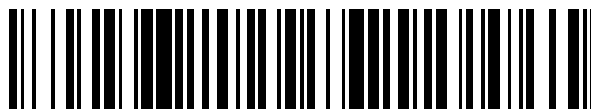


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 366**

51 Int. Cl.:

A61L 27/60 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2013 PCT/IB2013/053475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13164782**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2013 E 13729450 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2844310**

54 Título: **Polisacáridos entrecruzados con memoria de forma**

30 Prioridad:

03.05.2012 IT MI20120732

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

18.01.2018

73 Titular/es:

**MEDICAL AND BIOTECHNOLOGICAL
CONSULTANTS IN SIGLA M.B.C. S.R.L. (100.0%)
Viale degli Atlantici 65/A
82100 Benevento, IT**

72 Inventor/es:

**DE ROSA, MARIO;
SCHIRALDI, CHIARA y
LA GATTA, ANNALISA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 650 366 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

Polisacáridos entrecruzados con memoria de forma

La presente invención se relaciona con un proceso para la preparación de polisacáridos entrecruzados con memoria de forma, que comprende el entrecruzamiento del polisacárido en un sistema de no solvente del polisacárido.

Estado de la técnica

El ácido hialurónico (HA) es el polisacárido de glicosaminoglicano que atrae actualmente el mayor interés de aplicación en el campo biomédico. HA es un polisacárido de cadena lineal con carga negativa, que consiste en la repetición de n unidades de disacárido (-4GlcUA β 1-3GlcNAc β 1-), en el que el ácido D-glucurónico (GlcUA) y la N-acetil-D-glucosamina (Glc-NAC) están unidos con enlaces glicosídico alternantes β -1,3 y β -1,4.

El HA es un polisacárido que es altamente soluble en agua, y las soluciones de HA exhiben comportamiento viscoelástico no newtoniano.

El HA es uno de los ingredientes básicos de la matriz extracelular (ECM). En los vertebrados, el HA tiene una amplia variedad de funciones: en la piel, garantiza la hidratación del tejido, y en el cartílago el HA se une a proteoglicanos para regular el contenido de agua e iones, para estabilizar las propiedades físicas (viscoelásticas) del tejido y las interacciones célula-sustrato. El promedio de peso molecular del HA en el fluido sinovial y el cordón umbilical es 3,000-4,000 KDa. La respuesta biológica provocada por HA mediante interacción con los receptores presentes en las membranas celulares depende principalmente del peso molecular de las cadenas de polisacárido; en particular, la acumulación de HA de bajo peso molecular representa un signo temprano de alteración de la ECM, el cual activa respuestas de reparación de tejido, mientras una preponderancia de HA de alto peso molecular codifica una situación de buena homeóstasis.

Debido a su presencia natural en los tejidos, el HA no desencadena respuestas inmunes cuando es implantado en el cuerpo; por esa razón, y debido a las únicas propiedades reológicas y lubricantes descritas posteriormente, el HA es uno de los biomateriales más versátiles e interesantes disponibles actualmente para aplicaciones en el campo biomédico.

Carácter hidrofílico y propiedades reológicas - En solución acuosa, las moléculas de HA atrapan grandes cantidades de agua (aproximadamente 1000 veces el peso de HA), tomando la forma de espirales extendidas estabilizadas por los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo a lo largo de la cadena. Dichas cadenas se envuelven unas a otras incluso a concentraciones muy bajas; por ello, incluso soluciones muy diluidas HA tienen elevados niveles de viscosidad, pero dependientes de la tasa de corte.

Propiedades lubricantes - Las extraordinarias propiedades reológicas de soluciones de HA, hacen este compuesto un candidato ideal como lubricante en el campo biológico. Esta es una de las acciones ejecutadas por el HA en el cuerpo, en la que separa la superficie de los diferentes tejidos que, debido a su presencia, se deslizan uno respecto a otro. Las articulaciones del cuerpo humano son un ejemplo de este tipo de comportamiento.

Acción de señalización y propiedades de biorrevitalización - Cuando el HA es implantado en el cuerpo, causa respuestas biológicas diferenciadas en las células y tejidos, lo cual depende del peso molecular del material y da lugar a la revitalización de las estructuras biológicas.

La presencia natural de HA en el cuerpo y su habilidad para retener agua han conducido a su uso en una variedad de aplicaciones terapéuticas, tales como tratamiento de desórdenes artríticos, uso como sustituto para el humor vítreo, prevención de adhesiones después de la cirugía, protección de heridas durante la curación, tratamientos de viscosuplementación en las articulaciones, y uso en medicina estética para corregir defectos asociados con el envejecimiento de la piel.

Una de las mayores limitaciones en estas aplicaciones terapéuticas de HA es su rápida degradación debida a la acción de diferentes enzimas, tales como hialuronidasa, glucuronidasa y glucosidasa, o debida a procesos por radicales que alteran sus propiedades reológicas y reducen sus tiempos de residencia *in vivo*.

Una aproximación efectiva para retardar la degradación *in vivo* de HA, es modificar su estructura con un agente de entrecruzamiento el cual, anclando diferentes cadenas de polisacáridos una a otra para crear bucles sobre la misma cadena, limita los procesos de degradación responsables por la corta semivida de este polisacárido *in vivo*.

En particular, el entrecruzamiento de HA involucra la formación de enlaces covalentes entre las cadenas o dentro de las cadenas, que se forman por reacción de los polisacáridos con moléculas multifuncionales capaces de formar enlaces covalentes con los fragmentos de hidroxilo carboxilo presentes en el HA. De acuerdo con la naturaleza

química del agente de entrecruzamiento, la estequiometría y las condiciones de reacción, pueden generarse diferentes procesos de entrecruzamiento de HA, para obtener una amplia variedad de productos con propiedades químicas biológicas y geológicas diferenciadas.

5 Una de las técnicas de entrecruzamiento más comunes, en particular en el caso de HA, es la reacción con diepóxidos en un medio alcalino, con la formación de enlaces éter. El diepóxido más ampliamente usado es 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE). Este tipo de entrecruzamiento ofrece la ventaja de gran estabilidad de los enlaces éter formados, y ausencia de toxicidad del producto entrecruzado, el cual retiene todas las características de biocompatibilidad típicas de HA.

10 El uso de diepóxidos en el entrecruzamiento de polisacáridos, en particular de HA, es reportado de manera extensa en la literatura de patentes. En la mayoría de los casos (US 4,963,666, US 5,827,937, KR 10-2005-0059521, US 6,921,819, US 2005/0281880, US 20060105022, US 2007/0026070, US 2007/0196426, US 6,630,167) la reacción de entrecruzamiento involucra la disolución de HA en NaOH, seguida por su entrecruzamiento en fase homogénea usando BDDE.

15 Como puede verse en la tabla 1, que compara las diferentes metodologías en las que se basan los documentos mencionados anteriormente, todos los métodos de entrecruzamiento que se basan en el uso de BDDE en un medio alcalino, que han sido desarrollados a la fecha, fallan en resolver el problema de un proceso de entrecruzamiento que mantenga (retenga) la forma original del material. En todos los casos reportados en la literatura científica y de patentes, la reacción de entrecruzamiento con BDDE en un medio básico, usa sistemas de solvente para HA que modifican la forma original del material que va a ser entrecruzado.

20 El mantenimiento de la estructura en 3D del material durante el proceso de entrecruzamiento es de importancia crucial cuando, por ejemplo, debe hacerse entrecruzamiento en estructuras en partículas, membranas o esponja o andamios de ingeniería de tejidos en HA.

25 La importancia del desarrollo de una estrategia de entrecruzamiento que mantenga la estructura tridimensional de HA durante el proceso de entrecruzamiento, que por ello es conocido como "memoria de forma", es evidente en vista de los factores establecidos anteriormente.

Tabla 1 - Descripción de métodos de entrecruzamiento de HA con diepóxidos (BDDE) reportados en US4,963,666, US 5,827,937, KR 10-2005-0059521, US 6,921,819, US 2005/0281880, US 20060105022, US 2007/0026070, US 2007/0196426 y US 6,630,167. Todos los datos están estandarizados para un proceso que involucra entrecruzamiento 10g de HA.

Reacción en 10 g de HA con BDDE como agente de entrecruzamiento	BDDE/HA (% p/p)	H ₂ O (mL)	h	(°C)	Referencia
Se disuelve HA en NaOH 0.5% y se hace entrecruzamiento con BDDE (activación con epóxido); el exceso de BDDE es retirado mediante diálisis por 24 h, y se hace entrecruzamiento en el paso de secado por 48h a 25°C. Se obtiene una película que se disuelve en 48 h.	1	300	12	25	US 4,963,666
Método de reacción que conduce inicialmente a un HA activado, bloqueo del entrecruzamiento con un proceso de dilución antes de que el HA forme gel, y a continuación completa el proceso de entrecruzamiento concentrando la mezcla de reacción. Se disuelve HA en NaOH 1%, y se añade BDDE. Después de la primera reacción a 40°C, se diluye la mezcla 10 veces, se neutraliza y se concentra en un evaporador rotativo. Se obtiene un gel continuo.	0,20	100	4	40	US 5,827,937

30

(continuación)					
Reacción en 10 g de HA con BDDE como agente de entrecruzamiento	BDDE/HA (% p/p)	H ₂ O (mL)	h	(°C)	Referencia
El método requiere de la adición a la solución básica que contiene HA y BDDE, de un gran volumen de etanol o acetona que hacen precipitar HA, el cual continúa haciendo entrecruzamiento incluso después de la precipitación. Se disuelve el HA (5-15% p/p) en NaOH 4-19% al cual se añade BDDE; se coloca luego la mezcla en etanol o acetona, para obtener un precipitado. Se neutraliza la mezcla y se lava con H ₂ O, y se obtiene un material granulado o fibroso.	2,4	400	24	25-50	KR 10-2005-0059521
El método reivindica que el proceso de entrecruzamiento tiene lugar durante la hidratación de HA. El HA es hidratado con 68 g de NaOH 1% que contiene BDDE. Se obtiene un gel continuo que es neutralizado con amortiguador de fosfato y es homogeneizado.	6,8	67	3	50	US 6,921,819
El método requiere que la reacción sea ejecutada en un reactor en el cual se realizan todos los pasos del proceso de 3 días. Se disuelve HA en NaOH 1% y se añade BDDE. Se obtiene un gel continuo.	60-100	100	4	50	US 2005/0281880
Método de reacción con una elevada concentración de HA (>20%), con mezcla en revolución rotatoria. Se hidrata el HA con 22.5mL de NaOH 0.2N que contiene BDDE, se mezcla por revolución rotatoria durante 5 min y se deja a temperatura ambiente por 24 h. Se obtiene un gel continuo.	0,5	22,5	24	25	US 20060105022
El método involucra un primer paso de entrecruzamiento en la solución básica, y un paso siguiente de manera concomitante con secado de la mezcla de reacción bajo vacío. Se disuelve el HA en NaOH 1% al cual se añade BDDE. Después de 2 h a 45°C se seca la mezcla a 40°C bajo vacío por 1.5 h. Se lava entonces tres veces con 500 mL de isopropil alcohol (IPA)-H ₂ O 6:4 por 22 h; se retira el solvente y se lava la mezcla con 500 mL de CH ₃ COOH 1.3% en H ₂ O por 35 min, 1L de IPA, 500 mL de IPA-H ₂ O 6:4; 2L de IPA, 2L de IPA-H ₂ O 8:2, y 1L de IPA.	2,5	250	2	45	US 2007/0026070
El método involucra una reacción de entrecruzamiento doble: se disuelve HA en NaOH 1% en el primero, y se añade BDDE en el segundo. Se añaden otros 200 mL de 0.5% HA a pH 11. Se obtiene un gel continuo.	0,85	100	9 6	25 25	US 2007/0196426
Se divulga un método para la preparación de esponjas de HA entrecruzadas, obtenidas mediante liofilización de soluciones acuosas de HA y entrecruzamiento del					US 6,630,167

liofilizado. Se introduce entonces una solución acuosa de HA dentro de la esponja entrecruzada, para producir una barrera anti-adhesión para uso quirúrgico. El documento reclama de manera genérica todos los tipos de entrecruzamiento, pero no da ningún ejemplo con BDDE u otros diepóxidos.					
--	--	--	--	--	--

Descripción de la invención

5 Se ha hallado ahora que la reacción de entrecruzamiento de HA y otros polisacáridos tales como condroitina, condroitina sulfato, quitosano y polidextrano, puede ser ejecutada con epóxidos polifuncionales, que operan directamente en un sistema de no solvente para el polisacárido, de modo que se obtiene un polisacárido entrecruzado que retiene las características de 3D del polisacárido de partida ("memoria de forma").

El proceso tiene más ventajas que la técnica anterior, involucrando bajos volúmenes de reacción, menores tiempos para la síntesis y purificación del material entrecruzado, costos de síntesis menos onerosos, y la posibilidad única de mantener la forma 3D del material ("memoria de forma") durante el entrecruzamiento.

10 Como se discutió anteriormente, la reacción de entrecruzamiento de polisacáridos, en particular HA, en un medio básico, con reactivos de epóxidos polifuncionales, representa actualmente la estrategia de primera elección en la producción de HA entrecruzado, debido a la elevada estabilidad química y biológica del enlace éter y la biocompatibilidad total de este tipo de material después de la implantación.

15 El problema crucial de la reacción de entrecruzamiento de HA con epóxidos funcionales es la necesidad de operar en un medio fuertemente básico, pH > 12, por tiempos que llegan hasta varias horas, a temperaturas que varían entre 20 y 70°C. Estas condiciones causan, en paralelo con el proceso de entrecruzamiento dentro de la molécula y entre las moléculas, la hidrólisis de los enlaces glicósido presentes en la cadena de polisacáridos, lo que conduce a una reducción de su peso molecular. La competencia entre estos dos procesos determina las características estructurales de la matriz de polisacárido entrecruzado que se forma, la cual se caracteriza sustancialmente por la presencia en el sistema entrecruzado de segmentos de polímero lineal, que son significativamente más cortos que los usados originalmente. La identificación de las condiciones de reacción que minimizan el proceso de hidrólisis, comparado con el proceso de entrecruzamiento, es por ello particularmente importante.

25 En los métodos conocidos hasta hoy, el HA ha sido entrelazado siempre en sistemas de solvente para HA, usualmente soluciones acuosas de NaOH, lo cual da lugar a soluciones reales o pastas hidratadas que, cuando la reacción está completa, consisten en un gel continuo que puede ser reducido mediante tratamiento mecánico a partículas pequeñas, generalmente entre 50 y 500 µm. En particular en el caso de la reacción en solución (US 4,963,666, US 5,827,937, US 6,921,819, US 2005/0281880, US 2007/0026070, US 2007/0196426 y US 6,630,167), se requieren grandes volúmenes de reacción debido a la elevada viscosidad de las soluciones de ácido hialurónico, lo cual hace el proceso de síntesis complejo y muy costoso.

30 Sin embargo, el uso de pastas hidratadas de ácido hialurónico (US 20060105022) crea problemas asociados con la fuerte consistencia de dichas masas, que presentan dificultad para mezclarse homogéneamente, en especial a escala industrial.

El proceso de acuerdo con la invención comprende el entrecruzamiento de los polisacáridos en un sistema de no solvente para el polisacárido, en presencia de bases de amonio cuaternario y un epóxido polifuncional.

35 El proceso puede ser usado para el entrecruzamiento de ácido hialurónico, condroitina y condroitina sulfato, preferiblemente ácido hialurónico.

El sistema de no solvente consiste en mezclas de solventes orgánicos y agua con una relación de volumen entre el solvente orgánico y agua ≥ 2 .

40 Son ejemplos de solventes orgánicos adecuados, las cetonas, alcoholes y ésteres miscibles en agua. Se prefiere particularmente la acetona.

La reacción tiene que ocurrir a valores de pH > 12, el cual puede ser alcanzado con bases de amonio cuaternario pero no con hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxidos de metales alcalinos y de metales alcalinotérreos.

45 Son ejemplos de bases de amonio cuaternario hidróxido de tetrabutil amonio, hidróxido de tetrapropil amonio, hidróxido de tetraetil amonio, hidróxido de tetrametil amonio, hidróxido de bencil tributil amonio, hidróxido de bencil tripropil amonio, hidróxido de bencil trietil amonio, hidróxido de bencil trimetil amonio, hidróxido de metil tributil amonio, hidróxido de metil tripropil amonio, hidróxido de metil trietil amonio, hidróxido de fenil tributil amonio,

hidróxido de fenil tripropil amonio, hidróxido de fenil trietil amonio, hidróxido de fenil trimetil amonio, hidróxido de dodecil trimetil amonio, hidróxido de tetradecil trimetil amonio, hidróxido de hexadecil trimetil amonio, hidróxido de octadecil trimetil amonio e hidróxido de colina. Dichas bases son usadas preferiblemente en concentraciones que varían entre 0.125 y 1.3 M. Se prefiere modo particular hidróxido de bencil trimetil amonio.

5 El agente de entrecruzamiento de epóxido polifuncional es seleccionado de 1,3-butadien diepóxido, 1,2,7,8-diepoxioctano, epoxi 1,5-hexadieno, etilen glicol diglicidil éter, 1,4-butanodiol diglicidil éter, 1,6-hexanodiol diglicidil éter, polietilen glicol diglicidil éter, polipropilen glicol diglicidil éter y bisfenol A diglicidil éter. Se prefieren 1,4-butanodiol diglicidil éter, polietilen glicol y polipropilen glicol diglicidil éter.

10 La relación molar de agente de entrecruzamiento respecto al grupo polisacárido reactivo afecta el rendimiento de la reacción y las características del HA entrecruzado. Cuanto mayor sea dicha relación, mayor es el grado de entrecruzamiento, el porcentaje de rendimiento de HA insoluble entrecruzado y su estabilidad al ataque por hialuronidasa y radicales libres.

La relación molar de grupos epoxi presentes en el agente de entrecruzamiento a los grupos funcionales polisacárido capaces de reaccionar con los grupos epoxi es ≤ 1 .

15 La reacción puede ser conducida a temperaturas entre 30 y 80°C, para tiempos de reacción entre 1.5 y 100 h, preferiblemente entre 2 y 16 h. los rendimientos de HA entrecruzado aumentan linealmente con el aumento en la temperatura de reacción hasta $T = 60^\circ\text{C}$. A mayores temperaturas, el rendimiento de reacción baja debido a la prevalencia del proceso de hidrólisis, asociado con el medio básico de reacción. El aumento en los tiempos de reacción causa un aumento en el rendimiento de ácido hialurónico entrecruzado insoluble. Dicho aumento es particularmente notorio en las primeras 3 h, cuando se forma aproximadamente 70% del HA entrecruzado, siendo la cantidad formada aproximadamente 100% después de 16 h. Por ello se prefieren tiempos de reacción de 3-16 h, preferiblemente entre 3 y 8 horas debido a que ello representa el mejor compromiso entre el rendimiento de reacción y los tiempos de proceso.

25 El proceso corriente abajo de purificación de HA involucra inicialmente la detención de la reacción de entrecruzamiento mediante el ajuste del pH de la mezcla de reacción a 7.4, por adición de H_3PO_4 concentrado. El siguiente paso involucra la purificación del HA entrecruzado, retirando la fase líquida que contiene los reactivos y productos secundarios de la reacción, y lavados sucesivos con soluciones acuosas-orgánicas. Como solventes orgánicos mezclados con agua pueden usarse etanol, acetona, tetrahidrofurano y dimetilformamida, preferiblemente etanol y acetona. El porcentaje de agua presente en la solución de lavado afecta el grado de hinchamiento del polisacárido entrecruzado; preferiblemente se usa una solución de aproximadamente 1:1 (v/v). La saturación de la solución de lavado con sales inorgánicas, principalmente cloruros de metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como NaCl, KCl, CaCl_2 , etc., en los primeros pasos de proceso de purificación, permite que se mueva el ion de amonio cuaternario que se deriva de la base orgánica usada en la reacción, con objeto de obtener la sal deseada (hialuronato entrecruzado de sodio, potasio o calcio, etc.). El retiro del ion amonio cuaternario es vigilado de manera espectrofotométrica. Los últimos pasos de lavado son ejecutados con soluciones de agua/solvente orgánico no saturadas con la sal. Cuando la conductividad alcanza valores de unas pocas decenas de mS/cm, se recupera la fase sólida entrecruzada, y puede secársele mediante liofilización o alternativamente mediante tratamiento con acetona o etanol anhidros, seguido por secado en caliente (40-45°C) bajo vacío. La fracción de HA entrecruzado insoluble en agua en el producto recuperado es determinada por el lavado del producto en agua, seguido por la medición gravimétrica de la fracción insoluble. La relación de porcentaje entre la masa de muestra insoluble recuperada y la masa de HA sometida a la reacción, representa el rendimiento de reacción.

35 Las ventajas del método reivindicado sobre la técnica previa son: a) que produce un producto entrecruzado "con memoria de forma" el cual, después de la hidratación, tiene la misma geometría que la matriz de polisacárido que reaccionó; b) que mantiene mayor integridad estructural de la cadena de polisacáridos, porque los procesos de hidrólisis atribuibles al medio básico de reacción, son más limitados; c) la posibilidad de operar con volúmenes de reacción muy pequeños; d) la posibilidad de modular fácilmente el proceso de entrecruzamiento; e) la obtención de matrices entrecruzadas altamente biocompatibles con mayor estabilidad química en los sitios de implantación, las cuales no son obtenibles con los protocolos desarrollados actualmente para el entrecruzamiento con epóxidos polifuncionales en un medio básico.

50 A continuación, los ejemplos describen la invención en más detalle.

Ejemplo 1 - efecto de la cantidad de agua sobre la reacción de entrecruzamiento

Se agregan 100 mL de mezcla de reacción que contienen diferentes cantidades de agua y acetona (6.35, 16.35 y 33.05% v/v de agua), que representan sistemas de no solvente para HA, en los que se disuelven la base orgánica TBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, 10 mL de solución acuosa 40% p/p ≈ 2.5 M) (25 mmol) y 0.68 mL del agente de entrecruzamiento BDDE (relación molar de BDDE/grupos OH de HA = 3.5%), a 10g de HA en polvo

(partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 μm); en vista de la naturaleza bifuncional de BDDE, existe una posibilidad teórica de comprometer en el enlace éter 7% de los fragmentos disponibles de hidroxilo en HA, es decir una relación equivalente de 7%. La mezcla de reacción que va a ser añadida al HA en polvo está en forma de un sistema homogéneo con porcentajes de agua de 16.35 y 33.05% (v/v); sin embargo, con un porcentaje de agua de 6.35% (que corresponde a la cantidad de agua introducida con la base orgánica), la mezcla es bifásica. Después de que se ha agregado el HA, la mezcla de reacción que presenta una consistencia pastosa, reacciona por 3 h a 50°C, bajo mezcla vigorosa. La reacción es detenida mediante adición de H_3PO_4 concentrado (14.8 M) hasta neutralización. Se purifica la mezcla de reacción como se especifica a continuación: a) se retira la fase líquida que contiene los contaminantes solubles; b) se realizan 4 lavados con 200 mL de una solución etanol/agua 53.5/46.5 saturada con NaCl; c) se ejecuta 1 lavado con 200 mL de una solución etanol/agua 50/50; d) se agrega etanol puro hasta que se alcanza una relación etanol/agua de 80/20 v/v, y se retira la fase líquida; e) se ejecutan 10 lavados con 100 mL de una solución etanol/agua 80/20; f) el polvo de HA entrecruzado es tratado con etanol anhidro (4 lavados con 100 mL de etanol anhidro) y se seca bajo vacío a 40°C. A lo largo del procedimiento se retira la fase líquida mediante filtración a través de una membrana cerámica porosa (tamaño de poro: 20 μm). La tabla 2 muestra la composición de las diferentes mezclas de reacción y los rendimientos de reacción en HA entrecruzado insoluble.

En la reacción se obtiene un producto en forma de partículas, con las mismas relaciones dimensionales que el HA usado, con porcentajes de rendimiento comparados con HA de 0.00 a 6.35 v/v de agua, 43.4 +/- 5.5 a 16.35 v/v de agua y 79.4 +/- 4.9 (%) a 33.05% v/v de agua. El HA obtenido usando 33.05% v/v de agua, cuando se hidrata, tiene la apariencia de un gel continuo, mientras el HA entrecruzado con 16.35% v/v de agua, cuando se hidrata, tiene la apariencia de un producto en partículas en forma de gel, con un factor de hinchamiento de aproximadamente 235 mL/g en agua y 90 mL/g en solución salina. A partir de una comparación entre la tabla 2 y la tabla 1, aparecen claramente las diferencias en las condiciones experimentales, en relación con métodos conocidos, especialmente en lo que se refiere a la cantidad de agua usada.

Tabla 2 - Mezcla de reacción con cantidades variables de agua (incluyendo el agua presente en el TBAH) y rendimientos de reacción como un % de HA insoluble en agua, entrecruzado, con memoria de forma.

Muestra (% H_2O)*	HA (g)	Acetona (mL)	H_2O (mL)	TBAH** (mL de solución/mmol TBAH/ mLH_2O)	BDDE (mL)	Insoluble° (%)
1 6,35%	10	89,32	0,0	10/25/6,35	0,68	0,0°°
2 16,35%	10	79,32	10,0	10/25/6,35	0,68	43,4 $\pm$ 5,5
3 33,05%	10	62,62	26,7	10/25/6,35	0,68	79,4 $\pm$ 4,9
* Total % de H_2O en la mezcla de reacción, incluyendo la presente en TBAH; ** solución acuosa 40% p/p $\equiv$ 2.5 M; % de HA entrecruzado con memoria de forma; °° el rendimiento es 0 porque el producto opcionalmente entrecruzado se disuelve en las soluciones de lavado durante la purificación.						

Ejemplo 2 - Efecto del tiempo en la reacción de entrecruzamiento

Se preparan seis mezclas de reacción, cada una formada por 10 g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 μm , a las cuales se añaden 100 mL de mezcla de reacción que consiste en: 10 mL de agua, 79.32 mL de acetona, 10 mL de TBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p $\equiv$ 2.5 M) (25 mmol) y 0.68 mL de BDDE (relación en equivalentes de BDDE/HA = 7%). El HA no se disuelve en la mezcla de reacción, y el sistema tiene una consistencia pastosa. Las diferentes muestras reaccionan a 50°C por tiempos que varían entre 0.5 y 6 h bajo mezcla enérgica. La reacción es detenida periódicamente por adición de 14.8 M H_3PO_4 hasta neutralización. Se purifican las diferentes mezclas de reacción, como se describe a continuación: a) se retira la fase líquida que contiene los contaminantes solubles; b) se realizan 4 lavados con 200 mL de una solución acetona/agua 53.5/46.5 saturada con NaCl; c) se ejecuta 1 lavado con 200 mL de una solución acetona/agua 50/50; d) se agrega acetona pura hasta que se alcanza una relación acetona/agua de 80/20 v/v, y se retira la fase líquida; e) se ejecutan 10 lavados con 100 mL de una solución acetona/agua 80/20; f) el polvo de HA entrecruzado es tratado con acetona anhidra (4 lavados con 100 mL de acetona anhidra) y se seca bajo vacío a 40°C. Los rendimientos de reacción, definidos como el % de HA obtenido insoluble en agua, entrecruzado, con memoria de forma, comparado con el HA usado en la reacción, son 0.00 a 0.5 h, 7.01 +/- 1.2 a 1.5 h, 43.44 +/- 5.5 a 3 h, 53.6 +/- 6.6 a 5 h, 58.9 +/- 5.9 a 7 h y 62.3 +/- 4.4 a 16 h. En todos los casos se obtiene un material en partículas con las mismas características dimensionales del HA usado en la reacción, que hincha en agua, dando lugar a partículas de gel con una consistencia elástica.

Ejemplo 3 - Efecto de la temperatura en la reacción de entrecruzamiento

Se preparan cinco mezclas de reacción, cada una formada por 10 g de HA en polvo (partículas con dimensiones

entre 0.2 y 80 μm , a las cuales se añaden 100 mL de mezcla de reacción que consiste en: 10 mL de agua, 79.32 mL de acetona, 10 mL de TBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p ≈ 2.5 M) (25 mmol) y 0.68 mL de BDDE (relación en equivalentes de BDDE/HA = 7%). El HA no se disuelve en la mezcla de reacción, y el sistema tiene una consistencia pastosa. Las diferentes muestras reaccionan a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70°C) por 3 h bajo agitación vigorosa. La reacción es detenida periódicamente por adición de H_3PO_4 14.8 M hasta neutralización. Se purifican las diferentes mezclas de reacción, como se describe en el ejemplo 1. Los rendimientos de reacción, definidos como el % de HA obtenido insoluble en agua, entrecruzado, comparado con el HA usado en la reacción, son 1.0 a 30°C, 28.0 $\pm$ 4.1 a 40°C, 43.4 $\pm$ 5.5 a 50°C, 66.0 $\pm$ 6.2 a 60° y 47.3 $\pm$ 7.3 a 70°C. En todos los casos se obtiene un material en forma de partículas, con las mismas características dimensionales del HA usado en la reacción, el cual hincha en agua, dando lugar a partículas de gel con una consistencia elástica.

Ejemplo 4 - Efecto de la concentración de base en la reacción de entrecruzamiento

Se preparan 6 mezclas de reacción como se muestra en la tabla 3, cada una formada por 10 g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 μm), a las cuales se añaden 100 mL de mezcla de reacción, que consiste en: acetona, agua, BDDE 0.68 mL (relación en equivalentes de BDDE/HA = 7%) y diferentes cantidades de TBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p ≈ 2.5 M) que varía de 0.025 a 0.64 M; el cálculo de la cantidad de agua en 16.35% tiene en cuenta el agua presente en el TBAH. A concentraciones de TBAH que exceden 0.3 M (30 mmol de TBAH en el volumen de reacción), la mezcla de reacción es bifásica.

Tabla 3 - Mezcla de reacción con cantidades variables de TBAH y rendimientos de reacción como un % de HA insoluble en agua, entrecruzado, con memoria de forma.

Muestra (% H_2O)*		HA (g)	Acetona (mL)	H_2O (mL)	TBAH** (mL de solución/mmol TBAH/mL H_2O)			BDDE (mL)	Insoluble° (%)
1	16,35	10	82,61	15,71	1,0	2,5	0,64	0,68	0,0°°
2	16,35	10	81,15	13,17	5,0	12,5	3,18	0,68	18,2 $\pm$ 1,0
3	16,35	10	79,32	10,00	10,0	25,0	6,35	0,68	43,4 $\pm$ 5,5
4	16,35	10	78,60	8,72	12,0	30,0	7,63	0,68	54,8 $\pm$ 1,8
5	16,35	10	75,69	3,63	20,0	50,0	12,72	0,68	66,9 $\pm$ 1,2
6	16,35	10	73,65	0,07	25,6	64,0	16,28	0,68	64,6 $\pm$ 3,2

* Total % de H_2O en la mezcla de reacción, incluyendo la presente en TBAH; ** solución acuosa 40% p/p ≈ 2.5 M; ° % de HA entrecruzado con memoria de forma; °° el rendimiento es 0 porque aunque el producto es entrecruzado, se disuelve en las soluciones de lavado durante la purificación.

El HA no se disuelve en la mezcla de reacción, y el sistema tiene una consistencia pastosa. Las diferentes muestras reaccionan a 50°C por 3 h bajo mezcla enérgica. La reacción es detenida mediante adición de H_3PO_4 14.8 M hasta neutralización. Se purifican las diferentes mezclas de reacción, como se describe en el ejemplo 1. Los rendimientos de reacción, definidos como el % de HA obtenido insoluble en agua, entrecruzado, comparado con el HA usado en la reacción, son 0.00 con 0.025 M TBAH, 18.2 $\pm$ 2.8 con 0.125 M TBAH, 43.4 $\pm$ 5.5 con 0.250 M TBAH, 54.8 $\pm$ 1.8 con 0.300 M TBAH, 66.9 $\pm$ 1.2 con 0.500 M TBAH, y 64.6 $\pm$ 3.2 con 0.640 M TBAH. En todos los casos se obtiene un material en forma de partículas, con las mismas características dimensionales del HA usado en la reacción, el cual hincha en agua, dando lugar a partículas de gel con una consistencia elástica.

Ejemplo 5 - Efecto de la cantidad de BDDE en la reacción de entrecruzamiento

Se preparan 4 mezclas de reacción como se muestra en la tabla 4, cada una formada por 10 g de HA en polvo, partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 μm , a las cuales se añaden 100 mL de mezcla de reacción, que consiste en: agua, acetona, TBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p ≈ 2.5 M) 10 mL (25 mmol) y diferentes cantidades de BDDE, es decir 0.34, 0.68, 1.36 y 2.91 mL (relación en equivalentes de BDDE/HA 3, 5, 7, 14 y 30% respectivamente). El HA no se disuelve en la mezcla de reacción, y el sistema tiene una consistencia pastosa. Las diferentes muestras reaccionan a 50°C por 3 h bajo agitación vigorosa.

Tabla 4 - Mezcla de reacción con cantidades variables de TBAH y rendimientos de reacción como un % de HA entrecruzado, insoluble en agua, con memoria de forma.

Muestra (% H ₂ O)*	HA (g)	Acetona (mL)	H ₂ O (mL)	TMBAH** (mLsol./mLH ₂ O°)	BDDE (mL - %°)		Insoluble°° (%)
1 16,35%	10	79,66	10,0	10/6,35	0,34	3,5	0,0^
2 16,35%	10	79,32	10,0	10/6,35	0,68	7,0	43,4 ± 5,5
3 16,35%	10	78,63	10,0	10/6,35	1,36	14,0	60,8 ± 7,2
4 16,35%	10	77,09	10,0	10/6,35	2,91	30,0	74,5 ± 3,4

* Total % de H₂O en la mezcla de reacción, incluyendo la presente en TMBAH; ** solución acuosa 40% p/p ≡ 2.5 M; ° cantidad de agua contenida en 10 mL de TMBAH; ° relación en equivalentes de BDDE/HA; °° % de HA entrecruzado con memoria de forma; ^ el rendimiento es 0 porque aunque el producto está entrecruzado, se disuelve en las soluciones de lavado durante la purificación.

La reacción es detenida periódicamente por adición de H₃PO₄ 14.8 M hasta neutralización. Se purifican las diferentes mezclas de reacción, como se describe en el ejemplo 1. Los rendimientos de reacción, definidos como el % de HA obtenido insoluble en agua, entrecruzado, comparado con el HA usado en la reacción, son 0.0 con 0.34 mL de BDDE, 43.4 +/- 5.5 con 0.68 mL de BDDE, 60.8 +/- 7.2 con 1.36 mL de BDDE, y 74.5 +/- 3.4 con 2.91 mL de BDDE. En todos los casos se obtiene un material en forma de partículas, con las mismas características dimensionales del HA usado en la reacción, el cual hincha en agua, dando lugar a partículas de gel con una consistencia elástica.

Ejemplo 6 - Hinchamiento de materiales a base de HA con memoria de forma, con diferentes grados de entrecruzamiento en diferentes tipos de sistemas acuosos.

Se determina el grado de hinchamiento en agua y solución salina bajo condiciones de estado estable a la temperatura de 37°C, para muestras de HA entrecruzado con una relación de 7%, 11% y 14% en equivalentes de BDDE/HA.

Se preparan 3 mezclas de reacción como se muestra en la tabla 5, cada una formada por 10 g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 µm), a las cuales se añaden 100 mL de mezcla de reacción, que consiste en: agua, acetona, TMBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p ≡ 2.5 M) 10 mL (25 mmol) y diferentes cantidades de BDDE, es decir 0.68, 1.07 y 1.36 mL respectivamente (relación en equivalentes BDDE/HA de 7, 11 y 14% respectivamente). El HA no se disuelve en la mezcla de reacción y el sistema tiene una consistencia pastosa. Las diferentes muestras reaccionan a 60°C por 3 h bajo agitación vigorosa.

La reacción es detenida periódicamente por adición de H₃PO₄ 14.8 M hasta neutralización. Se purifican las diferentes mezclas de reacción, como se describe en el ejemplo 1. Los rendimientos de reacción, definidos como el % de HA obtenido insoluble en agua, entrecruzado, comparado con el HA usado en la reacción, son 65.7 +/- 5.2 con 0.68 mL de BDDE, 70.8 +/- 4.2 con 1.07 mL de BDDE, y 74.5 +/- 5.3 con 1.36 mL de BDDE. En todos los casos se obtiene un material en forma de partículas con las mismas características dimensionales que el HA usado en la reacción.

Las muestras preparadas son suspendidas nuevamente en agua bidestilada o solución salina a la concentración de 5 mg/mL. Se someten las suspensiones a tratamiento en autoclave (12 min, 120°C) en un cilindro graduado y se deja hinchar por 12 h. Se determina el grado de hinchamiento midiendo el volumen de gel en el cilindro, y se expresa como mL de gel/g de HA entrecruzado insoluble. Todas las mediciones son ejecutadas en triplicado.

El hinchamiento en agua es 264 +/- 13 mL/g para la muestra con una relación de 7% en equivalentes BDDE/HA, 160 +/- 11 mL/g para la muestra con una relación de 11% en equivalentes BDDE/HA, y 115 +/- 13 mL/g para la muestra con una relación de 14% en equivalentes BDDE/HA.

Tabla 5 - Valores de grado de hinchamiento de muestras de HA entrecruzado con memoria de muestra, con diferentes cantidades con de BDDE. Se agregan 100 mL de una mezcla de reacción consistente en H₂O (17.65 mL), TMBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p ≡ 2.5 M) 10 mL, correspondiente a 25 mmol de TMBAH y 6.35 mL de H₂O, a 10g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 µm), adicionalmente a BDDE y acetona como se indica en la tabla.

Muestra (% H ₂ O)*	Acetona (mL)	BDDE		Insoluble° (%)	Grado de hinchamiento (mL/g)	
		%**	mL		agua	solución salina

1	71,67	7,0	0,68	65,7 ± 5,2	264 ±13	110 ±5
2	71,28	11,0	1,07	70,8 ± 4,2	160 ±11	81 ±5
3	70,99	14,0	1,36	74,5 ± 5,3	115 ±13	75 ±2
* Total % de H ₂ O en la mezcla de reacción, incluyendo la presente en TBAH; **relación en equivalentes BDDE/HA; ° % de HA entrecruzado con memoria de forma.						

El % de hinchamiento en solución salina para la muestra es 110 +/- 5 mL/g con una relación de 7% en equivalentes BDDE/HA, 81 +/- 5 mL/g para la muestra con una relación de 11% en equivalentes BDDE/HA, y 75 +/- 2 mL/g para la muestra con una relación de 14% en equivalentes BDDE/HA. Como se esperaba, el grado de hinchamiento es mayor en agua que en solución salina, y un aumento en el porcentaje de agente de entrecruzamiento reduce la cantidad de agua absorbida por gramo de muestra, porque el aumento en el grado de entrecruzamiento implica menor tendencia del material a deformarse, y en consecuencia menor porosidad.

Ejemplo 7 - Preparación de HA entrecruzado con polietilen glicol diglicidil éter (PEGDGE)

Se preparan 2 mezclas de reacción como se muestra en la tabla 6, cada una formada por 10 g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 µm), a las cuales se añaden 100 mL de mezcla de reacción, que consiste en: agua, acetona, TBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa de 40% p/p ≅ 2.5 Mw) 10 mL (25 mmol) y diferentes cantidades de PEGDGE (Sigma Aldrich, Milan, Italia; producto no. 475696, promedio de M_n = 526Da, d=1.14 g/mL), es decir 2.0 y 3.1 mL (relación en equivalentes PEGDGE/HA: 9 y 14% y). El HA no se disuelve en la mezcla de reacción y el sistema tiene una consistencia pastosa. Las diferentes muestras reaccionan a 60°C por 3 h bajo agitación vigorosa.

Tabla 6 - Mezcla de reacción con cantidades variables de PEGDGE y rendimientos de reacción como un % de HA insoluble en agua, entrecruzado con memoria de forma

Muestra (% H ₂ O)*	HA (g)	Acetona (mL)	H ₂ O (mL)	TBAH** (mLsol./mLH ₂ O°)	PEGDGE (mL - %°)		Insoluble°° (%)
1 24%	10	70,35	17,65	10/6,35	2,0	9	61,0 ± 3,5
2 24%	10	69,25	17,65	10/6,35	3,1	14	74,0 ± 4,5
* Total % de H ₂ O en la mezcla de reacción, incluyendo la presente TBAH; ** solución acuosa 40% p/p ≅ 2.5 M; ° cantidad de agua contenida en 10 mL de TBAH; ° relación en equivalentes PEGDGE/HA; °° % de HA entrecruzado con memoria de forma.							

La reacción es detenida periódicamente por adición de H₃PO₄ 14.8 M hasta neutralización. Se purifican las diferentes mezclas de reacción, como se describe en el ejemplo 1. Los rendimientos de reacción, definidos como el % de HA obtenido insoluble en agua, entrecruzado, comparado con el HA usado en la reacción, son 61.0 +/- 3.5 con 0.20 mL de PEGDGE, y 74.5 +/- 4.5 con 0.31 mL de PEGDGE. En todos los casos se obtiene un material en forma de partículas con las mismas características dimensionales que el HA usado en la reacción.

Ejemplo 8 - Evaluación de estabilidad a la hialuronidasa de materiales a base de HA con memoria de forma con diferentes grados de entrecruzamiento

Se determinó la estabilidad de materiales con memoria de forma, a base de HA con diferentes grados de entrecruzamiento, descritos en el ejemplo 6, frente a la acción de degradación de hialuronidasa testicular bovina (BTH). BHT es una endoglucano hidrolasa, cuyo pH óptimo para la actividad de hidrolasa es aproximadamente 4-5. El estudio fue conducido mediante comparación con Restilane®, un producto a base de HA entrecruzado con BDDE, que es usado ampliamente como un agente intradérmico de relleno para tratamientos estéticos de medicina. Se suspenden las muestras a la concentración de 4 mg/mL en amortiguador de fosfato con pH 7.4, se someten a tratamiento en autoclave (12 min a 120°C) y se incuban a 37°C bajo agitación (1,000 rpm) con 50 U/mL de BTH (en el caso de Restilane, se diluye el producto directamente en amortiguador de fosfato y se incuba con BTH). En los tiempos establecidos, se calientan las muestras a 100°C por 10 min para detener la actividad enzimática. Se filtran las muestras a través de un filtro de 0.45 µm y se prueba el filtrado (que contiene la fracción soluble de la muestra) respecto al contenido de HA con la prueba de carbazol (T. Bitter, H.M. Muir, Anal. Biochem. 1962, 330-334).

La degradación es establecida por seguimiento del aumento en la fracción soluble durante el tiempo.

$$\% \text{ de HA soluble} = (\text{masa de HA en el permeado (g)}) / (\text{masa de HA incubada (g)}) \times 100$$

La tabla 7 muestra los datos obtenidos. Los productos analizados presentan diferencias sustanciales en los tiempos de degradación. En particular, la rata de degradación de los productos descritos en el ejemplo 6 desciende a medida que aumenta el grado de entrecruzamiento: la muestra entrecruzada con 7% de BDDE disuelve completamente a tiempos de incubación entre 6 y 24 h; el producto entrecruzado con 11% de BDDE alcanza la disolución completa después de tiempos de incubación 10 veces mayores; cuando el producto entrecruzado con 11% de BDDE se disuelve completamente, la fracción soluble del producto entrecruzado con 14% de BDDE suma hasta aproximadamente 50% del total. Bajo las mismas condiciones experimentales, el producto comercial Restilane se disuelve completamente en menos de 3 h.

Tabla 7 - Estabilidad *in vitro* a 37°C de muestras de HA entrecruzado con diferentes cantidades de BDDE, con memoria de forma, preparadas de acuerdo con el ejemplo 6, y de una muestra comercial de Restilane, frente a la hidrólisis catalizada por hialuronidasa bovina (BTH 50 U/mL) ®.

Muestra (% BDDE)*	% soluble después de incubación con BTH 50 U/mL							
	0h	1h	3h	6h	24h	3 días	10 días	17 días
1 (7)	3,7 ± 0,5	53,8 ± 5,3	83,7 ± 2,8	90,7 ± 1,8	100			
2(11)	4,0 ± 0,1		25,0 ± 1,0		69,0 ± 0,3	77 ± 7	97,0 ± 0,5	
3 (14)	0,1 ± 0,0		10,2 ± 1,1		18,4 ± 0,8	29,8 ± 4,1	51,8 ± 1,8	61,0 ± 4,0
Restylane®	33,0 ± 5,0		100					

° Relación en equivalentes de BDDE/HA.

Ejemplo 9 - Idoneidad para la extrusión de productos en forma de partícula con memoria de forma, a base de HA entrecruzado

En vista del posible uso de productos en partícula a base de HA entrecruzado con memoria de forma, en el campo de la medicina estética, como agente de relleno para ser microinyectado bajo la piel, se ha evaluado la idoneidad para la extrusión de suspensiones en solución salina (0.9% p/v de NaCl) de muestras de HA entrecruzado con una relación de 7%, 11% y 14% en equivalentes de BDDE/HA, preparadas como se describió en el ejemplo 6. Se deja que las muestras entrecruzadas hinchén en solución salina a las concentraciones de 20, 25 y 30 mg/mL. Se mantienen bajo agitación las suspensiones (1,000 rpm) por 2-3 h. Todas las muestras hincharon hasta que se convirtieron en geles con una elasticidad que desciende a medida que aumenta la concentración de las suspensiones y el grado de entrecruzamiento. Se llenaron jeringas de vidrio de 2 mL con las suspensiones hidratadas, y luego soportaron un ciclo de esterilización por 12 min a 120°C. Se sometieron a extrusión los geles esterilizados, desde las jeringas a través de aguas calibre 27 y 30, correspondientes a diámetros internos de 0.45 y 0.30 mm respectivamente (estas dimensiones corresponden a las de las agujas usadas para inyectar los agentes de relleno a base de HA que están actualmente en el mercado). La muestra de HA entrecruzado, con una relación de 7% en equivalentes BDDE/HA produjo suspensiones que pueden ser extrudidas a través de una aguja calibre 30, a todas las concentraciones probadas. Para las muestras entrecruzadas con relaciones de 11% y 14% en equivalentes de BDDE/HA, las suspensiones más concentradas (30 mg/mL) probaron poder ser extrudidas a través de aguas de calibre 27, y aquellas de concentraciones menores, a través de agujas calibre 30. Se consideró que las muestras podían ser extrudidas, aplicando presiones compatibles con la aplicación clínica. La idoneidad de los geles para ser extrudido depende del tamaño de partícula en el estado hidratado y de su elasticidad. En particular, la idoneidad para ser extrudido mejora con una reducción en la concentración y el tamaño de las partículas hidratadas, y un aumento en su elasticidad. Las muestras de HA entrecruzado descrito en el ejemplo 6 presentan (en el estado seco) las mismas características de forma y tamaño (0.2-80 µm) que el HA usado en la reacción de entrecruzamiento, considerando los valores de grado de hinchamiento en solución salina reportados en la tabla 5 (110 +/- 5 mL/g para la muestra entrecruzada con 7% de equivalentes de BDDE/HA, 81 +/- 5 mL/g para la muestra entrecruzada con 11% equivalentes de BDDE/HA, y 75 +/- 2 mL/g para la muestra entrecruzada con 14% equivalentes de BDDE/HA), después de la hidratación el tamaño de partícula aumenta de 110 a 75 veces en promedio, comparado con el estado seco, cambiando desde el producto menos entrecruzado al más entrecruzado, y alcanzando dimensiones que varían de 15 µm a 8.8 µm. La capacidad para ser extrudido fácilmente a través de aguas de calibre 27-30 (diámetro interno 0.45-0.30 mm) demuestra por ello la gran elasticidad de los productos de

HA en forma de partícula entrecruzados, con memoria de forma, después de la hidratación, una característica importante no sólo para la capacidad del producto para ser inyectado, sino también para el éxito del agente de relleno en el sitio de implante en términos estéticos.

Ejemplo 10 - Preparación de una esponja de HA entrecruzada, con memoria de forma

- 5 Las esponjas de HA entrecruzado son preparadas a partir de HA de alto peso molecular (HHA, Mw 1.5kDa) y HA de bajo peso molecular (LHA, Mw 220kDa).

Se colocan soluciones acuosas de HA 4% p/p en el caso de HHA y 12.5% p/p en el caso de LHA, en discos de Petri hasta un espesor de líquido de 0.5 cm, y se liofilizan. En ambos casos se obtiene un material que, cuando se observa bajo el microscopio de barrido electrónico, se presenta como una estructura porosa con un elevado grado de interconexión de poro. El material así obtenido se disuelve instantáneamente cuando es colocado en agua. Para obtener un material que retenga su forma original en agua, la esponja liofilizada es sometida a procesos de entrecruzamiento con BDDE en un sistema de no solvente. En particular, se preparan 3 mezclas de reacción para ambos materiales a base de HHA y LHA, donde cada uno consiste en 10g de esponja de HA a los cuales se añaden 100 mL de mezcla de reacción, que consiste en: 10 mL de agua, 10 mL de TBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p $\approx$ 2.5 M) (25 mmol) y cantidades variables de BDDE y acetona como se indica en la tabla 8. En particular, la cantidad de BDDE usado corresponde a las relaciones de 7, 14 y 30% en equivalentes de BDDE/HA. El material, embebido y enteramente cubierto por la mezcla de reacción, reacciona a 60°C por 3 h bajo agitación; la reacción es detenida mediante adición de H₃PO₄ 14.8 M hasta neutralización. El producto entrecruzado es purificado como se describe en el ejemplo 1. Todos los materiales obtenidos retienen su forma tridimensional original, pero en agua, a medida que aumenta el grado de entrecruzamiento, presentan resistencia creciente e hinchan en una menor extensión.

Tabla 8 - Mezcla de reacción con cantidades variables de BDDE

Muestra (% H ₂ O)*	HA** (g)	Acetona (mL)	H ₂ O (mL)	TBAH° (mL/mLH ₂ O °°)	BDDE (mL - %^)	
1 16,35%	10	79,32	10,0	10/6,35	0,68	7,0
2 16,35%	10	78,63	10,0	10/6,35	1,36	14,0
3 16,35%	10	77,09	10,0	10/6,35	2,91	30,0

* Total % de H₂O en la mezcla de reacción, incluyendo la presente en TBAH; **esponja a base de HHA o LHA; ° solución acuosa 40% p/p $\approx$ 2.5 M; °° cantidad de agua contenida en 10 mL de TBAH; ^ relación en equivalentes BDDE/HA.

Ejemplo 11 - Preparación de quitosano entrecruzado

- 25 Se agregan 100 mL de mezcla de reacción que contiene 24% v/v agua en acetona, que representa un sistema de no solvente para quitosano, en la que están disueltas la base orgánica TBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p $\approx$ 2.5 M) 10 mL (25 mmol) y el agente de entrecruzamiento, BDDE 2.26 mL (relación en equivalentes de BDDE/OH/grupo NH₂ de quitosano = 14%), a 10g de quitosano en polvo (quitosano de bajo peso molecular, Sigma Aldrich, Milan, Italia; producto no. 448869, desacetilación = 75%, viscosidad 20-300 cps c = 1% p/v en ácido acético, 1% v/v en agua). Como agente de control se usa una mezcla de reacción a la cual no se añade el agente de entrecruzamiento.

El quitosano no se disuelve en la mezcla de reacción, y el sistema tiene una consistencia pastosa. La muestra reacciona a 60°C por 3 h bajo agitación vigorosa.

- 35 La reacción es detenida mediante adición de H₃PO₄ 14.8 M hasta neutralización. Se purifican las dos mezclas de reacción, con y sin agente de entrecruzamiento, como se reporta en el ejemplo 1. Se obtiene un material en partículas con las mismas características dimensionales del quitosano usado en la reacción, con porcentajes de rendimiento comparados con el quitosano usado, de 95 y 93% p/p respectivamente, para la mezcla de reacción con y sin agente de entrecruzamiento. Para evaluar el rendimiento de producto entrecruzado insoluble, se suspenden los dos polvos en una solución acuosa 1% v/v de ácido acético, el cual es un sistema de solvente para quitosano, se deja bajo agitación por 5 h y se centrifuga. Se lava el sedimento dos veces con agua y se seca por liofilización. El producto liofilizado representa 80% del producto de reacción para la mezcla con BDDE, mientras el polvo de la mezcla de reacción sin BDDE se disuelve completamente en agua/ácido acético 1% v/v.

Ejemplo 12 - HA entrecruzado funcionalizado con colina

Se produjo HA entrecruzado, con memoria de forma, que contenía residuos de cloruro de colina.

La reacción en presencia de cloruro de colina fue conducida de acuerdo con dos procedimientos. Para el primero, se añaden 100 mL de mezcla de reacción consistente en agua, acetona, TMBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p $\approx$ 2.5 M) 10 mL (25 mmol), una cantidad de BDDE que llega a 1.36 mL (relación en equivalentes de BDDE/HA de 14%) y cloruro de colina (C7017, Sigma Aldrich, Italia) 1.94 g (relación equivalentes colina/HA de 14%) a 10 g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 μ m). El HA no se disuelve en la mezcla de reacción, y el sistema tiene una consistencia pastosa. La muestra reacciona a 60°C por 3 h bajo agitación vigorosa.

Para el segundo procedimiento, se añaden 100 mL de mezcla de reacción, consistente en agua, acetona, TMBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p $\approx$ 2.5 M) 10 mL (25 mmol) y 1.36 mL de BDDE (relación en equivalentes BDDE/HA de 14%) a 10g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 μ m). El HA no se disuelve en la mezcla de reacción, y el sistema tiene una consistencia pastosa. La muestra reacciona a 60°C por 3 h bajo agitación vigorosa. Después de 3 h, se añaden otros 100 mL de mezcla de reacción consistente en: agua, acetona, TMBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p $\approx$ 2.5 M) 10 mL (25 mmol) y BDDE 1.36 mL (relación en equivalentes BDDE/HA de 14%) y cloruro de colina (C7017, Sigma Aldrich, Italia) 1.94 g (relación en equivalentes colina/HA de 14%). El HA no se disuelve en la mezcla de reacción y el sistema tiene una consistencia pastosa. La muestra reacciona a 60°C por otra 1.5 h bajo agitación vigorosa.

La reacción es detenida periódicamente por adición de H₃PO₄ 14.8 M hasta neutralización. Se purifican las diferentes mezclas de reacción, como se describe en el ejemplo 1. Se obtienen materiales en partículas con las mismas características dimensionales que el HA usado en la reacción. Los rendimientos de reacción, definidos como el % de HA obtenido insoluble en agua, entrecruzado, comparado con el HA usado en la reacción, son 29 +/- 2 y 71 +/- 3 respectivamente).

Para ambos productos se evaluó el grado de hinchamiento, como se describe en el ejemplo 6. El grado de hinchamiento de la muestra obtenida por el primer procedimiento es 270 +/- 16 mL/g en agua y 94 +/- 8 mL/g en solución salina. el grado de hinchamiento de la muestra obtenida por el segundo procedimiento es 139 +/- 11 mL/g en agua y 81 +/- 4 mL/g en solución salina.

Tabla 9 - Valores de rendimiento y grado de hinchamiento de muestras HA con memoria de forma, entrecruzado con BDDE en presencia de cloruro de colina. Para la muestra 1, se añaden 100 mL de una mezcla de reacción que consiste en: H₂O (17.65 mL), TMBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p $\approx$ 2.5M) 10 mL, correspondiente a 25 mmol de TMBAH y 6.35 mL de H₂O, a 10 g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 - 80 μ m) adicionalmente a BDDE, acetona y cloruro de colina, como se reporta en la tabla. Para la muestra 2, se añaden 100 mL + 100 mL de mezcla de reacción que contiene H₂O (17.65 mL), TMBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 2.5 M $\approx$ 40% p/p) 10 mL, correspondientes a 25 mmol de TMBAH y 6.35 mL de H₂O, a 10g de HA en polvo (partículas con dimensiones entre 0.2 y 80 μ m), adicionalmente a BDDE, acetona y cloruro de colina como se muestra en la tabla.

Muestra (24% H ₂ O)*	Acetona (mL)	BDDE		Cloruro de colina		Insoluble° (%)	Grado de hinchamiento	
		%**	mL	***	g		Agua	Solución salina
1	70,99	14,0	1,36	100	1,94	29 +/- 2	270 $\pm$ 16	94 $\pm$ 8
2	70,99 +70,99	14,0 +14,0	1,36 +1,36	0 +100	0 +1,94	68 +/- 3	139 $\pm$ 11	81 $\pm$ 4

* Total % de H₂O en la mezcla de reacción, incluyendo la presente en TMBAH; **relación en equivalentes de BDDE/HA; ***relación en equivalentes de colina/BDDE; ° % de HA entrecruzado con memoria de forma.

Como se esperaba sobre la base de la competencia entre HA y colina en la reacción con BDDE, la reacción 1 conduce a un producto menos entrecruzado que el obtenido en ausencia de colina (ejemplo 6): menor rendimiento y mayores valores de grado de hinchamiento. Para la reacción 2, el valor de rendimiento es comparable solamente con el del producto obtenido con BDDE de 14% como se describió en el ejemplo 6; sin embargo, los valores de grado de hinchamiento son mayores, evidentemente debido a la introducción de residuos de colina dentro de la red.

Los productos descritos fueron probados respecto a la estabilidad frente a la acción de degradación de hialuronidasa testicular bovina, de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 7. La tabla 10 muestra los resultados obtenidos.

Como se esperaba, los productos analizados difieren en términos de tiempos de degradación. En particular, la

muestra 1 se disuelve completamente después de incubación por 5 días. Bajo las mismas condiciones, la muestra 2 es soluble solamente en 44 +/- 3%. Ambas muestras probaron ser menos resistentes a la acción enzimática del producto entrecruzado con BDDE de 14% en ausencia de colina obtenido como se describió en el ejemplo 6. Estos resultados son consistentes con el grado de entrecruzamiento y mayor grado de hinchamiento (mayor exposición a la acción enzimática) de la muestra 1, y el mayor grado de hinchamiento de la muestra 2 comparado con la muestra entrecruzada con BDDE de 14% en ausencia de colina.

Tabla 10 - estabilidad *in vitro* a 37°C de muestras de HA con memoria de forma, entrecruzadas con BDDE en presencia de cloruro de colina, a la hidrólisis catalizada por hialuronidasa bovina (BTH 50 U/mL)

Muestra (24% H ₂ O)*	Acetona (mL)	BDDE		Cloruro de colina		% soluble después de incubación con BTH 50 U/mL	
		%**	mL	***	g	3 días	5 días
1	70,99	14,0	1,36	100	1,94	44 ± 1	0
2	70,99 + 70,99	14,0 + 14,0	1,36 + 1,36	0 + 100	0 + 1,94	57 ± 5	44 ± 3

* Total % de H₂O en la mezcla de reacción, incluyendo la presente en TMBAH; **relación en equivalentes BDDE/HA; ***relación en equivalentes colina/BDDE.

10 Ejemplo 13 - Evaluación de citotoxicidad de materiales con memoria de forma, a base de HA entrecruzado

Las pruebas *in vitro* de citotoxicidad son conducidas de acuerdo con el estándar ISO 10993-5 (prueba indirecta). En particular, se incuba un cultivo celular de fibroblastos NIH3T3 de murina con medio de cultivo acondicionado con las muestras que van a ser analizadas. Las pruebas son ejecutadas en triplicado.

La evaluación es conducida sobre productos a base de HA entrecruzado preparados como se describe en el ejemplo 5 (HA en polvo, entrecruzado usando una relación de 7, 14 y 30% en equivalentes de BDDE/HA) y sobre productos a base de HA entrecruzado preparados como se describe en el ejemplo 9 (esponjas de HHA y LHA entrecruzado con una relación de 30% en equivalentes de BDDE/HA).

Operando bajo condiciones estériles, se obtienen los medios acondicionados colocando los materiales de prueba DMEM completo sin rojo de fenol (el volumen de medio añadido es tal que cuando se alcanza el equilibrio de hinchamiento, se suspenden los materiales en 1 mL de medio/0.2 g de material) e incubándolos a 37°C por 24 h. El medio de cultivo usado es medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene glucosa (4.5 g/L), piruvato de sodio (1 mM) y glutamina (2 mM) con la adición de 10% v/v de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), fungizone (2.5 µg/mL) y aminoácidos no esenciales (1% v/v).

Al final de la incubación se somete el medio de cultivo a centrifugación y el sobrenadante representa el medio acondicionado. Simultáneamente, se inoculan fibroblastos de NIH3T3 de murina a una densidad de 8.5×10^4 células/cm² en una placa de cultivo celular de varios pozos de 12 pozos y se incuba en DMEM completo sin rojo de fenol a 37°C por 24 h. 24 h después de la inoculación, se reemplaza el medio de cultivo con 1 mL de medio acondicionado con los materiales de prueba, y se incuban las placas a 37°C por 48 h. En los pozos de control, el medio es reemplazado con DMEM completo no acondicionado.

Después de 24 y 48 h de incubación con medio acondicionado, se evalúa cualitativamente la viabilidad de las células, por observación bajo el microscopio óptico, y cuantitativamente con la prueba MTT (bromuro de 3-[4,5 dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio) (Slater TF, Sawyer B, Strauli U., Biochim Biophys Acta 1963; 77, 383-393). En particular, se determinó cuantitativamente la viabilidad de las células incubadas con medio acondicionado, en términos de porcentaje comparado con el de las células incubadas con medio no acondicionado (control).

Bajo el microscopio óptico, las células incubadas con todo el medio acondicionado presentan su morfología óptima, indicando que no hay liberación de sustancias tóxicas desde los materiales.

De modo similar, el análisis cuantitativo con la prueba MTT confirma que los materiales probados no son citotóxicos, porque las células incubadas con medio acondicionado, con todas las muestras de HA entrecruzado presentaron una viabilidad comparable con la del control (80-100%).

40 Ejemplo 14 - evaluación *in vivo* de HA entrecruzado con memoria de forma

Se evalúa la citocompatibilidad de esponjas de HA entrecruzado con memoria de forma, *in vivo* usando el ratón como un sistema modelo.

Se coloca una solución 12.5% p/p de LHA en agua dentro de un disco de petri hasta que el espesor del líquido es 0.5 cm; se liofiliza entonces la solución. Se realiza entrecruzamiento entonces al material liofilizado, el cual presenta una estructura porosa con un elevado grado de interconexión de poros, cuando es observado bajo el microscopio de barrido electrónico. En particular, se añaden 194 mL de mezcla de reacción consistente en 19.4 mL de agua, 149.6 mL de acetona, 19.4 mL de TMBAH (hidróxido de bencil trimetil amonio, solución acuosa 40% p/p $\approx$ 2.5 M) (48.5 mmol) y 5.64 mL de BDDE (relación en equivalentes de BDDE/HA = 58.2%) a 10 g de LHA liofilizado. El HA no se disuelve en la mezcla de reacción, y el material es embebido y completamente cubierto por la fase líquida. La muestra reacciona a 60°C por 3 h bajo agitación vigorosa; la reacción es detenida mediante adición de H₃PO₄ 14.8 M hasta neutralización. Se purifica el producto entrecruzado como se describe en el ejemplo 1. El material obtenido, que es insoluble en un medio acuoso, se presenta como un hidrogel elástico que, como se demuestra por observaciones bajo el microscopio de barrido electrónico y microscopio óptico, mantiene la estructura porosa del material entrecruzado.

El siguiente paso es la preparación del fragmento construido, un armazón cargado con condrocitos humanos, que va a ser implantado bajo la piel del ratón inmunocomprometido.

Los condrocitos humanos son obtenidos del cartílago humano, retirado durante operaciones de rinoplastia. La pieza de cartílago, almacenada bajo condiciones estériles, es dividida, nuevamente bajo condiciones estériles, en pequeñas piezas que son desintegradas enzimáticamente mediante incubación del material bajo agitación por 12 h a 37°C en una solución PBS que contiene collagenasa tipo I (3 mg/mL), dispasa (4 mg/mL) y 5 μ L/mL de una solución de gentamicina (80 mg/mL). La suspensión es entonces filtrada a través de un filtro de 0.2 μ m y el residuo celular es lavado con medio DMEM FBS 10%. La solución resultante es sometida a centrifugación a 1,500 rpm por 7 min, el sobrenadante es eliminado y la pella es suspendida nuevamente en DMEM FBS 10%. Los condrocitos así obtenidos son inoculados en la placa en DMEM FBS 10% que contiene DIFLUCAN la concentración de 5 μ L/mL y gentamicina 5 μ L/mL.

Para la preparación del armazón, la esponja de HA entrecruzado con memoria de forma, es cortada a la forma de discos que cuando se ha alcanzado el equilibrio de hinchamiento tienen un diámetro de aproximadamente 10 mm. Dichos discos, todavía en el estado seco, son esterilizados en el autoclave (12 min a 120°C) y luego cargados con condrocitos humanos, dejando que el hidrogel hinche *in vitro* con una suspensión celular que contiene 2×10^5 células, hasta absorción completa. Se preparan de la misma forma fragmentos contruidos de Hyalofill™ (Fidia Advanced Biopolymers) y condrocitos, y se usan como control en el estudio *in vivo*. Los fragmentos contruidos obtenidos son incubados por 48 h a 37°C y 5% de CO₂ para permitir que las células se adhieran al armazón, y entonces son implantados de manera subcutánea *in vivo* en el área dorsal del ratón inmunocomprometido.

En el estudio se usan 10 animales previamente aclimatados. En el área dorsal de cinco ratas se implantan dos discos HA entrecruzado con memoria de forma, al lado derecho y dos discos del mismo material, cargado con condrocitos humanos, en el lado izquierdo; se sigue un procedimiento similar con los otros cinco animales, implantando Hyalofill e Hyalofill cargado con condrocitos humanos. 30 días después de la implantación, se retiran los fragmentos contruidos, si aún están presentes, y se toman muestras de tejido del área alrededor del implante. Este material soporta pruebas inmunohistoquímicas e histológicas. El Hyalofill fue completamente absorbido, tanto si fue implantado sin condrocitos o combinado con condrocitos, pero en el caso de la esponja de HA entrecruzado con memoria de forma, tanto el control como el armazón cargado con condrocitos humanos estaban todavía *in situ*, y estaban extensamente vascularizados. El análisis histológico del fragmento contruido de HA entrecruzado cargado con condrocitos humanos muestra la presencia de tejido de cartílago estructuralmente bien organizado.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de polisacáridos entrecruzados, seleccionados de ácido hialurónico, condroitina y condroitina sulfato, que comprende el entrecruzamiento del polisacárido en un sistema de no solvente para el polisacárido, que consiste en mezclas de solventes orgánicos y agua, en presencia de bases de amonio cuaternario en concentraciones de 0.025 a 1.3 M y de un epóxido polifuncional, a temperaturas de 30 a 80°C por tiempos de reacción de 2 a 16 horas, donde dichos polisacáridos entrecruzados retienen su forma tridimensional durante el entrecruzamiento.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el polisacárido es ácido hialurónico.
3. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que el sistema de no solvente consiste en mezclas en las que la relación de volumen de solvente orgánico a agua es ≥ 2 .
4. Proceso de acuerdo con la reivindicación 3 en el que los solventes orgánicos son cetonas, alcoholes o éteres miscibles en agua, preferiblemente acetona.
5. Un proceso de acuerdo con uno o más de las reivindicaciones 1-4 en el que las bases de amonio cuaternario son seleccionadas de hidróxido de tetrabutil amonio, hidróxido de tetrapropil amonio, hidróxido de tetraetil amonio, hidróxido de tetrametil amonio, hidróxido de bencil tributil amonio, hidróxido de bencil tripropil amonio, hidróxido de bencil trietil amonio, hidróxido de bencil trimetil amonio, hidróxido de metil tributil amonio, hidróxido de metil tripropil amonio, hidróxido de metil trietil amonio, hidróxido de fenil tributil amonio, hidróxido de fenil tripropil amonio, hidróxido de fenil trietil amonio, hidróxido de fenil trimetil amonio, hidróxido de dodecil trimetil amonio, hidróxido de tetradecil trimetil amonio, hidróxido de hexadecil trimetil amonio, hidróxido de octadecil trimetil amonio e hidróxido de colina.
6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la base de amonio cuaternario es hidróxido de bencil trimetil amonio.
7. Un proceso de acuerdo con uno o más de las reivindicaciones 1-6 en el que el epóxido funcional es seleccionado de 1,3-butadieno diepóxido, 1,2,7,8-diepoxioctano, 1,5-hexadieno epóxido, etilen glicol diglicidil éter, 1,4-butanodiol diglicidil éter, 1,6-hexanodiol diglicidil éter, polietilen glicol diglicidil éter, polipropilen glicol diglicidil éter, bisfenol A diglicidil éter, preferiblemente 1,4-butanodiol diglicidil éter, polietilen glicol diglicidil éter y polipropilen glicol diglicidil éter.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la reacción es interrumpida por adición de un ácido concentrado hasta la neutralidad.
9. Un proceso de acuerdo con uno o más de las reivindicaciones 1-8 en el que el producto entrecruzado es purificado retirando la fase líquida y lavando hasta desaparición de contaminantes, con una mezcla homogénea de agua/solvente orgánico, la cual no aumenta el hinchamiento de la fase sólida.
10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la mezcla agua/solvente orgánico es saturada con cloruro de sodio en los primeros lavados.
11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 en el que el solvente orgánico presente en la mezcla de lavado es etanol o acetona.
12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la relación de solvente orgánico a agua es ≥ 2 .
13. Un proceso de acuerdo con uno o más de las reivindicaciones 1-12 en el que el producto entrecruzado es obtenido mediante secado del material, después de lavado.
14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que se obtiene el secado por lavado exhaustivo con un solvente orgánico anhidro miscible en agua y subsiguiente secado bajo vacío a alta temperatura o por liofilización.
15. Materiales obtenidos por los procesos de las reivindicaciones 1 a 14.