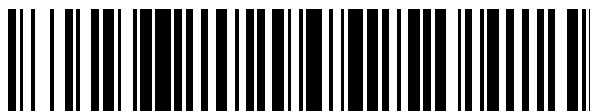


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 834**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2008 PCT/IB2008/003042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2009 WO09063291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08849793 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2209814**

54 Título: **Procedimiento de esterilización por filtración en estado diluido para biopolímeros viscoelásticos**

30 Prioridad:

13.11.2007 EP 07120568

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

07.07.2017

73 Titular/es:

**BIO-TECHNOLOGY GENERAL (ISRAEL) LTD.
(100.0%)
BEER TUVIA INDUSTRIAL ZONE POB 571
83104 KIRYAT MALACHI, IL**

72 Inventor/es:

**FUCHS, MENAKEM;
EYAL, DROR y
ZELIG, YEHUDA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 622 834 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

Procedimiento de esterilización por filtración en estado diluido para biopolímeros viscoelásticos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la formulación de una preparación viscoelástica estéril de ácido hialurónico, después de la fabricación a granel.

Antecedentes de la invención

10 El ácido hialurónico (HA) es un biopolímero de origen natural que consiste en la repetición de unidades de disacáridos de ácido D-glucurónico en un enlace β -(1-3) con N-acetil-D-glucosamina, en el que cada unidad de disacárido está conectada a sus vecinos adyacentes mediante enlaces β -(1-4). La sal de hialuronato sódico (NaHA) se encuentra a pH fisiológico en el fluido sinovial de articulaciones, tejido conjuntivo, humor vítreo del ojo y tejido cutáneo sano de humanos y vertebrados, y es un producto de secreción extracelular de varias especies bacterianas, en particular, del género *Streptococcus*.

15 Hasta la fecha, las principales aplicaciones médicas de los productos fabricados de NaHA son en cirugía oftálmica para cataratas e implante de lentes intraoculares, en aplicaciones dermatológicas para rellenar arrugas y aumentar el tamaño de los labios, y en la suplementación viscoelástica para el tratamiento de la artrosis en seres humanos y grandes mamíferos. La suplementación viscoelástica, particularmente en la rodilla, está dirigida a la restauración de la homeostasis reológica normal de la red de articulaciones y a proporcionar una protección inmediata, lubricación, absorción de impactos, resistencia hidrodinámica y una barrera mecanoquímica contra la tensión. Se ha demostrado que las inyecciones intraarticulares de NaHA mejoran la función y la movilidad y disminuyen el dolor.

20 Las aplicaciones médicas más recientes de NaHA fabricado incluyen recubrimientos de dispositivos médicos, productos de prevención de adherencia quirúrgica, vehículos de liberación de fármacos, materiales de sustitución ósea y materiales de curación de heridas.

25 Productos de NaHA comercializados incluyen BioLon™, Biolon™ Prime, BioHy™ (todos de Biotechnology General (Israel) Ltd.), Hyalart™ (Fidia), Synvisc™ Hyalan G-F 20 (Biomatrix), Healon™ (Pharmacia) BD Visc™ (Becton Dickinson) y Orthovisc™ (Anika Therapeutics).

30 Para aplicaciones comerciales en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, la calidad de un biopolímero viscoelástico depende de los parámetros combinados de viscosidad, concentración y peso molecular. Por ejemplo, el HA para uso farmacéutico debe ser de alto peso molecular para garantizar una retención suficiente de agua, pero la viscosidad debe ser de orden razonable para facilitar su administración y manipulación, *por ejemplo*, con jeringa. El NaHA encontrado en fuentes biológicas tales como crestas de gallo y caldos de cultivo de cepas fermentadas de *Streptococcus*, a menudo es de peso molecular muy alto, *es decir*, $> 3 \times 10^6$ daltons. Sin embargo, los procedimientos usados para su extracción, purificación y esterilización típicamente resultan en un producto final en el que el peso molecular se reduce significativamente en comparación con el compuesto nativo.

35 Por ejemplo, la liofilización de NaHA después de la extracción repetida induce la sublimación de agua, cuyo resultado neto es la cizalladura de moléculas de alto peso molecular. Las técnicas de bajo pH dan como resultado la formación de reticulaciones, que se rompen con el aumento subsiguiente del pH y contribuyen a la cizalladura de NaHA.

40 Técnicas de esterilización, tales como las que emplean calor seco o húmedo, productos químicos líquidos, óxido de etileno gas, radiación ultravioleta, radiación de haz de electrones, radiación gamma, microondas y ultrasonidos, dan como resultado la rotura de moléculas lineales y, por tanto, son inadecuadas para un producto de biopolímero viscoelástico en que el peso molecular es un parámetro clave para la calidad óptima del producto.

45 La fabricación de NaHA a partir de fuentes biológicas es bien conocida para los expertos en la técnica. Un procedimiento de purificación a granel típico (del cual existen muchas variaciones) implica etapas repetidas de extracción, precipitación, absorción, centrifugación y/o filtración, para retirar los contaminantes. Los procedimientos para el aislamiento de NaHA a partir de cultivos fermentados de *Streptococcus* se divulgan por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n.º 4.780.414 y la Patente de EE.UU. n.º 4.784.990 (ambas cedidas a BioTechnology General (Israel) Ltd.), Patente de EE.UU. n.º 5.563.051, Patente de EE.UU. n.º 5.411.874 (Fermentech Medical), Patente de EE.UU. n.º 5.071.751 (cesionario Chisso Corp.) y Patente de EE.UU. n.º 5.316.916.

50 La Patente de EE.UU. n.º 5.023.175 (cesionario Kabushiki) se refiere a la purificación de NaHA de grado cosmético (PM $2,1 \times 10^6$) con ultrafiltración por diálisis como etapa final antes de la liofilización.

La Publicación de EE.UU. n.º 2002/0120132 se refiere a la purificación de NaHA (PM $> 7,5 \times 10^5$) que implica un reactor de temperatura controlada y, supuestamente, menos etanol que los procedimientos tradicionales. El NaHA purificado se seca a vacío o se liofiliza.

Procedimientos alternativos para la fabricación a granel de NaHA a partir de cultivos de estreptococos evitan las

etapas de extracción/precipitación, y se basan principalmente en técnicas de filtración secuencial tal como se divulga, por ejemplo, en el documento GB 2.249.315 (cesionario Chisso Corp.), el documento WO 95/04132 (solicitante Fidia Corp.) y la Patente de EE.UU. n.º 6.489.467 (cesionario Chemedica).

5 Ninguno de los documentos anteriores divulga procedimientos para formular un biopolímero viscoelástico fabricado a granel altamente purificado tal como NaHA en un producto estéril final adecuado para uso médico.

La Patente de EE.UU. n.º 4.141.973 (cesionario Biotrics) divulga un HA estéril producido mediante una purificación extensa de material procedente de crestas de gallo y disolución del producto final en solución salina estéril tamponada con fosfato. Sin embargo, la formulación contiene cantidades medibles de proteína y otras impurezas.

10 La Patente de EE.UU. n.º 4.517.295 (cesionario Diagnostic Inc.) divulga un producto de NaHA estreptocócico preparado mediante un procedimiento en el que la filtración estéril es la etapa terminal. El procedimiento divulgado tiene la desventaja de producir NaHA de bajo peso molecular (PM promedio de $5,5 \times 10^4$ daltons).

15 La Patente de EE.UU. n.º 5.093.487 (cesionario Mobay Corp.) y la Patente de EE.UU. n.º 5.316.926 (cesionario Miles Inc.) divulgan la esterilización por filtración final de una formulación de NaHA estreptocócica (PM promedio de $1-2 \times 10^6$ daltons), después de un procedimiento de purificación que comprende una técnica de bobinado mecánico. El propósito de la técnica de bobinado es aumentar tanto el peso molecular como la viscosidad, después de lo cual se lleva a cabo el tratamiento térmico o filtración, supuestamente para reducir la viscosidad sin afectar el peso molecular. El procedimiento de bobinado es desventajoso por sus efectos desconocidos sobre la composición química de NaHA.

20 La Patente de EE.UU. n.º 4.782.046 (cesionario Mobay Corp.) se refiere a la preparación de un producto final de NaHA (PM promedio en general inferior a $3,0 \times 10^6$ daltons) mediante esterilización por filtración y/o tratamiento con beta-propiolactona antes de la carga de la jeringa. El tratamiento con beta-propiolactona es desventajoso, ya que la preparación puede retener pequeñas cantidades después de la hidrolización, y puede afectar negativamente a la estructura química de NaHA.

25 La Patente de EE.UU. n.º 5.079.236 (cesionario Hyal Pharmaceutical Corp.) se refiere a la preparación de una formulación mediante la disolución de NaHA purificado (PM promedio de $5-20 \times 10^4$), que contiene opcionalmente un esteroide, en una solución calentada de conservantes, *por ejemplo*, benzoato de sodio, metilparabeno y propilparabeno, ajustando el pH y el volumen, cargando los viales y esterilizando los viales en un autoclave. La esterilización en autoclave es perjudicial para el peso molecular del NaHA.

30 La Patente de EE.UU. n.º 5.411.874 y la Patente de EE.UU. n.º 5.563.051 (cesionario Fermentech) se refieren a la preparación de una solución de NaHA de grado médico mediante disolución de NaHA (PM promedio de $1,6-2,5 \times 10^6$) purificado por precipitaciones repetidas en solución salina tamponada con fosfato estéril.

El documento WO01/28602 (solicitantes Genetics Institute y Fidia) se refiere a formulaciones inyectables que comprenden ésteres de HA y proteína osteogénica.

35 La Patente de EE.UU. n.º 6.221.854 (cesionario Orquest) se refiere a formulaciones de inyección que comprenden NaHA y factores de crecimiento.

Ninguno de los documentos anteriores divulga procedimientos de aplicación industrial para la formulación de un biopolímero viscoelástico fabricado a granel y purificado tal como NaHA en un producto final adecuado para uso médico.

40 Los documentos WO00/44925 y WO92/18543 divulgan procedimientos para la purificación de HA. El documento GB2249315 divulga la producción de hialuronato de sodio de alta pureza.

Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la formulación de NaHA fabricado a granel y purificado en un producto final adecuado para uso médico.

Un objeto de la invención es producir una formulación que comprende HA viscoelástico de alto peso molecular que es adecuado para la administración por inyección en espacios oculares e intraarticulares en humanos y animales.

45 Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento industrial para la formulación de NaHA obtenido mediante fabricación a granel en un producto final de peso molecular promedio de 3×10^6 o mayor que es adecuado para uso médico sin someter el NaHA a liofilización en ninguna etapa de fabricación o formulación.

Sumario de la invención

50 La invención proporciona un procedimiento para la formulación de una preparación viscoelástica de ácido hialurónico que comprende:

(i) disolver ácido hialurónico fabricado a granel en un medio tampón adecuado para alcanzar una concentración diluida para filtración en condiciones estériles;

(ii) filtrar en condiciones estériles el ácido hialurónico disuelto fabricado a granel mediante el paso a través de una membrana absoluta de 0,2 micras; y

(iii) concentrar el ácido hialurónico por ultrafiltración hasta una concentración final deseada; en la que el ácido hialurónico fabricado a granel se obtiene por medio de un procedimiento que comprende:

5 (a) precipitar con etanol un caldo de cultivo de una cepa fermentada de *Streptococcus* que produce ácido hialurónico no patógeno no hemolítico;

(b) disolver el precipitado obtenido en la etapa (a) en cloruro de sodio / etanol / carbón;

(c) precipitar el material disuelto obtenido en la etapa (b) con cloruro de cetilpiridinio;

(d) disolver el precipitado obtenido en la etapa (c) en cloruro de sodio / etanol;

10 (e) tratar el material disuelto obtenido en la etapa (d) con silicato de magnesio;

(f) filtrar el material tratado obtenido en la etapa (e) a través de una membrana absoluta de 0,65 micras; y

(g) precipitar el filtrado obtenido en la etapa (f) con etanol.

El ácido hialurónico fabricado a granel puede comprender además una modificación química.

15 El ácido hialurónico fabricado a granel puede tener preferentemente un peso molecular promedio en el intervalo de 1×10^4 a 1×10^7 daltons.

El ácido hialurónico fabricado a granel puede tener preferentemente un contenido en endotoxinas de $< 0,25$ UE/ml y/o el contenido en proteína es < 1 mg/g y/o el recuento viable de bacterias aerobias es < 100 UFC/g.

Preferentemente, el recuento viable de células bacterianas en el ácido hialurónico fabricado a granel es < 100 UFC/g.

20 Preferentemente, la concentración de ácido hialurónico soluble fabricado a granel en la etapa (i) es $< 0,2$ %.

Preferentemente, la ultrafiltración se lleva a cabo usando una membrana cerámica. Preferentemente, la concentración final deseada es del 1,0 % p/v, 1,2 % p/v o 2,0 % p/v.

El procedimiento también puede comprender la carga aséptica de un dispositivo de envasado adecuado con el ácido hialurónico.

25 El dispositivo de envasado se puede seleccionar del grupo que consiste en una jeringa, un vial, un catéter y un nebulizador.

Preferentemente, el ácido hialurónico viscoelástico formulado tiene un índice de pseudoplasticidad en el intervalo de 500 a 4000, de 600 a 1200 o de 600 a 800.

Opcionalmente, en el procedimiento no se usa ningún conservante de ácido hialurónico viscoelástico.

30 En un modo de realización adicional, el HA no se somete a liofilización en ninguna etapa de la fabricación a granel o la formulación.

La invención es la más adecuada para usar con HA que tiene un peso molecular en el intervalo de 1×10^4 a 1×10^7 daltons y que tiene un índice de pseudoplasticidad en el intervalo de 600 a 1200.

35 Las formulaciones proporcionadas por la invención son altamente puras, estériles y tienen propiedades reológicas favorables y están en una forma adecuada para su inyección en espacios oculares e intraarticulares en humanos y animales.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la formulación de una preparación viscoelástica de ácido hialurónico que comprende:

40 (i) disolver ácido hialurónico fabricado a granel en un medio tampón adecuado para alcanzar una concentración diluida para filtración en condiciones estériles;

(ii) filtrar en condiciones estériles el ácido hialurónico disuelto fabricado a granel mediante el paso a través de una membrana absoluta de 0,2 micras; y

45 (iii) concentrar el ácido hialurónico por ultrafiltración hasta una concentración final deseada; en la que el ácido hialurónico fabricado a granel se obtiene por medio de un procedimiento que comprende:

(a) precipitar con etanol un caldo de cultivo de una cepa fermentada de *Streptococcus* que produce ácido hialurónico no patógeno no hemolítico;

(b) disolver el precipitado obtenido en la etapa (a) en cloruro de sodio / etanol / carbón;

(c) precipitar el material disuelto obtenido en la etapa (b) con cloruro de cetilpiridinio;

5 (d) disolver el precipitado obtenido en la etapa (c) en cloruro de sodio / etanol;

(e) tratar el material disuelto obtenido en la etapa (d) con silicato de magnesio;

(f) filtrar el material tratado obtenido en la etapa (e) a través de una membrana absoluta de 0,65 micras; y

(g) precipitar el filtrado obtenido en la etapa (f) con etanol.

10 El HA puede estar en un intervalo amplio de peso molecular, *por ejemplo*, de 1×10^4 a 1×10^7 daltons, pero el procedimiento es el más particularmente adecuado para uso con biopolímeros viscoelásticos de alto peso molecular, ya que la viscosidad es una función tanto de la concentración como del peso molecular. De acuerdo con el procedimiento de la invención, el HA se puede filtrar en condiciones estériles a una concentración relativamente baja para permitir su paso eficaz a través del aparato de filtración a una presión aplicada que no contribuye a la cizalladura del biopolímero. Como etapa terminal en el procedimiento de formulación antes del envasado o de la
15 carga del dispositivo, el biopolímero estéril se concentra por ultrafiltración a una concentración final deseada.

Como se usa en el presente documento, el término "alto peso molecular" depende del biopolímero particular que se va a formular pero, en general, se refiere a un peso molecular superior a 1×10^6 daltons. Un biopolímero viscoelástico de HA con alto peso molecular está generalmente en el intervalo de 1×10^6 a 1×10^7 daltons y, más particularmente, en el intervalo de $2,5 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ daltons. El procedimiento también es aplicable a
20 preparaciones de biopolímeros viscoelásticos en las que el peso molecular se ha reducido intencionadamente. Por ejemplo, preparaciones de HA con peso molecular reducido se pueden obtener siguiendo un tratamiento de irradiación, como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 6.383.344, o mediante tratamiento con ultrasonidos e hipoclorito de sodio, como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 6.232.303. Otros pesos moleculares altos de biopolímero viscoelástico de HA útiles en el procedimiento de la invención pueden ser de al menos
25 aproximadamente 1×10^6 daltons, al menos aproximadamente 1×10^7 daltons o al menos aproximadamente 1×10^8 daltons.

Todavía otros pesos moleculares altos de biopolímeros viscoelásticos de HA útiles en el procedimiento de la invención pueden ser de no más de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ daltons, no más de aproximadamente $5,0 \times 10^6$ daltons, no más de aproximadamente 1×10^7 daltons o no más de aproximadamente 1×10^8 daltons. De forma
30 alternativa, los biopolímeros viscoelásticos de HA de peso molecular alto pueden ser de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ daltons, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente $5,0 \times 10^6$ daltons, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^7 daltons, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^8 daltons, de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ a aproximadamente $5,0 \times 10^6$ daltons, de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ a
35 aproximadamente 1×10^7 daltons, de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ a aproximadamente 1×10^8 daltons, de aproximadamente $5,0 \times 10^6$ a aproximadamente 1×10^7 daltons, de aproximadamente $5,0 \times 10^6$ a aproximadamente 1×10^8 daltons o de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 daltons.

El procedimiento de la invención formula HA. El término "ácido hialurónico (HA)" se refiere a ácido hialurónico, sales del mismo, tales como hialuronatos de sodio, potasio, magnesio, calcio, lisina, amonio, trietanolamina y propanolamina, sales metálicas del mismo, tales como hialuronato de cobalto, zinc, cobre, hierro, manganeso y litio,
40 y formas químicamente modificadas y derivatizadas de los mismos, como se divulga por ejemplo en la Patente de EE.UU. n.º 4.851.521, Patente de EE.UU. n.º 5.099.013, Patente de EE.UU. n.º 5.336.767 y la Patente de EE.UU. n.º 6.017.901.

Como se usa en el presente documento, el término "viscoelástico" se refiere al comportamiento reológico de una solución de biopolímero que, bajo el efecto de cizalladura exhibe tanto las características de un material puramente
45 elástico, es *decir*, capaz de almacenar energía, como las características de un material puramente viscoso, es *decir*, capaz de disipar energía.

El comportamiento reológico es característico y específico y es una función de la longitud, estructura y carga del biopolímero. Algunos biopolímeros, tales como HA, exhiben un comportamiento no newtoniano, que indica que la viscosidad depende tanto de la velocidad como de la temperatura de cizalladura, y exhiben un comportamiento
50 pseudoplástico (también conocido como "reofluidificante"), que significa que la viscosidad de la solución disminuye como una función del aumento de la fuerza de cizalladura.

La viscosidad de un biopolímero particular se cuantifica en un conjunto de velocidades y temperaturas de cizalladura discretas, *por ejemplo*, usando un viscosímetro Brookfield. Se puede obtener más información sobre un intervalo continuo de cizalladura, *por ejemplo*, usando un viscosímetro rotacional Haake.

La viscoelasticidad se puede cuantificar como la relación entre la viscosidad a una velocidad de cizalladura baja, *por ejemplo*, $0,1 \text{ s}^{-1}$, y la viscosidad a alta velocidad de cizalladura, *por ejemplo*, 1000 s^{-1} . Como se usa en el presente documento, la viscoelasticidad se refiere a la relación entre la viscosidad medida a una velocidad de cizalladura aplicada de $0,1 \text{ s}^{-1}$ y la viscosidad medida a una velocidad de cizalladura aplicada de 1000 s^{-1} . Esta relación también se conoce como el índice de pseudoplasticidad (PI):

PI = viscosidad a velocidad de cizalladura de $0,1 \text{ s}^{-1}$ / viscosidad a velocidad de cizalladura de 1000 s^{-1} .

Como se usa en el presente documento, un biopolímero viscoelástico puede tener un índice de pseudoplasticidad mayor de aproximadamente 500. El PI es un índice útil para caracterizar el comportamiento de un biopolímero en diferentes condiciones, y para comparar la calidad reológica entre diferentes soluciones de biopolímero.

Un biopolímero tal como HA, que se usa para suplementación viscoelástica y se administra por inyección intraarticular, requiere alta viscosidad a bajas velocidades de cizalladura, de modo que puede servir como un soporte no fluido después de la inyección, pero también requiere baja viscosidad a alta velocidad de cizalladura, es decir, mientras se está suministrando, *por ejemplo*, por inyección (*por ejemplo*, a través de una jeringa y aguja), de modo que el suministro puede realizarse con un esfuerzo razonable y de forma precisa. Por lo tanto, el PI de una solución de biopolímero influye directamente en su inyectabilidad.

La inyectabilidad es la fuerza requerida para expulsar una solución de biopolímero de una jeringa o un dispositivo de aplicación de tipo jeringa. La inyectabilidad se puede someter a prueba usando un indicador de fuerza, *por ejemplo*, un indicador de fuerza Mecmesin, y se expresa en unidades de g (gravedad). Por ejemplo, una fuerza de 200 g permite al facultativo expulsar de manera eficiente una solución de NaHA de una jeringa y al mismo tiempo controlar la cantidad de material introducido en la localización deseada, *por ejemplo*, un espacio intraarticular u ocular.

En el campo de la fabricación de HA, el procedimiento corriente arriba de la purificación a granel tiene muchas variaciones que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los procedimientos para la fabricación a granel de una solución que contiene HA de alto peso molecular a partir de cultivos de *Streptococcus* fermentados se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n.º 5.563.051 y la Patente de EE.UU. n.º 5.316.916. Se han descrito otros procedimientos de fabricación a granel que producen formas sólidas de HA como producto final, como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 4.780.414.

Sin embargo, el procedimiento corriente abajo de la formulación es menos variable, en cuanto a que la práctica habitual es llevar a cabo secuencialmente la concentración y esterilización como la secuencia final de las operaciones previas al envasado o carga del dispositivo. De hecho, de acuerdo con la mejor práctica habitual en la industria biofarmacéutica, la esterilización es la etapa final antes de la carga, y las etapas intermedias se evitan específicamente para minimizar la potencial contaminación.

En el procedimiento de la invención, la práctica industrial habitual se evita inesperadamente y, de hecho, se invierte, ya que la esterilización (por filtración a través de un filtro absoluto de tamaño de poro de 0,2 micras) se lleva a cabo antes de la concentración (por ultrafiltración). La etapa de concentración se lleva a cabo asépticamente y cabe esperar que el producto final sea de grado farmacéutico de la más alta calidad sin comprometer la esterilidad ni otros parámetros de calidad. De hecho, no se espera que un producto de HA de alto peso molecular y viscosidad se pueda formular a gran escala de manera aséptica si la etapa de concentración se lleva a cabo como una etapa intermedia entre el filtrado estéril y la carga.

Este orden inesperado de operaciones es muy ventajoso cuando se aplica a un biopolímero viscoelástico de alto peso molecular, tal como HA. Uno de dichos aspectos significativos es que el HA fabricado a granel y disuelto (*por ejemplo*, al 0,1 %; 1 mg/ml) pasa fácilmente a través del filtro estéril a un nivel industrialmente aplicable de presión para lograr un caudal aceptable (*por ejemplo*, caudal mínimo de 750 ml/min). La presión ejercida para conducir la solución de HA a través del filtro estéril es suficientemente suave para no afectar negativamente el peso molecular del HA.

El procedimiento inverso de concentración, *por ejemplo*, hasta el 1 % o 10 mg/ml, seguida de esterilización terminal es, en la práctica, inviable con un biopolímero viscoelástico de alto peso molecular, ya que la alta concentración del biopolímero da como resultado el bloqueo repetido del aparato de filtro de esterilización, lo que resulta en un procedimiento ineficaz e inútil en última instancia.

Además, usando el procedimiento de la invención, el HA fabricado a granel y esterilizado por filtración, es un producto intermedio flexible, ya que se puede llevar a diferentes concentraciones finales y/o mezclar con excipientes estériles adicionales o principios activos para obtener diferentes formulaciones finales.

De acuerdo con el procedimiento de la invención, la esterilización del biopolímero viscoelástico debe llevarse a cabo por filtración a través de una membrana apropiada con el fin de retener la estructura de alto peso molecular del polímero. Técnicas de esterilización alternativas, tales como las que emplean calor seco o húmedo, productos químicos líquidos, óxido de etileno gas, radiación ultravioleta, radiación de haz de electrones, radiación gamma, microondas o ultrasonidos, dan como resultado la rotura de moléculas lineales largas, tales como las de HA.

El procedimiento de fabricación a granel es esencialmente un procedimiento de purificación que debe ser suficientemente riguroso para eliminar cantidades mínimas de impurezas procedentes de la fuente de producción (*por ejemplo*, del cultivo bacteriano) y de los reactivos de extracción (*por ejemplo*, etanol o cloruro de cetilpiridinio), todos los cuales pueden producir reacciones adversas si se administran a los pacientes. Para un producto tal como HA destinado a la inyección en pacientes, la fabricación, las especificaciones y la caracterización del HA fabricado a granel deberían estar de acuerdo con las normas y directrices internacionalmente reconocidas para la evaluación de la toxicidad, los niveles de endotoxinas y la esterilidad.

Por otra parte, el procedimiento de fabricación a granel no debe comprender etapas que den lugar a una cizalladura excesiva de la molécula de HA y reduzcan de forma concomitante su peso molecular, *por ejemplo*, hasta menos de aproximadamente 3×10^6 daltons, o su viscosidad, o de otro modo den lugar a desviaciones en las propiedades características de la molécula de HA.

Un procedimiento de fabricación a granel se divulga, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n.º 4.780.414 (véase Procedimiento III, columna 9, líneas 25 a 68). Dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

i. precipitar con etanol un caldo de cultivo de una cepa fermentada de *Streptococcus* que produce ácido hialurónico no patógeno no hemolítico;

ii. disolver el precipitado obtenido en la etapa (i) en cloruro de sodio / etanol / carbón;

iii. precipitar el material disuelto obtenido en la etapa (ii) con cloruro de cetilpiridinio;

iv. disolver el precipitado obtenido en la etapa (iii) en cloruro de sodio / etanol;

v. tratar el material disuelto obtenido en la etapa (iv) con silicato de magnesio;

vi. filtrar el material tratado obtenido en la etapa (v) a través de una membrana absoluta de 0,2 micras; y

vii. precipitar el filtrado obtenido en la etapa (vi) con etanol.

La fabricación a granel y la formulación deben llevarse a cabo sólo en lotes de caldo de cultivo en los que el peso molecular de HA es superior a un valor deseado para el HA de alto peso molecular, *por ejemplo*, $3,0 \pm 0,6$ megadaltons.

Preferentemente, el procedimiento de fabricación a granel debe proporcionar un producto en el que la carga biológica es cero o sustancialmente próxima a cero. Preferentemente, la carga biológica de cero o sustancialmente próxima a cero se debe alcanzar aproximadamente en la mitad del procedimiento de fabricación a granel, *por ejemplo*, a partir de la segunda etapa de disolución del procedimiento anteriormente mencionado. El HA precipitado se almacena preferentemente en etanol, y después se seca a vacío y se almacena a 4°C en recipientes estériles para proteger el HA fabricado a granel contra la contaminación antes del procedimiento de formulación.

El HA fabricado a granel se debe caracterizar mediante una evaluación de pureza, peso molecular, viscosidad, pH, rotación específica, concentración, porcentaje de contenido en HA y cualquier otro parámetro necesario con el fin de verificar la consistencia entre lotes y la calidad y, de ese modo, evaluar la eficacia e idoneidad del procedimiento de fabricación a granel. Preferentemente, la pureza del HA fabricado a granel es tal que el contenido en endotoxinas es $< 0,25$ UE/ml, y más preferentemente $< 0,10$ UE/ml, y el contenido en proteínas es < 1 mg/g, la absorbancia a 257 nm de una solución al 1 % es $< 0,20$, la absorbancia de explosión oxidativa a 550 nm es $< 0,10$ y el recuento viable de bacterias aeróbicas es < 4 UFC/g. Preferentemente, la calidad del HA fabricado a granel es tal que el pH es de 6,0 a 8,0, la rotación específica es de $-72,8^\circ$ a $90,8^\circ$, el valor de viscosidad limitante es de 2680 a 3410 ml/g y el peso molecular es de 2,4 a $3,6 \times 10^6$ daltons.

Puesto que el HA no absorbe de manera significativa en longitudes de onda superiores a 240 nm, cualquier absorbancia significativa en el intervalo de 240-300 nm es atribuible a contaminantes orgánicos, tales como proteínas y ácidos nucleicos. La absorbancia a 257 nm indica contaminación con nucleótidos, ADN o ARN, mientras que la absorbancia a 280 nm indica contaminación con proteínas o aminoácidos. La absorbancia a 257 nm por debajo de ciertos límites, *por ejemplo*, 0,2, se usa de forma conveniente como una indicación de pureza del HA. La absorbancia medida que está sustancialmente próxima a cero, *por ejemplo*, $< 0,08$, indica pureza absoluta.

La evaluación de la pureza implica, además, el análisis de los reactivos de purificación, *por ejemplo*, etanol, detergente, usados en el procedimiento de fabricación a granel. Dichos análisis se llevan a cabo de forma conveniente por HPLC y deben indicar la ausencia sustancial de reactivos.

La endotoxina bacteriana (lipopolisacárido) se puede cuantificar, por ejemplo, usando el ensayo LAL cinético turbidimétrico (véase Yin *et al.* (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 261:284-289).

El material inflamatorio se puede evaluar usando un ensayo de células de exudado peritoneal de ratón que cuantifica la actividad de explosión oxidativa después de la inyección intraperitoneal del material de ensayo, *por ejemplo*, como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 4.780.414.

La rotación específica medida se relaciona con la polarización de luz dependiente de la concentración característica del HA en solución. A una concentración determinada, el grado de polarización a una longitud de onda específica es una propiedad inherente de la molécula, caracterizada por su constante de rotación específica $[\alpha]$, cuyos valores son conocidos en la bibliografía científica (Meyer et al (1956) Biochim. Biophys. Acta 21:506-518; Swann et al (1968) Biochim. Biophys. Acta 156:7-30).

Por lo tanto, la concentración de HA se puede calcular usando la ecuación:

$$c = R \times \frac{1000}{[\alpha]}$$

en la que R = lectura en el polarímetro en grados, y c = concentración (g/l).

La concentración de HA también se puede calcular por medio del ensayo colorimétrico de carbazol (Bitter y Muir (1962) Anal. Biochem. 4: 330-334), que se basa en la reacción del reactivo de carbazol con los residuos de glucuronato de HA liberados tras una hidrólisis exhaustiva.

El peso molecular del HA fabricado a granel se determina usando el valor de viscosidad limitante o viscosidad intrínseca (expresado en volumen por masa) obtenido a partir de mediciones de viscosimetría, y la ecuación de Mark-Houwink empíricamente establecida, como se describe en el Ejemplo I y en la Patente de EE.UU. n.º 4.780.414.

Medidas absolutas del peso molecular de HA se pueden obtener usando el procedimiento de dispersión de luz láser de bajo ángulo (LALLS) conocido en la técnica.

La viscosidad de una solución de biopolímero se puede medir a velocidades de cizalladura discretas, *por ejemplo*, usando un viscosímetro Brookfield LVTD, así como en un intervalo continuo de velocidades de cizalladura, *por ejemplo*, usando un viscosímetro rotacional Haake.

Después de determinar que un lote de HA fabricado a granel tiene una pureza, concentración, viscosidad y peso molecular suficientes, se puede iniciar el procedimiento de formulación de acuerdo con el procedimiento de la invención, y todas las etapas se llevan a cabo preferentemente en condiciones de sala limpia. El HA fabricado a granel HA está lo más convenientemente en forma sólida, *es decir*, después de la precipitación y el secado a vacío, por lo que el uso del procedimiento de la invención se puede formular en el medio deseado, *por ejemplo*, tampón y excipientes.

Preferentemente, el HA no se somete a liofilización en ninguna etapa de la fabricación a granel o la formulación.

Una cantidad apropiada de HA fabricado a granel se disuelve en un medio adecuado para lograr una concentración adecuada que permite el filtrado estéril.

Un medio adecuado para la disolución del biopolímero incluye el tampón y el excipiente primario que se encuentran en la formulación final. Para las formulaciones de biopolímeros destinadas a inyección, dicho tampón o excipiente debe ser preferentemente fisiológicamente aceptable. Los medios adecuados incluyen cloruro de sodio, solución salina tamponada con fosfato y tampones que contienen sales de citrato, bicarbonato, acetato y benzalconio, incluyendo sales de metales. El medio de disolución puede comprender además excipientes adicionales presentes en la formulación final, tales como agentes quelantes, agentes de isotonicidad, agentes antimicrobianos, agentes antivirales, conservantes y agentes tensioactivos. El medio de disolución puede comprender además agentes farmacéuticamente activos adicionales, tales como antibióticos, agentes antimicrobianos, agentes antivirales, esteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroides, glucocorticoides, factores del crecimiento, prostaglandinas, vitaminas, enzimas, inhibidores de enzimas, antioxidantes, antihistaminas, profármacos, agentes anestésicos, agentes analgésicos, agentes antihipertensivos y agentes antiangiogénicos.

Para la disolución del biopolímero (HA), se puede cargar un recipiente apropiado con agua para inyección (API) (70-80 % del volumen final) que tiene una temperatura de 4-50 °C. Las cantidades apropiadas de reactivos del medio (seco o líquido) se pueden añadir y agitar entonces, después de lo cual se puede añadir una cantidad apropiada de biopolímero fabricado a granel. Se puede añadir API hasta el volumen final apropiado para lograr una solución en la que la concentración del biopolímero permite la filtración estéril posterior. Después, se puede llevar a cabo el procedimiento de agitación hasta que se logra la disolución completa del biopolímero, típicamente de 10 a 36 horas para el HA.

Opcionalmente, se pueden añadir excipientes hacia el final del período de agitación, por ejemplo, para evitar la formación excesiva de espuma de los tensioactivos.

Un recipiente apropiado para la disolución está equipado con un aparato de mezcla tal como una doble espiral y tiene una capacidad de volumen a escala industrial. El recipiente debe cerrarse para proteger el biopolímero de la iluminación natural y artificial, evitando de esta manera los efectos del flujo de fotones. Del mismo modo, el material del recipiente de disolución debe ser inerte al biopolímero.

La concentración obtenida mediante el procedimiento de disolución debe ser una que permita la filtración estéril a un caudal industrialmente aceptable (*por ejemplo*, 750 ml/min) ejerciendo una presión (*por ejemplo*, 0,689476 bar a 1,03421 bar [10-15 psi]) que no afecta de manera adversa el peso molecular del biopolímero.

5 Para el HA de peso molecular de aproximadamente 3×10^6 daltons, una concentración apropiada después de la disolución es del 0,1 % al 0,13 %; 1,0 a 1,3 mg/ml.

Según el procedimiento de la invención, a la disolución de HA le sigue la filtración estéril usando un filtro apropiado alojado en una unidad de esterilización. Preferentemente, el recipiente de disolución y la unidad de esterilización están conectados físicamente por un sistema apropiado de tubos y válvulas que es extraíble, modular y esterilizable. Las unidades de disolución y de esterilización pueden estar ubicadas en salas separadas, situándose el sistema de conexión de tubos y válvulas a través de la pared que separa ambas salas. La unidad de esterilización debe estar equipada preferentemente con medios para llevar a cabo la esterilización in situ (EIS) y la limpieza in situ (LIS) de los componentes relevantes, tales como válvulas de entrada y de salida.

15 El filtro de la unidad de esterilización debe tener un tamaño de poro absoluto de 0,2 μm y debe estar validado para la retención de partículas virales y bacterianas usando pautas de exposición apropiadas. El filtro también debe ser preferentemente de grado para retención de partículas de endotoxinas. El filtro puede ser hidrófilo o hidrófobo y se debe seleccionar en base a la hidrofobicidad y la carga del biopolímero. Materiales usados para la esterilización de filtros incluyen, pero no se limitan a, polietersulfona (PES), fluoruro de polivinilideno (PVDF), politetrafluoroetileno (PTFE), polipropileno, polietileno, poliamida, celulosa, acetato de celulosa, ésteres mixtos de celulosa u otros derivados de celulosa y nylon. Los fabricantes de filtros de esterilización adecuados incluyen, pero no se limitan a, Millipore, Meissner, Sartorius y similares.

20 El filtro está alojado preferentemente en un cartucho diseñado para fines industriales. Dichos cartuchos se suministran por lo general en varias longitudes, más comúnmente 25,4, 50,8 y 76,2 cm [10, 20 y 30 pulgadas], y proporcionan, en consecuencia, diferentes superficies de filtración. Por ejemplo, un cartucho de filtro de 0,2 μm Durapore™ (Millipore) de 76,2 cm [30 pulgadas] proporciona una superficie de 20.700 cm^2 .

25 En un procedimiento de esterilización típico de una solución de NaHA al 0,1 %, se usa un cartucho de filtro de 0,2 μm hidrófilo de 76,2 cm [30 pulgadas] de longitud, por ejemplo, Durapore™ (Millipore) o Sartobran™ (Sartorius). La filtración se lleva a cabo a 0,689476 bar a 1,03421 bar [10-15 psi], y se aplica una contrapresión de 1,5-2 bars cada 15-20 l de solución. Se debe mantener un caudal mínimo de aproximadamente 750 ml/min. Los filtros se deben someter a ensayos de punto de burbuja y difusión antes y después de cada uso. Los filtros se pueden reutilizar después de limpiar y esterilizar de acuerdo con la recomendación del fabricante y de la validación de las propiedades de esterilización de los filtros reutilizados.

30 El biopolímero filtrado estéril se puede añadir a una unidad de concentración que está conectada a la unidad de esterilización a través de un sistema apropiado de tubos y válvulas. Todos los puntos de entrada y de salida de la unidad de concentración deben estar equipados con medios para llevar a cabo la limpieza y esterilización in situ de los componentes relevantes.

35 La unidad de concentración puede estar equipada con una membrana de ultrafiltración. La membrana de ultrafiltración puede ser una membrana de cerámica, polisulfona, polietersulfona, acetato de celulosa, PES o PVDF hidrolizado o de acero inoxidable. La membrana de ultrafiltración puede tener un diseño de tipo placa y marco, fibra hueca o en espiral. Una membrana cerámica adecuada puede estar compuesta de óxido de titanio, óxido de circonio, óxido de aluminio, óxido de silicio o mezclas de los mismos. La membrana de ultrafiltración debe tener un tamaño de poro de 0,002 a 0,1 μm ; y es preferente un tamaño de poro de 50 nm para el HA.

La concentración por ultrafiltración se mantiene hasta que se alcanza la concentración final deseada del biopolímero. Por ejemplo, una concentración final deseada para NaHA es del 1,0 % al 2, 0%; de 10 g/l a 20 g/l.

45 La eficiencia del procedimiento de ultrafiltración se puede evaluar mediante la determinación de las concentraciones del HA en el retenido, en comparación con el ultrafiltrado. Una concentración mínima en el ultrafiltrado, *por ejemplo*, menos del 1 % en comparación con la del retenido, indica un nivel aceptable de eficiencia.

Después de concentrar hasta la concentración deseada, la solución de biopolímero se puede transferir opcionalmente a un tanque intermedio en el que se lleva a cabo una desgasificación y agitación para garantizar la uniformidad del producto.

50 El producto de biopolímero formulado final se transfiere a continuación a una máquina de carga automatizada adecuada en la que se usan alícuotas uniformes, *por ejemplo*, 0,5 ml, 1,0 ml o 2,0 ml, para cargar unidades de un dispositivo de envasado o liberación estéril adecuado tal como un vial, jeringa, catéter o nebulizador.

55 En el HA formulado se deben evaluar los parámetros de calidad clave, particularmente el peso molecular, concentración, viscosidad, osmolalidad, pureza, contenido de endotoxinas, absorbancia, pH y carga biológica, tal como se lleva a cabo para la evaluación del biopolímero fabricado a granel. También se evalúan parámetros adicionales asociados al producto formulado final, tal como la inyectabilidad y la integridad del envasado.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la formulación de una preparación viscoelástica de ácido hialurónico que comprende:
 - (i) disolver ácido hialurónico fabricado a granel en un medio tampón adecuado para alcanzar una concentración diluida para filtración en condiciones estériles;
- 5 (ii) filtrar en condiciones estériles el ácido hialurónico disuelto fabricado a granel mediante el paso a través de una membrana absoluta de 0,2 micrómetros; y
 - (iii) concentrar el ácido hialurónico por ultrafiltración hasta una concentración final deseada; en la que el ácido hialurónico fabricado a granel se obtiene por medio de un procedimiento que comprende:
 - (a) precipitar con etanol un caldo de cultivo de una cepa fermentada de *Streptococcus* que produce ácido hialurónico no patógeno no hemolítico;
 - 10 (b) disolver el precipitado obtenido en la etapa (a) en cloruro de sodio / etanol / carbón;
 - (c) precipitar el material disuelto obtenido en la etapa (b) con cloruro de cetilpiridinio;
 - (d) disolver el precipitado obtenido en la etapa (c) en cloruro de sodio / etanol;
 - (e) tratar el material disuelto obtenido en la etapa (d) con silicato de magnesio;
 - 15 (f) filtrar el material tratado obtenido en la etapa (e) a través de una membrana absoluta de 0,65 micrómetros; y
 - (g) precipitar el filtrado obtenido en la etapa (f) con etanol.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el ácido hialurónico fabricado a granel comprende además una modificación química.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que el ácido hialurónico fabricado a granel tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 1×10^4 a 1×10^7 daltons.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido hialurónico fabricado a granel tiene un contenido en endotoxinas de $< 0,25$ UE/ml y/o el contenido en proteínas es < 1 mg/g y/o el recuento viable de bacterias aerobias es < 100 UFC/g.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el recuento viable de células bacterianas en el ácido hialurónico fabricado a granel es < 100 UFC/g.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de ácido hialurónico soluble fabricado a granel en la etapa (i) es $< 0,2$ %.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la ultrafiltración se lleva a cabo usando una membrana cerámica.
- 30 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la concentración final deseada está en el intervalo del 0,8 % al 3,0 % p/v.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la concentración final deseada es del 1,0 % p/v, 1,2 % p/v o 2,0 % p/v.
- 35 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además la carga aséptica de un dispositivo de envasado adecuado con el ácido hialurónico.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el dispositivo de envasado se puede seleccionar del grupo que consiste en una jeringa, un vial, un catéter y un nebulizador.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido hialurónico viscoelástico formulado tiene un índice de pseudo-plasticidad en el intervalo de 500 a 4000, de 600 a 1200 o de 600 a 800.
- 40 13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que no se usa ningún conservante del ácido hialurónico viscoelástico.