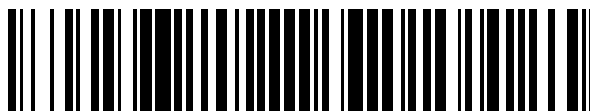


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 549**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/08** (2006.01)

**C08K 5/00** (2006.01)

**A61K 8/73** (2006.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

**A61K 31/728** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2014 PCT/EP2014/070943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044455**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2014 E 14777355 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 3052529**

54 Título: **Funcionalización y reticulación de ácido hialurónico en un paso**

30 Prioridad:

**30.09.2013 EP 13186638**

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

**07.02.2018**

73 Titular/es:

**GALDERMA S.A. (100.0%)**

**Zugerstrasse 8**

**6330 Cham, CH**

72 Inventor/es:

**BOITEAU, JEAN-GUY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 653 549 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

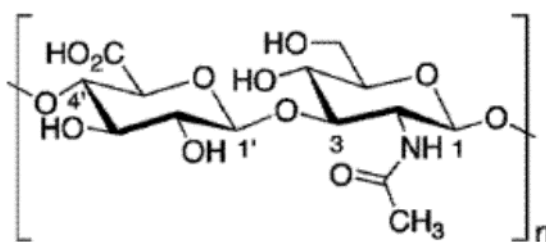
Funcionalización y reticulación de ácido hialurónico en un paso

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador, a un proceso para la fabricación del mismo y el uso del mismo en los campos de la cosmética y medicina.

**Antecedentes de la invención**

El ácido hialurónico (HA) es un polisacárido compuesto por una estructura de disacárido que comprende ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces glucosídicos alternantes  $\beta(1,4)$ - y  $\beta(1,3)$ -.



10 N acetil-D-glucosamina del ácido glucurónico

HA puede ser reticulado por varios agentes de reticulación, por ejemplo epóxidos bi- o polifuncionales, formaldehído, glutaraldehído y divinil sulfona. Geles de HA reticulado utilizando el epóxido bifuncional 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) están disponibles en el mercado por ejemplo, bajo las marcas Restylane o Juvederm.

15 Se han empleado numerosos métodos para la modificación química a fin de funcionalizar y así impartir propiedades nuevas o modificadas al HA reticulado.

20 Las modificaciones químicas pueden realizarse a través de grupos -COOH disponibles en el HA por medio de la activación previa con carbodiimidias, tales como 1-etil-3-[3-(dimetilamino)-propil]-carbodiimida (EDC). La N-hidroxisuccinimida (NHS) o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) pueden también utilizarse junto con la EDC para facilitar la reacción de acoplamiento. Las reacciones de acoplamiento pueden lograrse también mediante el uso de 1,1-carbonildiimidazol (CDI), véase por ejemplo el documento de patente internacional WO 00/01733. Estas reacciones pueden realizarse en agua o mediante la adición de un disolvente conjunto, tal como DMSO.

25 T. Pouyani y G.D. Prestwich, *Bioconjugate Chemistry* 5: 339-347 (1994) revelan el acoplamiento de hidrazidas mediado por carbodiimidias a fragmentos oligosacáridos muy cortos de HA. El oligosacárido es activado en un primer paso por el acoplamiento de una hidrazida, seguido por un segundo paso donde una sustancia deseada puede hacerse reaccionar con el oligosacárido activado por la hidrazida e incorporarse en el oligosacárido. Alternativamente, el oligosacárido activado por la hidrazida puede en un segundo paso hacerse reaccionar con un agente de reticulación para obtener un oligosacárido reticulado.

30 G.D. Prestwich *et al.*, *J. Control. Release* 53 (1-3): 93-103 (1998) revela un complicado proceso de varios pasos que envuelve el acoplamiento de hidrazidas a HA mediado por carbodiimidias. HA se activa en un primer paso por el acoplamiento de una hidrazida, seguido de un segundo paso donde una sustancia deseada puede hacerse reaccionar con el HA activado por la hidrazida, y un tercer paso de hacer reaccionar este HA funcionalizado con un HA ya reticulado.

35 P. Bulpitt *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 47 (2): 152-169 también revela un proceso de múltiples pasos que envuelve el acoplamiento de hidrazidas mediado por carbodiimidias a HA. El HA es activado en un primer paso por el acoplamiento de una hidrazida, seguido de un segundo paso donde una sustancia deseada puede hacerse reaccionar con el HA activado por la hidrazida, y un tercer paso de reticulación de este HA funcionalizado con un agente de reticulación.

40 El documento de patente internacional WO 2007/102149 A2 también revela un proceso de varios pasos que envuelve el acoplamiento de hidrazidas mediado por carbodiimidias a HA. El HA es activado en un primer paso por el acoplamiento de una hidrazida, seguido de un segundo paso de reticulación de este HA activado por la hidrazida con un agente de reticulación. Componentes adicionales pueden acoplarse al HA funcionalizado por la hidrazida en un paso separado, antes o después del paso de reticulación.

45 Las modificaciones químicas pueden realizarse también a través de grupos de -OH de HA por reacción con cloruros de acilo en un disolvente, tal como DMSO, o con el uso de anhídridos en agua (pH = 9), véase por ejemplo el documento de patente internacional WO 2007/033677. Los grupos -OH del HA también pueden ser funcionalizados

con aminos utilizando bromuro de cianógeno como un reactivo de activación.

Los métodos reportados para funcionalizar HA reticulado implican la funcionalización de HA antes de la reticulación, seguido por la reticulación del HA funcionalizado. Este método es desventajoso porque requiere la modificación y depuración de un polisacárido de peso molecular grande, y porque el paso de reticulación puede resultar en una reacción incontrolada del agente de reticulación con la molécula injertada.

Alternativamente, los métodos reportados para funcionalizar HA reticulado implican la reticulación de HA antes de la funcionalización, seguida de la funcionalización del HA reticulado. Este método es desfavorable debido a dificultades en la purificación del gel resultante de subproductos formados durante la reacción. Además, el gel resultante no es homogéneo ya que la funcionalización tiende a formarse en la superficie de las partículas.

El documento de patente internacional WO 2008/031525 divulga la reticulación de HA por química clic. El proceso de reticulación implica varios pasos que requieren tiempo para modificar el HA sensible con una multiplicidad de reactivos a fin de permitir la reacción de reticulación.

### Compendio de la invención

Es un objeto de la invención presente proporcionar un procedimiento para la fabricación de un HA reticulado que contiene un grupo funcionalizador, que supere una o varias de las desventajas de los métodos de la técnica anterior.

Es otro objeto de la invención presente proporcionar un HA reticulado, funcionalizado, que se obtiene por el nuevo proceso de fabricación.

Para estos y otros objetos que serán evidentes a partir de la descripción detallada y ejemplos que la acompañan, la invención presente proporciona según un primer aspecto un procedimiento para la fabricación de un HA reticulado que contiene un grupo funcionalizador, que comprende el paso de hacer reaccionar HA en un solo paso con una mezcla de:

(i) un primer agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales, y

(ii) un agente funcionalizado, que consiste en un grupo funcionalizador acoplado vía un enlace 1,2,3-triazol a un segundo agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales,

a fin de obtener un HA reticulado que contienen el grupo funcionalizador.

La presente invención se basa generalmente en la idea de que un proceso de fabricación que envuelve la reticulación y funcionalización simultáneas de HA en un solo paso supera uno o más de los inconvenientes de los métodos de la técnica anterior para la producción de un HA reticulado que contiene un grupo funcionalizador y proporciona un HA reticulado, funcionalizado con propiedades atractivas. La aplicación de este enfoque ahora se ha logrado con éxito permitiendo que HA reaccione con una mezcla de un agente de reticulación y un agente funcionalizado en un solo paso, pero sin la introducción de residuos no convencionales por la reacción de reticulación en los enlaces cruzados que unen las cadenas de HA. El proceso según la invención permite ventajosamente la reticulación y funcionalización simultáneas de HA sin ninguna modificación química previa de HA, la cual puede afectar negativamente a la molécula de HA sensible.

En un proceso de fabricación preferido según la invención, el primer y segundo agente de reticulación se selecciona independientemente del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales. El único paso de la reacción se realiza a un pH básico para proporcionar enlaces éter cruzados tanto entre HA y el primer agente de reticulación como entre HA y el agente funcionalizado. Es preferible que el primer y segundo agente de reticulación se seleccione independientemente del grupo consistente en epóxidos bifuncionales, preferiblemente diglicidil éteres. Es particularmente preferido que el primer y segundo agente de reticulación sean ambos butanodiol diglicidil éter (BDDE).

En un proceso de fabricación preferido según la invención, el grupo funcionalizador es un agente de imagen. El agente de imagen es preferentemente un agente fluorescente, tal como la fluoresceína.

Según otro aspecto, la invención presente proporciona un ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador acoplado al ácido hialurónico vía un enlace de 1,2,3-triazol y un enlace de éter, en donde el ácido hialurónico está reticulado con el mismo tipo de enlace éter.

En un producto preferido según la invención, el grupo funcionalizador es un agente de imagen. El agente de imagen es preferentemente un agente fluorescente, tal como la fluoresceína.

En un producto preferido según la invención, el ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador es obtenible, u obtenido por el proceso de fabricación según la invención.

Según otros aspectos, la presente invención proporciona un agente funcionalizado, y el uso del mismo para la

fabricación de un ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador. El agente funcionalizado consiste en un grupo funcionalizador acoplado a un agente de reticulación vía un enlace 1,2,3-triazol seleccionado de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales.

5 En un agente funcionalizado preferido según la invención, el agente de reticulación se selecciona de epóxidos bifuncionales, preferiblemente diglicidil éteres. Es particularmente preferido que el agente de reticulación sea el butanodiol diglicidil éter (BDDE).

En un agente funcionalizado preferido según la invención, el grupo funcionalizador es un agente de imagen. El agente de imagen es preferiblemente un agente fluorescente, tal como la fluoresceína.

10 Según otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un agente funcionalizado según la invención y un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales para la simultánea funcionalización y reticulación del ácido hialurónico. La presente invención proporciona también el uso de un agente funcionalizado según la invención para la fabricación de un ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador.

### Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 ilustra esquemáticamente el proceso de fabricación según la invención, utilizando BDDE como el reactivo de reticulación. La funcionalización y reticulación de HA se realizan simultáneamente, es decir, en una reacción de un solo paso.

### Descripción detallada de la invención

20 La invención presente proporciona según un primer aspecto un proceso de fabricación que envuelve un concepto totalmente nuevo: la funcionalización y reticulación simultáneas de HA. Esto se logra permitiendo que la reticulación de HA ocurra en presencia de una mezcla de un agente de reticulación y un agente funcionalizado. De este modo, la funcionalización y reticulación de HA se realizan simultáneamente, es decir, en una reacción de un solo paso. La funcionalización del agente de reticulación para obtener un agente funcionalizado se consigue antes de la reacción del mismo con HA, mientras que no es necesario ninguna modificación previa de HA. Esto es ventajoso ya que HA  
25 puede degradarse durante cualquier paso de trabajo previo al proceso de reticulación.

En concreto, se ha encontrado que los epóxidos bi- o polifuncionales son útiles como agentes de reticulación que se usan para la funcionalización. La utilidad de estos epóxidos para proporcionar un agente funcionalizado es sorprendente teniendo en cuenta su alta reactividad y el riesgo de que el epóxido pueda reaccionar en otra parte de la misma molécula. Un experto no habría seleccionado epóxidos como base para el agente funcionalizado, puesto  
30 que son mucho más difíciles de funcionalizar que por ejemplo una hidrazida. También es sorprendente que los agentes funcionalizados basados en estos epóxidos sean útiles junto con los agentes de reticulación de epóxido no funcionalizados en una reacción simultánea de funcionalización y reticulación de HA.

Como se establece para el epóxido bifuncional BDDE en la Figura 1, uno de los grupos epoxi se activa para producir un agente de reticulación modificado que lleva un grupo azido. Por consiguiente una de las funciones epoxi se  
35 modifica con una función de azida. El grupo funcional de interés, denominado A en la Figura 1, se activa por la reacción de un grupo reactivo apropiado en el grupo de funcionalización de interés para producir un grupo de funcionalización modificado que lleva un grupo de alquino. La azida (agente de reticulación de epóxido modificado) y el alquino (grupo de funcionalización modificado) se dejan reaccionar y formar un enlazador de 1,2,3-triazol que une al agente de epóxido modificado con el grupo de funcionalización A, como se muestra para BDDE en la Figura 1.  
40 Esta reacción se produce normalmente en presencia de un catalizador, tal como el Cu. Se entiende que esta reacción elimina al menos una funcionalidad de enlace del epóxido bifuncional o polifuncional. Por consiguiente, cuando el agente funcionalizado se prepara a partir de un epóxido bifuncional, el agente funcionalizado resultante no es un agente de reticulación en el sentido de que no puede proporcionar enlaces cruzados entre las cadenas de HA. Cuando el agente funcionalizado se prepara a partir de un epóxido multifuncional, el agente funcionalizado  
45 resultante puede ser un agente de reticulación en el sentido de que puede proporcionar enlaces cruzados entre las cadenas HA con las restantes funciones de enlace.

Al compuesto resultante, un agente funcionalizado, se le puede entonces permitir reaccionar en un solo paso con HA en mezcla con un agente de reticulación no funcionalizado en diversas cantidades relativas. En el caso preferido en que BDDE es seleccionado como agente de reticulación, tanto para el grupo de funcionalización de HA como para el  
50 agente de reticulación HA/HA, esta mezcla contiene por consiguiente un BDDE tradicional, bifuncional junto con un BDDE monofuncional, que es modificado para incluir un grupo de funcionalización (A-BDDE en la Figura 1). En una forma de realización preferida, la relación entre el agente de reticulación bifuncional y el agente funcionalizado monofuncional en la mezcla está en el intervalo de 1:100, tal como de 1:10, tal como de 1:1 a 100:1, tal como a 10:1, tal como a 1:1.

55 Los agentes de reticulación son preferentemente seleccionados individualmente del grupo consistente en epóxidos bifuncionales, tales como el butanodiol diglicidil éter (BDDE), 1,2,3,4,-diepoxibutano y 1,2,7,8,-diepoxioctano. Los agentes de reticulación son preferentemente seleccionados individualmente del grupo consistente en diglicidil éteres,

particularmente BDDE. Los agentes de reticulación primero y segundo pueden ser idénticos o diferentes y son preferentemente idénticos. Agentes de reticulación idénticos son más cómodos de usar ya que la reticulación del HA y la funcionalización del HA reticulado sorprendentemente proceden con similar velocidad en las condiciones de reacción.

5 El grupo funcionalizador puede ser cualquier molécula química que es conveniente incorporar por enlaces covalentes, o injerto, en un gel de HA reticulado para darle una nueva función al material. La persona calificada está familiarizada con diversos tipos de grupos funcionalizadores, que pueden tener una actividad biológica, medicinal o técnica o relevancia. Teniendo en cuenta la química bien conocida de acoplamiento de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales, la persona calificada inmediatamente se da cuenta a la luz de la divulgación presente que, para fines prácticos, puede ser presentado prácticamente cualquier grupo funcionalizador en el agente funcionalizado e incorporado en el HA final reticulado (véase por ejemplo el documento de patente internacional WO 87/07898).

10 El grupo funcionalizador no presenta a su vez una función de enlace adicional covalente para modificar adicionalmente permanentemente el HA reticulado, sino que más bien constituye la modificación deseada final del HA reticulado. Sin embargo se entiende que el grupo funcionalizador puede llevar a cabo su función, por ejemplo proyección de imagen, a través de enlaces no covalentes o al menos enlaces no permanentes.

15 Un tipo preferido de grupos funcionalizadores son los agentes de imagen, que pueden ser útiles en una variedad de aplicaciones, *ex vivo* e *in vivo*, en el hombre, así como en los animales. El agente de imagen puede ser seleccionado del grupo formado por tintes y metales fluorescentes, tintes cromóforos, compuestos fosforescentes, compuestos quimioluminiscentes y proteínas bioluminiscentes, enzimas, radionucleidos, partículas radiactivas y nanopartículas detectables, por ejemplo nanopartículas de oro y nanopartículas de semiconductores. Un agente de imagen preferido según la invención es un agente de imagen fluorescente, tal como la fluoresceína. El agente de imagen puede utilizarse para la detección del HA reticulado. Las aplicaciones pueden ser seguir la degradación de HA *in vivo* e *in vitro* y estudiar la homogeneidad de la reacción de reticulación. El HA reticulado que es funcionalizado con un agente de imagen también puede utilizarse para marcar zonas específicas antes de la cirugía para ayudar al cirujano a localizar el lugar de intervención con precisión. El marcaje con HA reticulado funcionalizado con un agente de imagen también puede ser útil en tratamientos de radioterapia como una forma a largo plazo pero biodegradable de marcar zonas para ser irradiadas o como la situación de la radiografía anterior. El marcaje de una zona específica puede ser también de interés en los ensayos clínicos para marcar exactamente el lugar a ser evaluado en cada visita de evaluación.

20 Un agente de imagen preferido según la invención es un agente de imagen fluorescente, tal como la fluoresceína.

25 Salvo que se diga lo contrario, los términos "ácido hialurónico" y "HA" abarcan todas las variantes y combinaciones de las variantes de ácido hialurónico o hialuronano, de diversas longitudes de cadena y estados de carga, así como con varias modificaciones químicas. Es decir, el término también abarca las varias sales hialuronatos del ácido hialurónico, tal como el hialuronato de sodio. Varias modificaciones del ácido hialurónico también se engloban en el término, tales como la oxidación, por ejemplo, la oxidación de los grupos CH<sub>2</sub>OH a COOH; oxidación con periodato de los grupos hidroxilo vecinales, opcionalmente seguida de reducción o formación de imina etcétera; reducción, por ejemplo, la reducción de COOH a CH<sub>2</sub>OH; sulfatación; desamidación, opcionalmente seguida por desaminación o formación de la amida con nuevos ácidos; esterificación; sustituciones con varios compuestos, por ejemplo mediante un agente de reticulación o una carbodiimida; incluyendo el acoplamiento de diferentes moléculas, tales como proteínas, péptidos y componentes de fármaco activos, al ácido hialurónico; y desacetilación.

30 Es preferible que el sustrato de ácido hialurónico sea un ácido hialurónico o sal hialuronato sin modificaciones químicas, es decir, que no haya sido sometido a reticulación u otras modificaciones antes del método actual de fabricación.

35 El ácido hialurónico puede obtenerse de diversas fuentes de origen animal y no animal. Fuentes de origen no animal incluyen levaduras y preferentemente bacterias. El peso molecular de una única molécula de ácido hialurónico está típicamente en el intervalo de 1,5-3 MDa, pero otros intervalos de pesos moleculares son posibles, por ejemplo 0,5-10 MDa.

40 Puesto que el paso de reticulación del HA según la invención envuelve la química de reticulación del HA tradicional, el experto es consciente de numerosas maneras y condiciones para aplicar este paso. A modo de ejemplo, el paso de reticulación se puede realizar como se divulga en el documento de patente de los Estados Unidos N° 5.827.937. En breve, se forma una solución acuosa de HA. La reticulación del HA se inicia en presencia de una mezcla de (i) un primer agente de reticulación polifuncional seleccionado del grupo que consiste en epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales e (ii) un agente funcionalizado, que consiste en un grupo funcionalizador acoplado vía una unión de 1,2,3-triazol a un segundo agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales. Esta reacción de reticulación se puede permitir que continúe hasta la formación de un gel viscoelástico. Opcionalmente, la reacción de reticulación puede ser estéricamente impedida para terminar antes de que ocurra la gelificación, con lo que se obtiene un HA activado. Se reintroducen condiciones

estéricamente no impedidas para el HA activado para seguir la reticulación del mismo hasta un gel viscoelástico.

En algunas formas de realización, cualquier agente de reticulación sin reaccionar y agente funcionalizado sin reaccionar pueden extraerse del HA reticulado que contiene el grupo funcionalizador, por ejemplo, por diálisis o por filtración.

- 5 La presente invención proporciona según un segundo aspecto un ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador. El grupo funcionalizador se une al ácido hialurónico por medio de una unión de 1,2,3-triazol y una unión de éter, y el ácido hialurónico es reticulado utilizando el mismo tipo de unión de éter.

10 Un ejemplo del producto según la invención se ilustra en la figura 1, en donde el grupo funcionalizador se denomina "A". Es evidente que los enlaces entrecruzados HA/HA implican enlaces éter resultantes de la reacción de reticulación de HA con el agente de reticulación BDDE. En cambio, los enlaces entrecruzados entre el HA y el grupo funcionalizador contiene ambos (i) un enlace de éter que resulta de la reacción del HA con el agente de reticulación BDDE e (ii) un enlace de 1,2,3-triazol entre el residuo de BDDE y el grupo funcionalizador.

15 Como se ha divulgado anteriormente en este documento, el grupo funcionalizador puede ser cualquier molécula química que es deseable incorporar mediante enlaces covalentes o injertos, en un gel de HA reticulado para proporcionar una nueva función para el material. La persona calificada está familiarizada con diversos tipos de grupos funcionalizadores, que pueden tener una actividad biológica, medicinal o técnica o relevancia.

Es preferible que el HA reticulado que contiene un grupo funcionalizador según la invención sea obtenible por el procedimiento establecido anteriormente en este documento.

20 El producto de la reacción de reticulación del HA según la invención es un gel o un hidrogel. Es decir, que puede considerarse como un sistema de reticulación insoluble en agua, pero sustancialmente diluido de moléculas de ácido hialurónico cuando se pone en contacto con un líquido, típicamente un líquido acuoso. El gel es mayormente líquido por peso y por ejemplo puede contener de 90-99,9% de agua, pero se comporta como un sólido debido a una red tridimensional de ácido hialurónico reticulado en el líquido. Debido a su importante contenido de líquido, el gel es estructuralmente flexible y similar al tejido natural, lo que le hace muy útil como soporte en tejidos de ingeniería y para el aumento de los tejidos. Son los enlaces reticulados y sus posiciones de unión en las moléculas de ácido hialurónico los que, junto con el enredo natural de las cadenas de ácido hialurónico, dan al gel su estructura y propiedades, que están íntimamente relacionadas con su grado de hinchamiento. Otra característica de un gel es su capacidad para absorber agua hasta que está completamente hinchado. Más adición de líquido no diluirá adicionalmente el gel, es decir, el gel no puede diluirse indefinidamente como una solución de moléculas libres.

30 Además, es preferible que los productos del gel de HA reticulado según la invención sean viscoelásticos. Esto implica que los productos del gel exhiben una combinación de propiedades viscosas y elásticas. Como es bien sabido por la persona calificada, se pueden determinar las propiedades viscoelásticas con un reómetro. En modo oscilante, el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ) pueden ser determinados con una frecuencia de 0,1 o 1 Hz. Para ciertos productos de gel viscoelástico según la invención, es preferible que se satisfaga la siguiente relación

35 
$$0,1 \leq \frac{G'}{G'' + G'} \leq 0,98$$
 preferiblemente 
$$0,5 \leq \frac{G'}{G'' + G'} \leq 0,98$$

40 El gel de HA reticulado puede transformarse en partículas de gel de cualquier manera conveniente. Una manera conveniente de obtener un tamaño de partícula deseado consiste en producir un gel de ácido hialurónico reticulado a una concentración deseada y someter el gel a desorganización física, tal como picándolo, haciendo una masa o permitiendo que el gel pase a través de un filtro con el tamaño de partícula adecuado. Las partículas de gel resultantes se dispersan en una solución fisiológica salina, originando una dispersión del gel o papilla con las partículas del tamaño deseado, formando así un implante.

45 Un implante según la invención puede ser una composición acuosa que comprende el producto reticulado de HA según la invención, por ejemplo, en forma de partículas grandes de gel de HA de  $\geq 0,1$  mm y opcionalmente un agente tampón. La composición puede contener típicamente un tampón salino fisiológico. La composición puede además comprender otros aditivos convenientes, tales como anestésicos locales (por ejemplo, clorhidrato de lidocaína), antiinflamatorios, antibióticos y otros medicamentos de apoyo adecuados, por ejemplo factores de crecimiento del hueso o células oseas. El producto de HA reticulado según la invención, o una composición acuosa del mismo, puede proporcionarse en una jeringa precargada, es decir, una jeringa precargada con un producto de HA reticulado esterilizado o una composición acuosa esterilizada que comprende el producto.

Según la invención, se administra el implante de HA, preferiblemente inyectado, en el lugar tratado en cualquier

manera conveniente. El implante, que consiste en partículas de HA de un medio viscoelástico y opcionalmente otros ingredientes adecuados, puede administrarse como una sola alícuota o como capas de alícuotas múltiples. Opcionalmente, el implante puede ser sustituido, rellenado o repuesto por una inyección posterior de partículas de HA del mismo tipo. El volumen inyectado se determina según el propósito deseado. En un aumento de tejido típico, se inyecta un volumen en el intervalo de 1-500 ml, dependiendo de la finalidad y del tejido tratado.

El producto de HA reticulado según la invención es útil en cirugía cosmética o médica. Los ejemplos no limitativos de cirugía estética son relleno dérmico y contorno corporal. Ejemplos no limitativos de cirugía médica son relleno dérmico, contorno corporal, prevención de la adherencia de tejidos, aplicaciones ortopédicas, tratamiento de la incontinencia, tratamiento de reflujo vesicouretral (RVU) y la formación de canales con fines de drenaje, por ejemplo en oftalmología y para mantener los tejidos separados. El producto de HA reticulado según la invención es también útil en el suministro de medicamentos. Puede además utilizarse como una película de adherencia posquirúrgica (interperitoneal) y en la terapia de las articulaciones y de la cadera.

Según un aspecto, la invención presente proporciona un método de tratamiento a un sujeto sometido a cirugía cosmética o médica, que implica la administración de un producto de HA reticulado según la invención a un sujeto con necesidad del mismo. Ejemplos no limitativos de cirugía médica son el relleno dérmico, contorno corporal, prevención de la adherencia de tejidos, aplicaciones ortopédicas, por ejemplo la terapia de cadera y articulaciones y formación de canales para drenaje, por ejemplo, en oftalmología y para mantener los tejidos separados.

La invención presente proporciona según un tercer aspecto un agente funcionalizado. El agente funcionalizado consiste en un grupo funcionalizador unido vía un acoplamiento de 1,2,3-triazol a un agente de reticulación seleccionado de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales.

Como se divulgó anteriormente en este documento, el grupo funcionalizador puede ser cualquier molécula química que es deseable incorporar por enlaces covalentes a un gel de HA reticulado para proporcionar una nueva función al material. La persona calificada está familiarizada con diversos tipos de grupos funcionalizadores, que pueden tener una actividad biológica, medicinal o técnica o de relevancia.

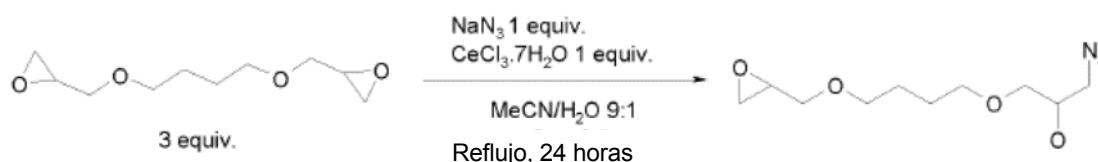
Como se ha establecido para el epóxido bifuncional BDDE en la figura 1, uno de los grupos epoxi se activa para producir un agente de reticulación que porta un grupo azido. Origina que una de las funciones epoxi se modifique con la función de azido. El grupo funcional de interés, denominado A en la figura 1, se activa por la reacción con un grupo reactivo apropiado en el grupo funcionalizador de interés para producir un grupo funcionalizador con un grupo alquino. La azida (agente de reticulación de epoxi) y el alquino (grupo funcionalizador) se permite que reaccionen y formen un 1,2,3 triazol que enlaza un agente de reticulación al grupo A funcionalizador, como se muestra para BDDE en la Figura 1. Esta reacción se produce normalmente en presencia de un catalizador, como el Cu. El compuesto resultante, un agente funcionalizado, se puede después hacer reaccionar con HA. Esto permite el uso del agente funcionalizado según la invención para la fabricación de un ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador como se indicó anteriormente en este documento. Esto permite también el uso del agente funcionalizado según la invención y un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales para funcionalizaciones y reticulaciones simultáneas del ácido hialurónico.

Sin limitarse por ello, la presente invención será más ilustrada a continuación por medio de ejemplos.

### Ejemplos

Ejemplo 1-preparación de fluoresceína-BDDE (flu-BDDE)

A. 1-Azido-3-(4-oxiranilmetoxi-butoxi)-propan-2-ol



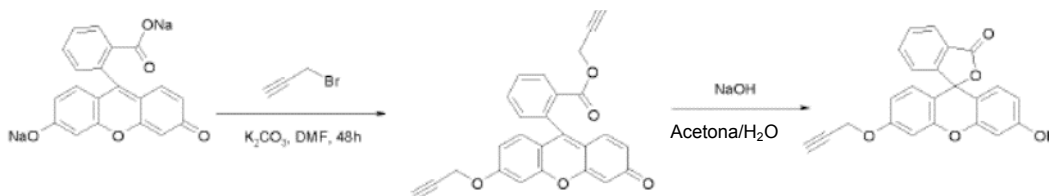
A una solución agitada de 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) (25,45 ml; 138,44 mmoles; 3,00 eq.) y cloruro de cerio(III) heptahidrato (17,19 g; 46,15 mmoles; 1,00 eq) en acetonitrilo (420,00 ml) y agua (45,00 ml) (mezcla de 9:1) a temperatura ambiente se agregó azida de sodio (3,00 g; 46,15 mmoles; 1,00 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 85° C durante 12 horas y después se dejó enfriar a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc (300 ml) y agua (500 ml). Se separaron las fases y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (3x300 ml). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera, secadas ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y evaporadas a sequedad para obtener un aceite amarillo pálido. Este aceite se purificó mediante cromatografía flash ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MTBE 9:1) para proporcionar el

producto deseado ( $R_f=0,27$ ) como un aceite incoloro (Peso=8,01 g, Rendimiento 70%).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,65-1,67 (m, 4H), 2,61 (dd,  $J=5,03$ ; 2,71 Hz, 1H), 2,80 (dd,  $J=5,01$ ; 4,16 Hz, 1H), 3,15 (dt,  $J=6,23$ ; 3,31 Hz, 1H), 3,32-3,41 (m, 2H), 3,43-3,67 (m, 7H), 3,69-3,79 (m, 1H), 3,89-4,02 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$  RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 26,1, 26,2, 44,1, 46,1, 50,8, 69,5, 70,1, 71,1, 71,3, 71,9.

## 5 B. Acetileno-fluoresceína

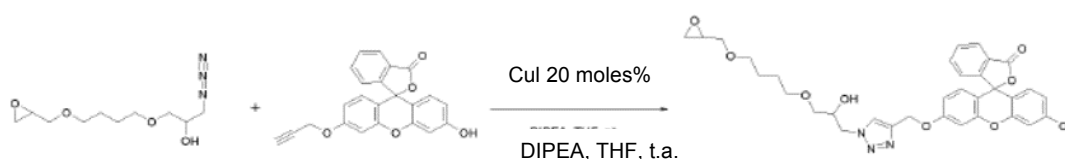


A una solución agitada de sal de sodio de fluoresceína (15,00 g; 45,14 mmoles; 1,00 eq.) y carbonato de potasio (18,71 g; 0,14 moles; 3,00 eq.) en N,N-dimetilformamida (30,00 ml) a temperatura ambiente se agregó bromuro de propargilo (50,28 ml de una solución al 80% p/p en tolueno; 451,38 mmoles; 10,00 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 96 horas. El análisis por LCMS de la mezcla del crudo de reacción después de este tiempo mostró casi principalmente el producto deseado ( $m/z=408$ ). La mezcla de reacción se filtró y se evaporó a sequedad. Al sólido naranja obtenido se añadió acetona (150,00 ml) seguido de una solución de hidróxido de sodio (21,66 g; 541,66 mmoles; 12,00 eq.) en agua (75,00 ml). La suspensión (que poco a poco tornó a una solución) se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se acidificó a  $\text{pH}=3$ , por la cuidadosa adición de HCl 2N acuoso y la acetona se evaporó a vacío. La fase acuosa se extrajo con DCM (3x150 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporaron a sequedad para obtener un aceite de color marrón oscuro. Este aceite se purificó por cromatografía de columna flash ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH 98:2 a 95:5) para proporcionar el producto deseado como un sólido amarillo (peso=3,2 g, Rendimiento 19%).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2,56 (t,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 4,71 (d,  $J=2,4$  Hz, 2H), 6,52 (dt,  $J=2,2$ ; 8,7 Hz, 1H), 6,57 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 6,66 (dt,  $J=2,2$ ; 8,8 Hz, 1H), 6,70 (d,  $J=8,8$  Hz, 1H), 6,74 (d,  $J=2,2$  Hz, 1H), 6,85 (d,  $J=2,2$  Hz, 1H), 7,16 (d,  $J=7,6$  Hz, 1H), 7,62 (dd,  $J=7,6$ ; 8,0 Hz, 1H), 7,67 (dd,  $J=7,4$ ; 8,0 Hz, 1H), 8,02 (d,  $J=7,4$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 56,0, 76,2, 77,8, 84,4, 102,1, 103,2, 110,7, 111,9, 112,1, 112,5, 124,0, 125,1, 126,6, 129,1, 129,2, 129,8, 135,2, 152,4, 153,0, 158,2, 159,2, 170,2.

## C. Fluoresceína-BDDE (Fluo-BDDE)



A una solución agitada de acetileno-fluoresceína (3,00 g; 8,10 mmoles; 1,00 eq.) y 1-azido-3-(4-oxiranilmetoxi-butoxi)-propan-2-ol (2,98 g; 12,15 mmoles; 1,50 eq.) en tetrahidrofurano (45,00 ml) a t.a. se agregó N,N-diisopropiletilamina (4,18 ml; 24,30 mmoles; 3,00 eq.) y por último yoduro de cobre (I) (0,15 g, 0,81 mmoles; 0,10 eq.). La mezcla de reacción se agitó al t.a. 6 horas. Después de ese tiempo, el análisis por LCMS mostró solamente 70% de conversión. Se agregó más 1-azido-3-(4-oxiranilmetoxi-butoxi)-propan-2-ol (1,00 g, 4,05 mmoles; 0,50 eq.) y yoduro de cobre (I) (0,15 g, 0,81 mmoles; 0,10 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de ese tiempo el análisis por LCMS mostró solo una conversión completa. La mezcla de reacción se diluyó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso saturado (150 ml) y ácido clorhídrico 1N acuoso (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se evaporaron a sequedad. El aceite naranja obtenido se purificó por cromatografía de columna flash ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH 95:5) para producir una mezcla del producto 1-azido-3-(4-oxiranilmetoxi-butoxi)-propan-2-ol. Este aceite se disolvió en DCM (20 ml) y el producto se precipitó mediante la adición lenta de MTBE (100 ml). El producto fue recogido por filtración como un sólido naranja (1,90 g; 38%) que fue utilizado como tal para la reticulación del ácido hialurónico.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,59-1,67 (m, 4H), 2,59-2,60 (m, 1H), 2,79 (t,  $J = 4,5$  Hz, 1H), 3,12-3,18 (m, 1H), 3,26-3,39 (m, 3H), 3,42-3,56 (m, 6H), 3,75 (dd,  $J=11,6$ ; 2,7 Hz, 1H), 4,13-4,20 (m, 1H), 4,35-4,44 (m, 1H), 4,49-4,58



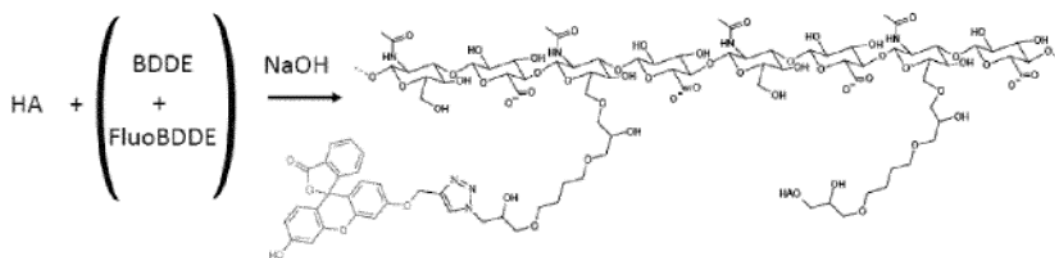
(m, 1H), 5,19 (s ancho, 2H), 6,53 (dd,  $J=8,7; 2,4$  Hz, 1H), 6,58-6,73 (m, 4H), 6,84 (t,  $J=2,7$  Hz, 1H), 7,13 (d,  $J=7,5$  Hz, 1H), 7,55-7,67 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 8,00 (d,  $J=7,5$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 26,2, 26,3, 44,3, 51,0, 53,2, 61,8, 69,1, 71,2, 71,3, 71,5, 71,6, 102,0, 103,2, 110,7, 112,0, 113,5, 113,8, 124,4, 124,8, 125,3, 127,4, 129,2, 129,3, 129,7, 134,8, 143,0, 151,6, 151,8, 152,6, 152,8, 160,0, 160,1, 170,0.

5

Conclusión: La reacción clic de CuAAC entre el azido-epóxido y alquino fluoresceína funciona bien en condiciones orgánicas y acuosas.

Ejemplo 2-Funcionalización de HA reticulado con fluoresceína.



- 10 Como previamente se ejemplificó en el documento de patente de los Estados Unidos N° U.S. 5.827.937, 10 g de ácido hialurónico, elaborado por fermentación de *Streptococo* se disuelve en 100 ml de NaOH al 1%,  $\text{pH}>9$ . Se añade el agente de reticulación en forma de una mezcla de BDDE y Fluo-BDDE en proporciones de 1:10 a 10:1 a una concentración total del 0,2%. La solución se incuba a  $40^\circ\text{C}$  durante 4 horas.

- 15 La solución incubada se diluye con una solución de agua ácida para alcanzar un pH neutro en la mezcla, rindiendo una concentración final de ácido hialurónico de 20 mg/ml y nuevamente se incuba durante 12 horas a  $70^\circ\text{C}$ . El gel viscoelástico que resulta de esta segunda incubación es después enfriado a temperatura ambiente y disgregado a su tamaño de partícula final, aproximadamente 0,5-1 mm. Las partículas de gel se lavan y esterilizan por calor o radiación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la fabricación de un ácido hialurónico (HA) reticulado que contiene un grupo funcionalizador, que comprende el paso de hacer reaccionar HA en un solo paso con una mezcla de:
- 5 (i) un primer agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales, y
- (ii) un agente funcionalizado, que consiste de un grupo funcionalizador acoplado vía una unión de 1,2,3-triazol a un segundo agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales, para obtener un HA reticulado que contiene el grupo funcionalizador.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde el primer y segundo agentes de reticulación se seleccionan independientemente del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales, y en donde el paso de la reacción se realiza a un pH básico para proporcionar tanto uniones entrecruzadas de éter entre el HA y el primer agente de reticulación como entre el HA y el agente funcionalizado.
- 15 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en donde los agentes de reticulación primero y segundo son seleccionados independientemente del grupo que consiste de epóxidos bifuncionales, preferiblemente diglicidil éteres.
4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en donde el primer y segundo agentes de reticulación son ambos butanodiol diglicidil éter (BDDE).
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el grupo funcionalizador es un agente de imagen.
- 20 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en donde el agente de imagen es la fluoresceína.
7. Un ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador acoplado al ácido hialurónico vía una unión de 1,2,3-triazol y una unión de éter, en donde el ácido hialurónico es reticulado utilizando el mismo tipo de unión de éter.
- 25 8. Un ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 7, en donde el grupo funcionalizador es un agente de imagen.
9. Un ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 8, en donde el agente de imagen es la fluoresceína.
10. Un ácido hialurónico reticulado que contiene un grupo funcionalizador según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, que se puede obtener por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 30 11. Un agente funcionalizado, que consiste en un grupo funcionalizador acoplado vía una unión de 1,2,3-triazol a un agente de reticulación seleccionado de epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales, preferiblemente de diglicidil éteres.
12. Un agente funcionalizado según la reivindicación 11, en donde el agente de reticulación es el butanodiol diglicidil éter (BDDE).
- 35 13. Un agente funcionalizado según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en donde el grupo funcionalizador es un agente de imagen.
14. Un agente funcionalizado según la reivindicación 13, en donde el agente de imagen es la fluoresceína.
15. El uso de un agente funcionalizado según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 y un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en epóxidos bifuncionales y epóxidos polifuncionales para la funcionalización y reticulación simultánea del ácido hialurónico.
- 40

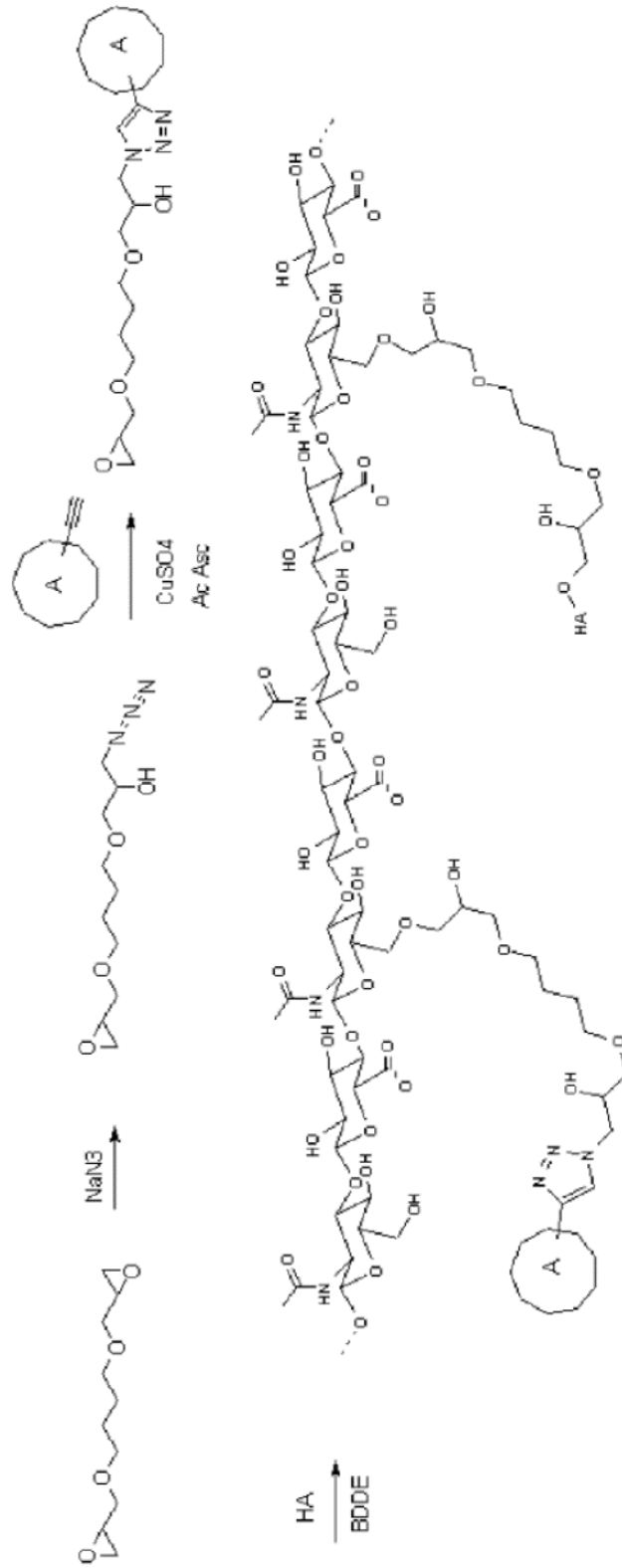


Fig 1