

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 290**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08	(2006.01)	A61K 9/00	(2006.01)
C08L 5/08	(2006.01)		
A61K 31/728	(2006.01)		
A61K 47/36	(2006.01)		
A61P 17/02	(2006.01)		
A61L 27/20	(2006.01)		
A61L 31/04	(2006.01)		
A61K 8/73	(2006.01)		
A61Q 19/00	(2006.01)		
A61Q 19/08	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2016 PCT/EP2016/050268**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16113192**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2016 E 16701095 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3245233**

54 Título: **Proceso en agua para la preparación de esteres butíricos de sal de sodio de ácido hialurónico**

30 Prioridad:
13.01.2015 IT MI20150017

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2019

73 Titular/es:
**BMG PHARMA S.P.A. (100.0%)
Via Federico Confalonieri 29
20124 Milano, IT**

72 Inventor/es:
**STUCCHI, LUCA;
GIANNI, RITA y
SECHI, ALESSANDRA**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 704 290 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

Proceso en agua para la preparación de ésteres butíricos de sal de sodio de ácido hialurónico

5 La presente invención se relaciona con un proceso para la preparación de ésteres butíricos de sal de sodio de ácido hialurónico (HA) y a formulaciones farmacéuticas, formulaciones cosméticas o dispositivos médicos que contienen ésteres butíricos de sal de sodio de ácido hialurónico (HA) producidas mediante dicho proceso.

10 La presente invención describe el proceso para preparar ésteres butíricos de sal de sodio de ácido hialurónico (HA) por síntesis en un ambiente acuoso que produce sorprendentemente altos grados de sustitución (DS) en éster butírico y preserva la cadena de polisacárido del ácido hialurónico nativo contra la degradación molecular. Los ésteres butíricos de ácido hialurónico preparados mediante dicho proceso están libres de impurezas que no son toleradas y/o prohibidas en el campo cosmético, poseen propiedades antiinflamatorias y antiirritantes y, por lo tanto, pueden utilizarse ventajosamente en el campo farmacéutico y dermocosmético y en dispositivos médicos.

Estado de la técnica

15 Se sabe que el butirato de ácido hialurónico (HABut), en el que los grupos hidroxilo del ácido hialurónico están esterificados con residuos de ácido butírico que tienen diferentes grados de sustitución, tiene propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y dermoprotectoras como un generador de elasticidad y humectante para la piel.

El ácido hialurónico y sus sales son altamente susceptibles a la degradación del peso molecular por hidrólisis de los enlaces glucósidos de la cadena de polisacárido. De la literatura se sabe que dicha hidrólisis está significativamente influenciada por el pH, la fuerza iónica y las condiciones de temperatura.

20 Las condiciones de derivación de HA son, por lo tanto, cruciales para preservar la longitud de la cadena de polisacárido. Las condiciones ideales son aquellas que minimizan la presencia de agua en el medio de reacción e involucran temperaturas que no son muy altas y un pH cercano a la neutralidad, entre 5 y 8.

25 El documento EP 0941253 describe la preparación de ésteres butíricos de ácido hialurónico que tienen un bajo grado de sustitución (DS máx.= 0,25) con anhídrido butírico en disolventes orgánicos apróticos tales como N,N-dimetilformamida y dimetilsulfóxido (DMF, DMSO) en presencia de activadores básicos tales como piridina y N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). El proceso de solubilización en solvente orgánico implica la preparación de sal de colidinio del ácido hialurónico, obtenida al preparar la forma ácida del polisacárido mediante la acidificación de la solución de polisacárido acuoso con 2N HCl y la evaporación del disolvente con un evaporador rotatorio, un proceso que causa la degradación del peso molecular de HA.

30 El documento WO 2005/092929 describe la preparación de ésteres butíricos de ácido hialurónico con un bajo grado de sustitución (DS \leq 0,1). La síntesis, bajo condiciones homogéneas, implica preparar sal de tetrabutilamonio (TBA) de ácido hialurónico, soluble en disolventes orgánicos apróticos, pasándola a través de una columna de intercambio iónico utilizando una resina de intercambio catiónico fuerte (Amberlite IR-120-plus), tal paso provoca la degradación del peso molecular.

35 El documento WO2009/068215 describe la preparación de ésteres mixtos butírico-fórmicos de ácido hialurónico y su uso en dermocosméticos, con actividades dermoprotectoras y antiinflamatorias. Los ésteres mixtos se preparan con anhídrido butírico en formamida (FA), con un activador básico de DMAP.

40 Los procesos descritos utilizan disolventes orgánicos apróticos y próticos como N,N dimetilformamida, formamida o dimetilsulfóxido, que se enumeran entre las sustancias prohibidas en las formulaciones cosméticas de acuerdo con el Reglamento (EC) no.1223/2009. También se utilizan bases orgánicas, tales como N,N dimetilaminopiridina, que poseen características de alta toxicidad (LD50 de decenas de ppm). Los residuos de los disolventes, reactivos y activadores no pueden eliminarse cuantitativamente durante el proceso de purificación.

Las reacciones en agua para la derivación del ácido hialurónico se reportan en el documento EP0416250, que reporta la formación de N-acilurea y O-isoacilurea en el grupo carboxilo del ácido hialurónico debido a la reacción con carbodiimidas o bis-carbodiimidas. La reacción tiene lugar en agua, a un pH controlado que no degrada el polisacárido.

45 El documento US5874417 describe la funcionalización del carboxilo de ácido hialurónico con una hidrazida en agua bajo condiciones suaves.

50 A. Mero et al. (polímero 2014,6,346-369) reporta que la HA se puede derivar en agua. Sin embargo, en fase acuosa, muchas reacciones deben llevarse a cabo bajo condiciones ácidas o alcalinas que impliquen una degradación significativa de la cadena HA. El artículo reporta reacciones en agua con carbodiimidas que conducen a la formación de enlaces amido en los grupos carboxilo.

El proceso de acuerdo con la presente invención también produce HABut con altos grados de sustitución, utilizando solo agua como disolvente y carbonato de sodio como activador básico. El producto obtenido no presenta ningún solvente o residuos de activador básico que den lugar a problemas particulares de seguridad.

Descripción de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con un proceso para la preparación de butirato de ácido hialurónico, o una sal del mismo, aceptable para uso farmacéutico o cosmético o como un dispositivo médico, que comprende hacer reaccionar ácido hialurónico, preferiblemente salificado con sodio u otro metal alcalino, en solución acuosa con butirilimidazolida en presencia de carbonato de sodio.
- El proceso de acuerdo con la invención se usa preferiblemente para preparar sal de sodio de butirato de ácido hialurónico.
- La sal de sodio de ácido hialurónico utilizada en el proceso tiene preferiblemente un peso molecular promedio en peso (MW) que oscila entre 10^3 y 10^6 Daltons.
- 10 La sal del ácido hialurónico se disuelve en agua desmineralizada y se agrega carbonato de sodio, seguido de butirilimidazolida a la solución resultante.
- La mezcla de reacción se mantiene a una temperatura que oscila entre 20 °C y 30 °C durante no menos de 60 minutos.
- El pH de la reacción oscila entre pH 11 y 9.
- 15 Cuando se completa la reacción, la mezcla se ajusta a un pH neutro y el producto se recupera por precipitación en un disolvente adecuado. El producto así obtenido se purifica, por ejemplo, mediante lavados sucesivos con disolventes adecuados y filtración.
- El proceso de acuerdo con la invención produce butirato de ácido hialurónico con diferentes grados de sustitución. El grado de sustitución (DS), definido como la proporción entre el número de residuos de ácido butírico por unidad de disacárido GlcNAc-GlcUA de ácido hialurónico, puede oscilar, por ejemplo, entre 0,01 y 2,5.
- 20 Se obtienen diferentes grados de sustitución variando la proporción entre ácido hialurónico y butirilimidazolida.
- El butirato de ácido hialurónico obtenido por el proceso de acuerdo con la invención no contiene residuos de disolventes o reactivos tóxicos y se puede usar en formulaciones farmacéuticas, formulaciones cosméticas y dispositivos médicos.
- 25 El objeto de la presente invención incluye, por lo tanto, formulaciones farmacéuticas y cosméticas que contienen butirato de ácido hialurónico, o una sal del mismo, aceptable para uso farmacéutico o cosmético, obtenido por el proceso reportado anteriormente, y al menos un excipiente y/o agente portador aceptable para productos de uso farmacéutico o cosmético.
- El butirato de ácido hialurónico obtenido por el proceso reportado, debido a la ausencia de disolventes y reactivos prohibidos por la legislación que rige los ingredientes cosméticos, puede utilizarse en el campo dermocosmético para uso tópico con actividad hidratante, generadora de elasticidad, tonificante, de antienvjecimiento o antiacné, en formulaciones con un alto perfil de seguridad que son adecuados, por ejemplo, para productos hipoalergénicos o pieles sensibles.
- 30 La molécula también posee marcadas actividades antiirritantes y antiinflamatorias mayores que las del ácido hialurónico (HA) y el butirato de sodio (NaBut), que influyen en la respuesta inflamatoria aguda, según se verifica en un modelo de neutrófilos in vitro (leucocitos polimorfonucleares o PMN). Como resultado de dicha característica, el butirato de ácido hialurónico producido por el proceso descrito es aplicable como ingrediente activo en formulaciones farmacéuticas, formulaciones cosméticas o dispositivos médicos como adyuvante en el tratamiento de lesiones cutáneas como inflamaciones, úlceras y lesiones causadas por hipertermia inducida por radiación como rayos UV, rayos X y rayos gamma.
- 35 Ejemplos
- Instrumentación utilizada:
- Espectrómetro Bruker Avance de 400 MHz equipado con una sonda inversa multinuclear de 5 mm con un gradiente z para la determinación del grado de sustitución (DS);
- 45 -Cromatógrafo Viscotek HP-SEC-TDA modelo 270 max equipado con un detector triple (dispersión de luz a 90 °C y 7 °C, índice de refracción y viscosímetro) para determinar la distribución de los pesos moleculares y el peso molecular promedio en peso (MW).
- Determinación del grado de sustitución (DS)
- El grado de sustitución en los ésteres de butirato en el derivado de ácido hialurónico se cuantificó mediante espectroscopia de RMN. Los espectros de ^1H RMN fueron efectuados en D_2O con un espectrómetro Bruker Avance

de 400 MHz equipado con una sonda inversa multinuclear de 5 mm con un gradiente z. Las pruebas se realizaron termostatazando la sonda de medición a 300 °K.

La prueba incluye el análisis por Espectroscopía Ordenada por Difusión (DOSY), que verifica la existencia del enlace covalente entre el polímero y el ácido butírico.

- 5 La cuantificación de DS en éster de butirato se lleva a cabo después de una hidrólisis exhaustiva con NaOD directamente en el tubo de RMN.

El espectro de ¹H RMN del hidrolizado permite la integración de las señales atribuibles al ácido butírico (protones de metilo y metileno vecinal) y aquellas atribuibles al ácido hialurónico (protones sacáridos, excluyendo los dos protones anoméricos); su proporción determina el grado de sustitución.

10 Métodos

Determinación de la distribución del peso molecular y del peso molecular promedio en peso (MW) mediante cromatografía HP-SEC-TDA

- 15 Las muestras se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una combinación de tres detectores (dispersión de luz a 90° y 7°, índice de refracción y viscosímetro). El procesamiento del cromatograma permite determinar la distribución de los pesos moleculares Mw (peso molecular promedio en peso).

Condiciones de cromatografía

Instrumentación Viscotek 270 máx.

Columnas: A7000, A6000mx2, temperatura 35 °C.

Fase móvil: PBS.

- 20 Rata de flujo: 0,750 ml/min.

Detector: Viscotek TDA equipado con índice de refracción, viscosímetro capilar y dispersión de luz con medidas a 90° y 7°, temperatura 35 °C.

Volumen inyectado: 100 µl.

Evaluación de la producción de aniones superóxido

- 25 La producción de ROS, el indicador de activación metabólica de los PMNs, se evaluó en términos de la cantidad de anión superóxido (O₂⁻) liberado en el medio luego de la activación de los neutrófilos en los pozos de placas de microtitulación recubiertas con fibrinógeno (FBG), colágeno IV (CIV), HA o HABut. Se usó un método espectrofotométrico para medir la cantidad de citocromo c reducida por el anión superóxido producido por las células durante la incubación en la placa.

- 30 Evaluación de la adherencia a superficies biológicas

La adhesión celular a la superficie durante el ensayo metabólico se evaluó mediante el ensayo de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), una enzima marcador contenida en los gránulos azurófilos de PMNs. Se utilizó un protocolo descrito por Menegazzi et al. (A new, one-step assay on whole cell suspensions for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils. Menegazzi R, Zabucchi G, Knowles A, Cramer R, Patriarca P. J Leukoc Biol. 1992 Dec;52(6):619-24). La actividad de la mieloperoxidasa se ensayó con una prueba cuantitativa colorimétrica de enzimas que mide la oxidación del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) por la enzima MPO en presencia de H₂O₂.

- 35 Ejemplo 1: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico, DS= 0,3 (BUT12103)

- 40 Se introducen 100 ml de agua desmineralizada en un reactor de 1 l, seguido de 10,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 280 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

Luego se agrega carbonato de disodio (Na₂CO₃-1,6 g), seguido de butirilimidazolida (2,6 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25°, y luego el producto se aísla por precipitación en acetona y posteriormente se decanta.

La solución se purifica mediante lavados sucesivos en acetona y se recupera por filtración a presión negativa.

- 45 Finalmente, el producto se suspende en acetona, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el solvente por filtración.

ES 2 704 290 T3

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 3 horas y luego en un horno al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 16 horas.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de agua deuterada (D_2O) y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

5 Los espectros de RMN se reportan en la Figura 1; el espectro inferior (a) se obtiene aplicando una secuencia DOSY que solo retiene las señales atribuibles a grupos químicos enlazados covalentemente al polímero.

Los otros dos espectros de 1H RMN son respectivamente antes (b) y después (c) de la hidrólisis del éster butírico mediante la adición de hidróxido de sodio deuterado (NaOD). Al integrar las señales de los espectros de 1H RMN, se determina un DS de 0,30.

Ejemplo 2: Determinación de la distribución del peso molecular y el peso molecular promedio en peso (MW)

10 La muestra de sal de sodio de ácido hialurónico utilizada para la síntesis del éster butírico descrito en el Ejemplo 1, certificada con un MW de 280 kDa, se analizó mediante cromatografía HP-SEC-TDA. La distribución de los pesos moleculares experimentales da un peso molecular promedio en peso (MW) de 300 kDa.

15 La muestra de éster butírico de la sal de sodio de ácido hialurónico producida como se describe en el Ejemplo 1 se analizó mediante cromatografía HP-SEC-TDA. La distribución de los pesos moleculares experimentales da un peso molecular promedio en peso (MW) de 360 kDa.

Ejemplo 3: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico, DS= 0,3 (BUT14014)

Se vierte 1 l de agua desmineralizada en un reactor de 15 l, seguido de 100,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 290 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

20 Luego se agrega carbonato de disodio (Na_2CO_3 -15,9 g), seguido de butirilimidazolida (25,9 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C; la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa que consiste en ácido clorhídrico (HCl) y cloruro de sodio (NaCl).

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol.

25 Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 16 horas; la mezcla se transfiere y el producto se aísla por filtración.

El producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

30 Finalmente, el producto se suspende en isopropanol, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el solvente por filtración.

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 3 horas y luego en un horno al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 16 horas.

10 mg de muestra se solubilizan en 0,7 ml de D_2O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

10 mg de muestra se solubilizan en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

35 Al integrar las señales de los espectros de 1H RMN, se determina un DS de 0,30.

Ejemplo 4: Síntesis del éster butírico de la sal de sodio de ácido hialurónico, DS= 0,3 (HBint05012014)

Se introducen 2,5 l de agua desmineralizada en un reactor de 15 l, seguido de 250,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 290 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

40 Luego se agrega carbonato de disodio (Na_2CO_3 -39,8 g), seguido de butirilimidazolida (64,8 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa que consiste en HCl y NaCl.

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en acetona.

45 Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos. El producto se aísla luego por decantación.

El producto se purifica luego mediante lavados sucesivos en acetona, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

Finalmente, el producto se suspende en acetona, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el solvente por filtración.

- 5 El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 16 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 24 horas.

10 mg de muestra se solubilizan en 0,7 ml de D₂O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

10 mg de muestra se solubilizan en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Al integrar las señales de los espectros de ¹H RMN, se determina un DS de 0,30.

- 10 Ejemplo 5: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico, DS= 0,58 (BUT14017)

Se introducen 100 ml de agua desmineralizada en un reactor de 1 l, seguido de 10,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 290 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

- 15 Luego se agrega carbonato de disodio (Na₂CO₃-2,6 g), seguido de butirilimidazolida (9,2 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa que consiste en HCl y NaCl.

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol. El producto se aísla luego por decantación.

- 20 El producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

Finalmente, el producto se suspende en isopropanol, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el disolvente por filtración.

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 3 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 24 horas.

- 25 10 mg de muestra se solubilizan en 0,7 ml de D₂O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

10 mg de muestra se solubilizan en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Al integrar las señales de los espectros de ¹H RMN, se determina un DS de 0,58.

Ejemplo 6: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico, DS= 0,85 (BUT14019)

- 30 Se introducen 100 ml de agua desmineralizada en un reactor de 1 l, seguido de 10,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 290 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

Luego se agrega carbonato de disodio (Na₂CO₃-5,3 g), seguido de butirilimidazolida (9,2 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl y NaCl.

- 35 La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol. El producto se aísla luego por decantación.

El producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

- 40 Finalmente, el producto se suspende en isopropanol, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el solvente por filtración.

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 3 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 24 horas.

10 mg de muestra se solubilizan en 0,7 ml de D₂O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

10 mg de muestra se solubilizan en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

- 45 Al integrar las señales de los espectros de ¹H RMN, se determina un DS de 0,85.

ES 2 704 290 T3

Ejemplo 7: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico, DS= 1,30 (HBint04042014-BUT14023)

Se introducen 100 ml de agua desmineralizada en un reactor de 1 l, seguido de 10,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 290 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

- 5 Luego se agrega carbonato de disodio (Na_2CO_3 -13,2 g), seguido de butirilimidazolida (23,1 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl.

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol. El producto se aísla luego por decantación.

- 10 El producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

Finalmente, el producto se suspende en isopropanol, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el solvente por filtración.

- 15 El precipitado se seca en una corriente de aire a temperatura ambiente durante al menos 3 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 24 horas.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de D_2O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Mediante la integración de las señales de los espectros de ^1H RMN, se determina un DS de 1,30.

- 20 Ejemplo 8: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico de alto peso molecular, DS= 0,24 (HBint01042014-BUT14025)

Se vierte 1 l de agua desmineralizada en un reactor de 5 l, seguido de 50,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 1.270 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

- 25 Luego se agrega carbonato de disodio (Na_2CO_3 -10,6 g), seguido de butirilimidazolida (25,9 g) después de 90 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene por adición de 360 ml de una solución acuosa que consiste en HCl y NaCl.

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en acetona. Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 16 horas. El producto se aísla luego por decantación.

- 30 El producto se purifica luego mediante lavados sucesivos en acetona, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

Finalmente, el producto se suspende en acetona, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el disolvente por filtración.

- 35 El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 16 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 24 horas.

Se solubilizan 3 mg de sólido en 0,7 ml de D_2O y se transfieren a un tubo de RMN.

Se solubilizan 10 mg de sólido en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de RMN.

Mediante la integración de las señales de los espectros de ^1H RMN, se determina un DS de 0,24.

- 40 Ejemplo 9: Síntesis del éster butírico de la sal de sodio de ácido hialurónico de alto peso molecular, DS= 0,51 (HBint03042014-BUT14032)

Se introducen 0,72 l de agua desmineralizada en un reactor de 5 l, seguido de 30,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 1.270 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

- 45 Luego se agrega carbonato de disodio (Na_2CO_3 -23,8 g), seguido de butirilimidazolida (60,9 g) después de 60 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl.

ES 2 704 290 T3

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en acetona. Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 16 horas. El producto se aísla luego por decantación.

5 El producto se purifica luego mediante lavados sucesivos en acetona, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

Finalmente, el producto se suspende en acetona, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el solvente por filtración.

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 30 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 24 horas.

10 Se solubilizan 3 mg de muestra en 0,7 ml de D₂O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Mediante la integración de las señales de los espectros de ¹H RMN, se determina un DS de 0,51.

Ejemplo 10: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico de alto peso molecular, DS= 0,97 (HBint02042014-BUT14031)

15 Se introducen 0,85 l de agua desmineralizada en un reactor de 5 l, seguido de 30,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 1.270 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

20 Luego se agrega carbonato de disodio (Na₂CO₃-47,6 g), seguido de butirilimidazolida (138,3 g) después de 60 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl.

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en acetona. Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 16 horas y el producto se aísla por filtración.

25 El producto se purifica luego mediante lavados sucesivos en acetona, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

Finalmente, el producto se suspende en acetona, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el solvente por filtración.

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 16 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 24 horas.

30 Se solubilizan 3 mg de muestra en 0,7 ml de D₂O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Mediante la integración de las señales de los espectros de ¹H RMN, se determina un DS de 0,97.

Ejemplo 11: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico de bajo peso molecular, DS= 0,46 (BUT14037)

35 Se vierten 35 ml de agua desmineralizada en un matraz de 0,5 l, seguido de 5,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 45 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

40 Luego se agrega carbonato de disodio (Na₂CO₃-0,8 g), seguido de butirilimidazolida (1,3 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl y NaCl.

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol. Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 16 horas; la mezcla se transfiere y el producto se aísla por filtración.

45 El producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

Finalmente, el producto se suspende en isopropanol, se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos y luego se aísla, eliminando el solvente por filtración.

ES 2 704 290 T3

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 16 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 16 horas.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de D₂O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

5 Al integrar las señales de los espectros de ¹H RMN, se determina un DS de 0,46.

Ejemplo 12: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico de bajo peso molecular, DS= 1,68 (BUT14039)

10 Se introducen 12,5 ml de agua desmineralizada en un matraz de 0,25 l, seguido de 5,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 45 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

Luego se agrega carbonato de disodio (Na₂CO₃-6,6 g), seguido de butirilimidazolida (11,9 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl.

15 La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol. Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 16 horas. El producto se aísla luego por decantación.

El producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

20 El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 16 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 16 horas.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de D₂O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Al integrar las señales de los espectros de ¹H RMN, se determina un DS de 1,68.

25 Ejemplo 13: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico de bajo peso molecular, DS= 1,90 (BUT14042)

Se vierten 25,0 ml de agua desmineralizada en un matraz de 0,5 l, seguido de 10,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 45 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

30 Luego se agrega carbonato de disodio (Na₂CO₃-13,2 g), seguido de butirilimidazolida (68,2 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 2 horas a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl.

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol. Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 16 horas. El producto se aísla luego por decantación.

35 El producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 16 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 16 horas.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de D₂O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

40 Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Al integrar las señales de los espectros de ¹H RMN, se determina un DS de 1,90.

Ejemplo 14: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico de bajo peso molecular, DS= 0,06 (BUT14043)

45 Se introducen 50,0 ml de agua desmineralizada en un matraz de 0,5 l, seguido de 10,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 45 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

Luego se agrega carbonato de disodio (Na_2CO_3 -0,2 g), seguido de butirilimidazolida (0,3 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 2 horas a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl.

- 5 La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol. Cuando la precipitación ha terminado, el producto se aísla mediante filtración a presión negativa; el producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 16 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 7 horas.

- 10 Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de D_2O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Mediante la integración de las señales de los espectros de ^1H RMN, se determina un DS de 0,06.

Ejemplo 15: Síntesis del éster butírico de sal de sodio de ácido hialurónico de bajo peso molecular, DS= 0,02 (BUT14044)

- 15 Se introducen 50,0 ml de agua desmineralizada en un matraz de 0,5 l, seguido de 10,0 g de hialuronato de sodio con un MW de 45 kDa. La mezcla se termostatiza a 25 °C y se mantiene bajo agitación a una temperatura constante hasta que se disuelve completamente.

- 20 Luego se agrega carbonato de disodio (Na_2CO_3 -0,1 g), seguido de butirilimidazolida (0,1 g) después de 30 minutos de agitación. La solución se deja bajo agitación durante 1 hora a 25 °C, y la reacción se detiene luego agregando una solución acuosa de HCl y NaCl.

La solución se deja bajo agitación durante al menos 30 minutos, y luego el producto se recupera por precipitación en isopropanol. Cuando la precipitación ha terminado, la solución se deja bajo agitación durante al menos 16 horas; la mezcla se transfiere luego y el producto se aísla por filtración.

- 25 El producto se purifica luego por lavados sucesivos en isopropanol, después de lo cual el producto se recupera por filtración.

El precipitado se seca a temperatura ambiente durante al menos 16 horas y luego al vacío a una temperatura de ≤ 60 °C durante al menos 16 horas.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de D_2O y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

Se solubilizan 10 mg de muestra en 0,7 ml de NaOD y se transfieren a un tubo de ensayo de RMN.

- 30 Mediante la integración de las señales de los espectros de ^1H RMN, se determina un DS de 0,02.

Ejemplo 16: Producción de anión superóxido por PMNs activados por TNF.

Producción de anión superóxido por PMNs estimulados durante 45 minutos con la citocina proinflamatoria TNF en pozos recubiertos con FBG (fibrinógeno; superficie permisiva a la adhesión de PMN); CIV (colágeno tipo IV; superficie no permisiva); HA: ácido hialurónico; HABut: butirato de hialuronato de sodio DS= 0,3 ejemplo no. 4.

- 35 Los pozos recubiertos con los diversos sustratos se llenan con una solución 0,18 mM de citocromo c y 0,15 ng/ml de TNF en regulador Hepes. Los módulos así preparados se calientan durante 10 minutos a 37 grados en una incubadora humidificada; se agrega una suspensión celular de $1,5 \times 10^6$ PMN/ml en regulador Hepes a cada pozo. A intervalos de 15 minutos, la placa se retira de la incubadora y se somete a análisis espectrofotométrico en un lector de microplacas a las longitudes de onda de 550 nm y 540 nm, que corresponden respectivamente al pico de absorción del citocromo c reducido y al punto isobéptico del espectro de absorción del citocromo c reducido y oxidado. La diferencia entre los valores de absorbancia registrados en las dos longitudes de onda es proporcional a la cantidad de citocromo c reducido. La cantidad de O_2^- producida por 10^6 células se calcula de la siguiente manera:

$$\text{nmoles } \text{O}_2^- / 10^6 \text{ PMN} = \text{OD} \times 10^6 / 0.0037 \times n$$

en el que n es el número de células agregadas a cada pozo.

- 45 El histograma reportado en la Figura 2 muestra una reducción significativa en la producción de anión superóxido ($p < 0,001$ calculada por la prueba "t" de Student con $n = 4$) en respuesta al TNF de los PMNs incubados en la superficie recubierta con HABut, con un grado de sustitución de 0,3 en comparación con los incubados en una superficie con HA.

Ejemplo 17: Ensayo de adhesión de PMN a superficies biológicas.

Adhesión de PMN a una superficie recubierta con FBG (superficie permisiva a la adhesión de PMN); CIV (superficie no permisiva); HA: ácido hialurónico; HABut: butirato de hialuronato de sodio DS= 0,3 ejemplo no. 4. En reposo: PMN no activado con TNF. TNF: PMN activado con TNF; PMA: PMN activado con forbol 12-miristato 13-acetato.

- 5 Después de tomar las lecturas espectrofotométricas para la medición de la producción de O₂, los pozos de la microplaca se llenan con PBS y se centrifugan a 200 rpm durante 5 minutos para eliminar las células que no se adhieren a la superficie. La actividad de la mieloperoxidasa se ensaya midiendo la oxidación del sustrato 3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) por la enzima MPO en presencia de H₂O₂. Se agrega a cada pozo un regulador de acetato que contiene TMB, cetiltrimetilamonio (CTAB) y 3-amino-1,2,4-triazol (AMT), y la placa se agita durante 5 minutos para facilitar la lisis celular y promover la liberación de MPO de los gránulos. La actividad de la peroxidasa eosinofílica de los eosinófilos que puede contaminar la preparación de PMN se inhibe con ATM. 2 minutos después de la adición de H₂O₂, la reacción se detiene con H₂SO₄, y la absorbancia de cada pozo se mide a la longitud de onda de 405 nm. El porcentaje de células adheridas se calcula con referencia a una curva estándar construida, en cada experimento, sobre la base de los valores de actividad de la peroxidasa calculados para cantidades conocidas de células.
- 10
- 15 El histograma reportado en la Figura 3 muestra una reducción significativa ($p < 0,001$ calculada por la prueba "t" de Student con $n = 4$) en el número de PMNs activados y no activados que se adhieren a la superficie recubierta con HABut, con un grado de sustitución de 0,3 en comparación con el número de PMNs adheridos al recubierto con HA.

Ejemplo 18: Efecto del grado de sustitución de butirato y el peso molecular del ácido hialurónico sobre la adhesión de PMFs activados y no activados

- 20 Adhesión de PMNs estimulados con TNF a una superficie recubierta con HA y HABut. HABut: butirato de hialuronato de sodio DS= 0,3 ejemplo no. 4; HABut muestras no.1: butirato de hialuronato de sodio DS= 1,3 ejemplo no. 7; HABut muestras no. 2: HMW butirato de hialuronato de sodio DS= 0,24 ejemplo no. 8; HABut muestras no. 3 HMW butirato de hialuronato de sodio DS= 0,97 ejemplo no. 10. En reposo: control negativo. PMA: control positivo.

Columna negra: PMNs no activados con TNF. Columna blanca: PMNs activados con TNF.

- 25 La adhesión de los PMFs a las superficies se evalúa como se describe en el ejemplo 18.

El histograma reportado en la Figura 4 muestra que cuando aumenta el grado de sustitución con butirato, HABut se convierte en una superficie cada vez menos permisiva para la interacción adhesiva con PMNs, mientras que su peso molecular parece ser irrelevante.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de butirato de ácido hialurónico o una sal del mismo, aceptable para uso farmacéutico y cosmético, o uso como dispositivo médico, que comprende la reacción del ácido hialurónico salificado con sodio u otro metal alcalino en solución acuosa con butirilimidazolida en presencia de carbonato de sodio.
- 5 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de sal de sodio de butirato de ácido hialurónico.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la sal de sodio de ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio en peso que oscila de 10^3 a 10^6 Daltons.
4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el butirato de ácido hialurónico tiene un grado de sustitución que oscila de 0,01 a 2,5.
- 10 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el butirato de ácido hialurónico tiene un grado de sustitución que oscila de 0,1 a 2.
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la reacción se lleva a cabo a una temperatura que oscila de 20 °C a 30 °C.
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la reacción se lleva a cabo a 25 °C.
- 15 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la reacción se lleva a cabo a un pH que oscila de 11 a 9.
9. Uso como cosmético de una formulación que comprende butirato de ácido hialurónico o una sal del mismo aceptable para uso cosmético, obtenido por el proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, y al menos un excipiente y/o agente portador aceptable para uso cosmético.
- 20 10. Dispositivo médico que comprende butirato de ácido hialurónico o una sal del mismo aceptable para uso en un dispositivo médico, obtenido por el proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, como adyuvante en el tratamiento de lesiones cutáneas tales como inflamaciones, úlceras y lesiones causadas por hipertermia inducida por irradiación con, por ejemplo, radiación UV, rayos X o rayos gamma.
11. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho uso es tópico.
12. Dispositivo médico para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho uso es tópico.
- 25 13. Una formulación farmacéutica que comprende butirato de ácido hialurónico o una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico, obtenida por el proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, para uso como adyuvante en el tratamiento de lesiones cutáneas tales como inflamaciones, úlceras y lesiones causadas por hipertermia inducida por irradiación con, por ejemplo, radiación UV, rayos X o rayos gamma.
14. La formulación farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 13 para uso tópico.
- 30

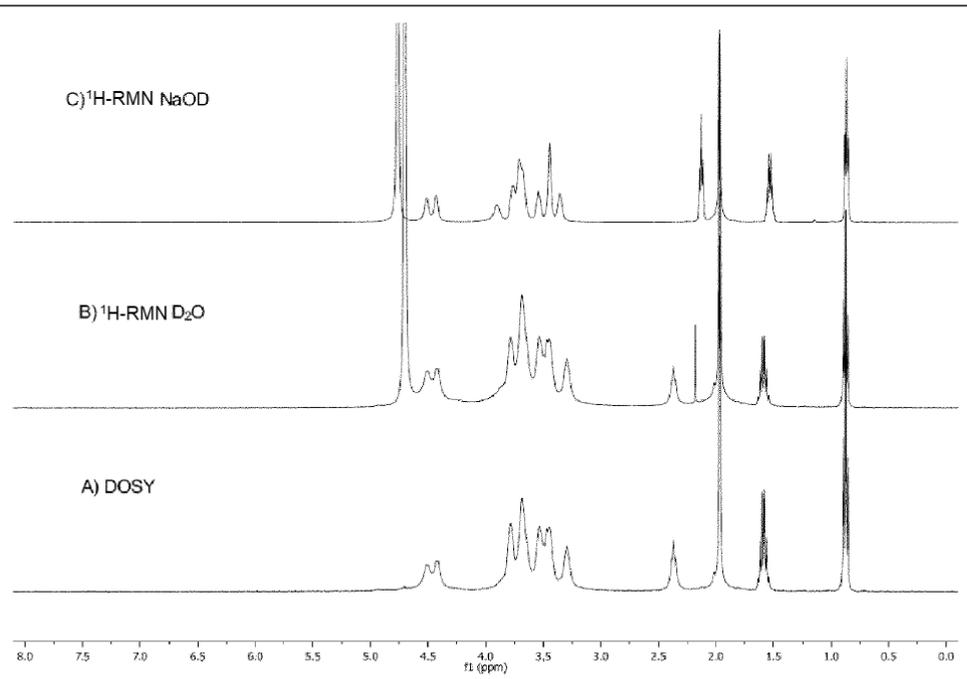


Figura 1

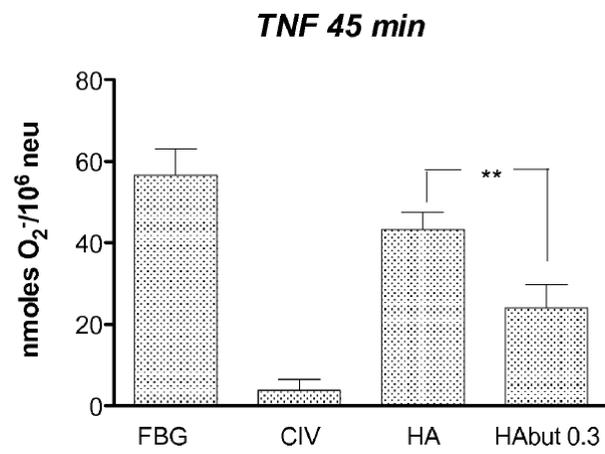


Figura 2

Adhesión de neutrófilos a superficies recubiertas

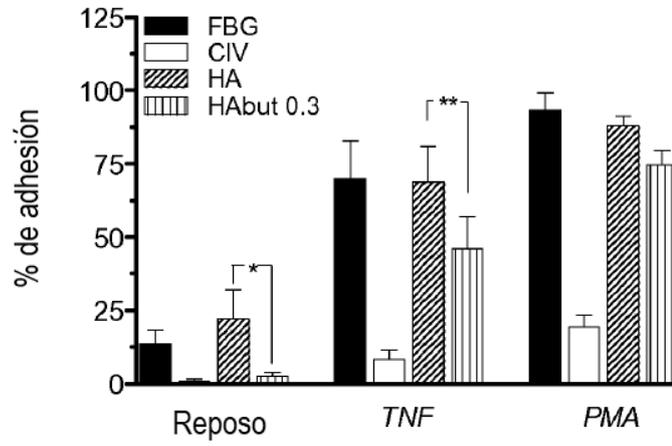


Figura 3

Adhesión de neutrófilos en reposo y tratados con TNF a HA o diferentes formulaciones HABut

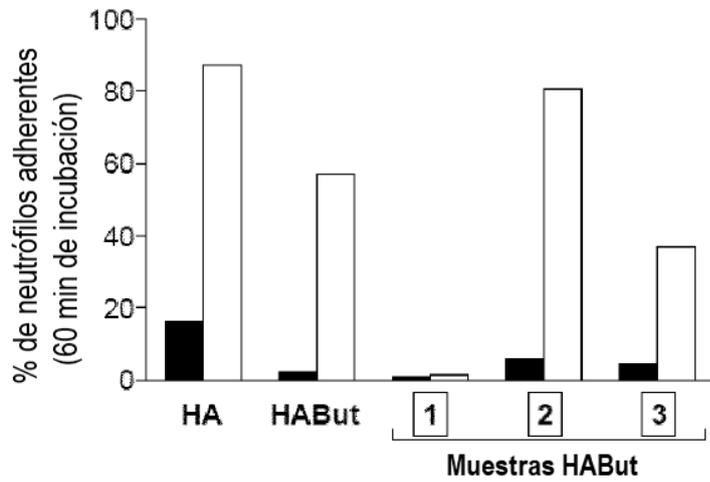


Figura 4