[0079]** Este ejemplo ilustra la reticulación de ácido hialurónico y quitosano por moldeo de las soluciones bien mezcladas, y después la inmersión de las láminas de mezcla en medios que contienen EDC, en los que las láminas de mezcla no pueden disolverse.

25 **[0080]** El hialuronano (0,6 g) disuelto en 60 ml 0,1 M HCl se mezcló con 30 ml 1% de quitosano de solución de 0,1 M HCl. El pH de la solución mixta era 1,91. La solución mezclada se agitó durante 2 horas y después se moldeó como una lámina sobre una placa de Petri. Después del secado, la lámina era nublada y soluble en solución acuosa 0,1 M de HCl. Se prepararon cinco disolventes mezclados de 20 ml de 50% de IPA+50% de agua, conteniendo cada uno 0,12 g de EDC. Se añadió una décima parte de un gramo de la lámina anterior para cada muestra, y el pH se ajustó a 1,91, 4,75, 7,5 y 9,4, respectivamente. Después de dejarlas durante la noche, se filtraron las láminas, se lavaron con agua y se secaron. Las láminas reticuladas eran opacas. El WAC era de 200 a 300%.

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 1 Un método de unión covalente de hialuronano y quitosano, que comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una solución de ácido hialurónico con un pH de 4,0 a 4,3;
(b) añadir una solución de quitosano de tal manera que la solución mixta resultante tenga un pH de 7,2 a 7,8; y
(c) añadir una carbodiimida soluble en agua.
- 2 Un método como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende además la etapa de:
- 10 (d) lavar el producto de (c) con agua o PBS.
- 3 Un método como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, que comprende además las etapas de:
- 15 (d) agitar la solución formada en (c) durante 3 horas a temperatura ambiente; □y
(e) lavar el hidrogel resultante en PBS.
- 4 Un método como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, que comprende además las etapas de:
- 20 (d) agitar la solución formada en (c) durante 3 horas a temperatura ambiente;
(e) lavar el hidrogel resultante en PBS o agua; y
(f) el secado por congelación del hidrogel.
- 5 Un método como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, que comprende además las etapas de:
- 25 (d) agitar la solución formada en (c) durante 30 minutos a temperatura ambiente;
(e) colar la solución en una forma deseada y dejar que se seque;
(f) lavar la lámina resultante con agua o PBS.
- 30 6 Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la carbodiimida soluble en agua es 1-etilo-3-(3-dimetilo-aminopropilo) carbodiimida metiodida o 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida hidrocloreuro (EDC), o un derivado del mismo.
- 35 7 Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el pH de la solución mixta es de 7,2 a 7,5.
- 8 Un producto que comprende hialuronano reticulado a quitosano formado por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 9 El uso del producto como se reivindica en la reivindicación 8 en la preparación de un medicamento para uso farmacéutico o cosmético.
- 45 10 El uso del producto como se reivindica en la reivindicación 8 en la preparación de un medicamento para uso en medicina o cirugía.
- 11 El producto según la reivindicación 8 para uso en medicina o cirugía.
- 12 El uso como se reivindica en la reivindicación 9 o 10, en el que el producto es para el suministro de agentes antiinflamatorios, antibióticos, analgésicos, anestésicos, promotores de la herida de curación, agentes citostáticos, inmunoestimulantes, inmunosupresores, o antivirales.
- 50 13 El producto según la reivindicación 8 para su uso en la administración de agentes anti-inflamatorios, antibióticos, analgésicos, anestésicos, promotores de curación de heridas, agentes citostáticos, inmunoestimulantes, inmunosupresores, o antivirales.
- 55 14 El uso como se reivindica en la reivindicación 12 o el producto para su uso como se reivindica en la reivindicación 13, en el que el producto es para el suministro de un anestésico.
- 60 15 El uso como se reivindica en la reivindicación 12 o el producto para su uso como se reivindica en la reivindicación 13, en el que el anestésico es lidocaína.

Figura 1

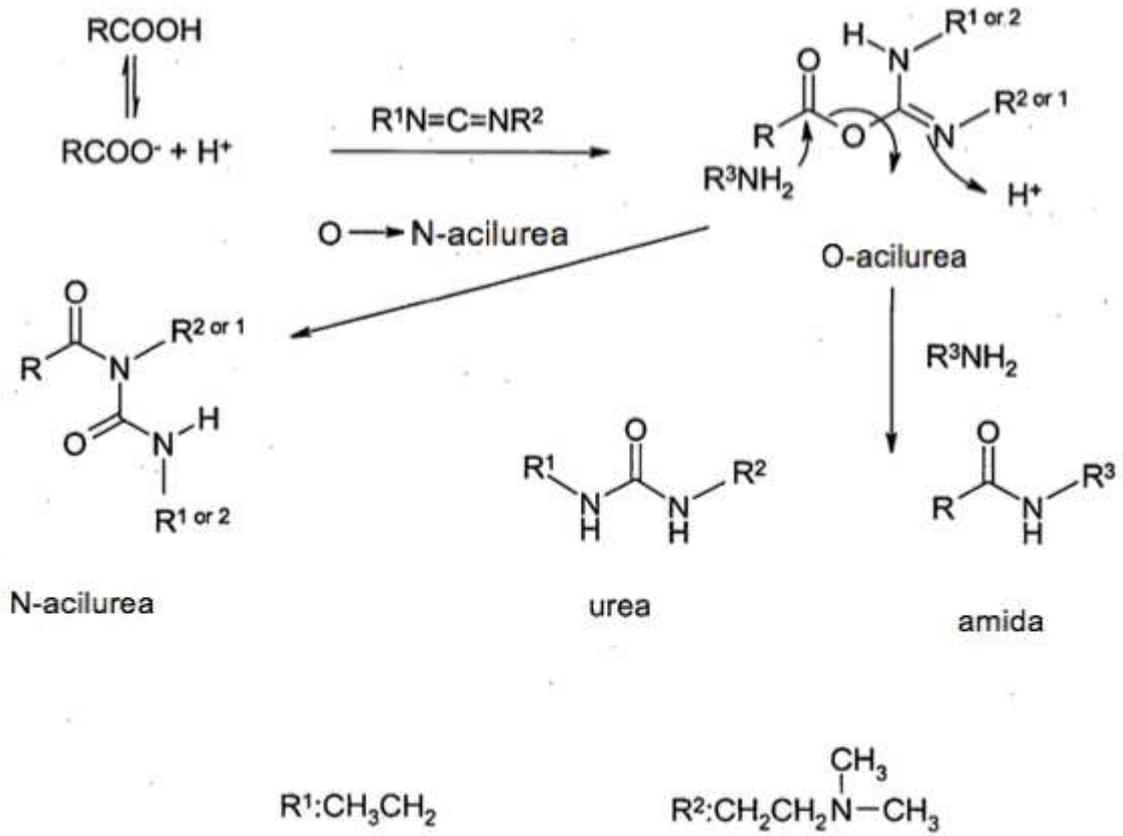
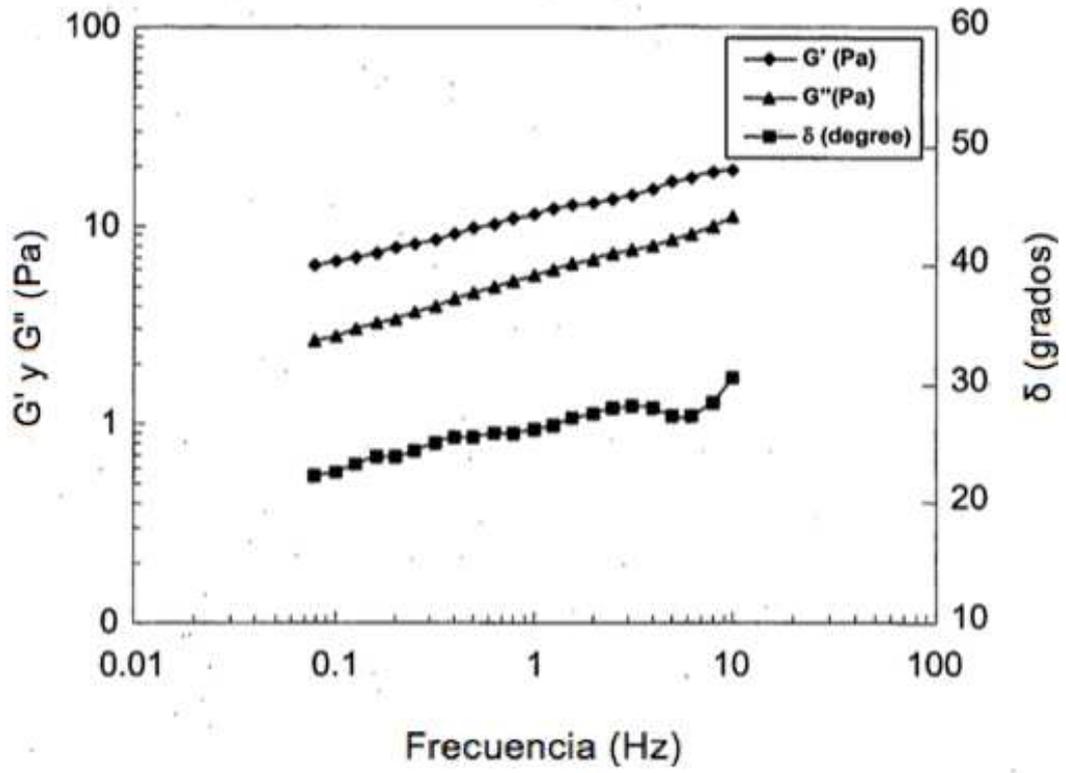


Figura 2



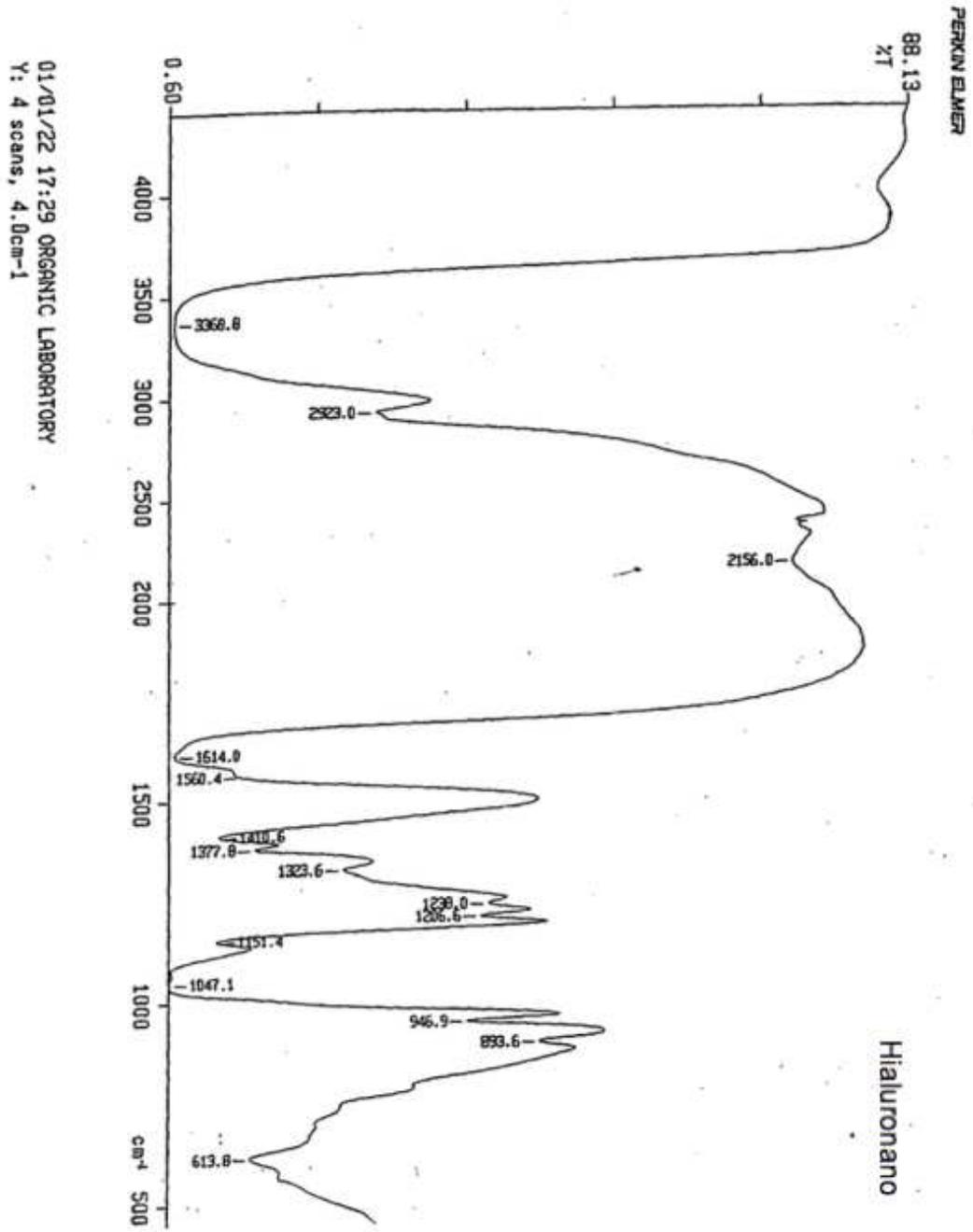


Figura 3