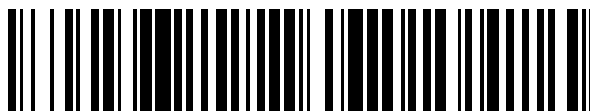


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 649**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2016 PCT/IB2016/056868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2016 E 16810055 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3377536**

54 Título: **Procedimiento mejorado de producción de ácido hialurónico (AH) sulfatado de alta pureza**

30 Prioridad:

16.11.2015 IT UB20155623

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

13.04.2020

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**GUARISE, CRISTIAN y
PAVAN, MAURO**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 753 649 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento mejorado de producción de ácido hialurónico (AH) sulfatado de alta pureza

5 La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de producción de AH sulfatado de alta pureza.

Desde hace tiempo se conoce la posibilidad de derivar químicamente el ácido hialurónico (AH) para obtener estructuras que mantengan las propiedades fisicoquímicas de la molécula de partida, adquiriendo nuevas características específicas. En resumen, el AH es un heteropolisacárido que consiste en restos alternantes de ácido
10 D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, con una cadena lineal, que tiene un peso molecular que puede variar de 50.000 a 13×10^6 Da, dependiendo de la fuente de la que se obtiene y también de los procedimientos de preparación utilizados.

15 El ácido hialurónico está prácticamente omnipresente en el cuerpo humano, en el que juega un papel importante sobre todo, pero no solo, como soporte mecánico de las células de numerosos tejidos, como la piel, los tendones, los músculos y los cartílagos. También se conocen las interacciones del AH con su receptor de membrana CD44 y con los receptores de opiáceos.

20 Debido a su naturaleza química, el AH tiene numerosos grupos funcionales que se pueden derivar. En este caso, entre las diversas modificaciones posibles conocidas por el experto en la materia, la modificación de interés para la presente invención es la sulfatación, es decir el enriquecimiento con grupos $-SO_3$. Esta derivación puede tener lugar con respecto a los numerosos grupos $-OH$ disponibles (O-sulfatación) y también al grupo amina del resto de N-acetil-D-glucosamina, después de la desacetilación del mismo (N-sulfatación) (patentes EP 702699; EP 940410; EP 971961; EP 889055). La derivación diferente hace que las moléculas sean adecuadas para diversos usos; los
25 derivados N-sulfatados son, de hecho, particularmente útiles para la producción de dispositivos médicos. Las propiedades del producto sulfatado también dependen del grado de sulfatación, expresado como el número de grupos $-SO_3$ presentes por unidad de disacárido.

30 El derivado sulfatado de ácido hialurónico de interés para los fines de la presente invención es el derivado O-sulfatado, que simplemente se indica en la presente solicitud de patente como AHS, y que es capaz de pasar fácilmente a través de la barrera cutánea, facilitando el paso de sustancias asociado con el mismo. Estas características lo convierten en un excelente vehículo para la absorción cutánea de moléculas farmacológica y biológicamente activas. La sulfatación también le da al ácido hialurónico AH propiedades anticoagulantes similares a la heparina que se han explotado, por ejemplo, en el recubrimiento de stents vasculares.

35 También se descubrió y se demostró recientemente que el AHS tiene propiedades farmacológicas reales: es un poderoso agente antiinflamatorio, que ejerce su acción mediante una modulación efectiva de la actividad de numerosas citocinas, tanto pro como antiinflamatorias. Gracias a esto, el AHS puede aplicarse en la terapia de numerosas enfermedades mediadas por la alteración de los niveles de citoquinas (artritis reumatoide, asma, enfermedades autoinmunes sistémicas y cutáneas, infecciones virales, dermatitis atópica, eczema, vitiligo, linfomas, etc.) (documentos WO2010130468; WO2010130466).

40 Los procedimientos conocidos actualmente de producción de AH son procedimientos caracterizados por rendimientos de producción relativamente limitados y etapas de purificación obligatorias que requieren estrictamente una fase de diálisis.

45 El uso terapéutico de AH y/o sus derivados sulfatados, que es potencialmente tan vasto, también crea el problema de naturaleza productiva, que la presente invención propone resolver, encontrando un procedimiento de producción de AH sulfatado y/o sus derivados sulfatados, que es más rápido, consume menos en términos de tiempo y materias primas, y sobre todo es particularmente eficaz con respecto al rendimiento del procedimiento y la pureza del producto final.

Objeto de la invención

55 Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de producción de ácido hialurónico (AH) sulfatado, derivados de AH sulfatados y/o sus mezclas, que tienen una alta pureza y un grado de sulfatación que varía de 1 a 3, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 60 a) solubilización de AH-Na o derivado de AH-Na, en un disolvente aprótico seleccionado preferiblemente entre dimetilsulfóxido (DMSO), N,N-dimetilformamida (DMF) o N-metilpirrolidona (NMP), más preferiblemente DMSO, en presencia de un ácido sulfónico orgánico, preferiblemente ácido metanosulfónico, en una cantidad que varía de 4,5 a 5,5 moles/equivalentes molares con respecto a la unidad repetitiva de disacárido de AH o de derivado de AH;
- 65 b) sulfatación de la solución obtenida al final de la etapa a) mediante la adición de un exceso de SO_3 -piridina, SO_3 -trimetilamina u otros agentes sulfurantes, preferiblemente SO_3 -piridina;
- c) precipitación en etanol, preferiblemente etanol absoluto, hasta obtener un precipitado;

d) solubilización del precipitado así obtenido en una mezcla de agua y el disolvente aprótico utilizado en la etapa a), en presencia de un exceso de NaCl, dicho exceso calculado con respecto a los grupos sulfato residuales, con un ajuste de pH dentro de un intervalo de 3 a 4;

e) precipitación adicional con etanol, preferiblemente etanol absoluto, hasta obtener un polvo;

5 f) lavados del polvo procedente de la etapa e) y secado al vacío del producto así obtenido.

Los lavados proporcionados en la etapa f) del procedimiento de acuerdo con la presente invención pueden efectuarse en el producto obtenido en la etapa e) como sigue:

10 f) eliminación del disolvente lavando el precipitado tres veces con etanol/agua en una proporción de 8:2;

f") eliminación de los restos de piridina mediante lavados sucesivos con etanol/NaOH 0,1 M 8:2; etanol/HCl 8:2; etanol/agua 8:2 y finalmente con etanol absoluto.

15 El ácido hialurónico (AH) sulfatado o derivados sulfatados de AH, y/o sus mezclas, con un grado de sulfatación que varía de 1 a 3 y con un grado de pureza superior al 98 %, se pueden obtener con el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

20 Las composiciones farmacéuticas que comprenden ácido hialurónico sulfatado o derivados de AH sulfatados, y/o sus mezclas, con un grado de sulfatación que varía de 1 a 3 y con un grado de pureza superior al 98 %, se pueden obtener con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, en presencia de aditivos farmacéuticamente aceptables.

25 El nuevo procedimiento mejorado de producción de AH sulfatado con un grado que varía de 1 a 3 según la presente invención, tiene la ventaja principal de ser particularmente rápido, consumir menos en términos de tiempo y materias primas, y sobre todo ser sorprendentemente más eficaz que los procedimientos de producción de AH sulfatado conocidos actualmente, tanto en términos de rendimiento del procedimiento como de pureza del producto final.

30 El procedimiento de sulfatación del ácido hialurónico y/o sus derivados de acuerdo con la presente invención, mediante la eliminación de algunas etapas (principalmente una etapa de diálisis) consideradas necesarias en todos los procedimientos del estado de la técnica, y con la inserción de modificaciones técnicas esenciales, sorprendentemente permite obtener un producto final más puro con rendimientos muy altos.

35 Un aspecto particularmente ventajoso del procedimiento de acuerdo con la presente invención es, de hecho, la formación de un precipitado extremadamente fino y puro al final de la fase de precipitación e), que ha permitido que una de las etapas principales de los procedimientos conocidos sea eliminada, y específicamente la etapa de diálisis. La pureza del producto final también afecta sus características específicas; en la fase de formulación de composiciones farmacéuticas, por ejemplo, el riesgo de interacción entre el "principio activo" (AH sulfatado o derivado de AH) obtenido de acuerdo con la presente invención y los otros componentes de la formulación, ya sean excipientes u otras sustancias farmacológica y/o biológicamente activas, se minimiza. El procedimiento de acuerdo con la presente invención también se caracteriza por rendimientos extremadamente altos, prácticamente cuantitativos, absolutamente inesperados según las enseñanzas de la técnica anterior.

45 El ácido hialurónico de partida utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede derivarse de cualquier fuente, por ejemplo, de la extracción de panales de gallo (patente EP138572), fermentación, tal como la conocen personas expertas en este campo, o biosíntesis (de Bacillus, documento WO2012032154), y tiene un peso molecular promedio que oscila entre 100.000 y 250.000 Da, preferiblemente entre 180.000 y 230.000 Da, o entre 500.000 y 750.000 Da, preferiblemente entre 700.000 y 730.000 Da.

50 Debe señalarse que el peso molecular promedio (MW) se refiere al peso molecular promedio en peso calculado con el procedimiento de "*viscosidad intrínseca*" (Terbojevich et al., Carbohydr. Res., 1986, 363-377).

55 En la presente solicitud de patente, lo que mejora el procedimiento de preparación de AH sulfatado con un grado que varía de 1 a 3, el término grado de sulfatación se refiere al número de grupos -SO₃ por unidad de disacárido repetitiva, y más específicamente:

la sulfatación de grado 1 comprende de 0,5 a 1,5 grupos sulfato;

la sulfatación de grado 2 comprende de 1,5 a 2,5 grupos sulfato;

la sulfatación de grado 3 comprende de 2,5 a 3,5 grupos sulfato.

60 El procedimiento, objeto de la presente invención, permite no solo que se produzca con éxito AH sulfatado, sino también derivados sulfatados de ácido hialurónico, es decir, a partir de moléculas más complejas obtenidas modificando químicamente el AH inicial, tales como:

65 amidas de AH con aminos de las series alifática, arilalifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación que varía del 0,1 al 50 %, mientras que el porcentaje restante de AH no sometido a amidación se puede salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas (HYADD® - patente EP 1095064 B1);

ésteres de AH con alcoholes de las series alifática, arilalifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de esterificación que puede variar, dependiendo del tipo y la longitud de la cadena del alcohol utilizado, preferiblemente entre el 50 y el 100 %, mientras que el porcentaje restante de AH no esterificado se puede salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas (HYAFF® - patente EP 216453 B1);

5 ésteres internos de AH con un porcentaje de esterificación que no exceda el 20 %, preferiblemente con una esterificación del 0,05 al 10 %, mientras que el porcentaje restante de AH no esterificado se puede salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas (ACP® - patente EP 341745 B1).

10 El ácido hialurónico sulfatado así obtenido puede usarse como tal, pero también puede usarse como compuesto de partida para derivaciones adicionales. Se puede unir, por ejemplo, a moléculas fotorreactivas a través de un espaciador, o a otras entidades químicas para llevar a cabo reacciones conocidas en el estado de la técnica (por ejemplo, reacciones mediante química clic).

15 Descripción detallada de la invención

Los procedimientos de sulfatación conocidos en el estado de la técnica generalmente comprenden las siguientes etapas:

- 20 – disolución de AH en forma de sal (preferiblemente tetrabutilamonio - TBA), en un disolvente aprótico (DMSO, DMF, etc.). Incluso si generalmente se indica la disolución de AH, en esta primera etapa, en realidad, no se obtiene una disolución, sino más apropiadamente una suspensión ya que el AH no es soluble en disolvente aprótico y sirve específicamente para hacer que sea más fácil de suspender ese AH que se derivatice a sal de amonio;
- 25 – sulfatación mediante la adición de un exceso de SO₃-piridina, SO₃-trimetilamina u otros agentes equivalentes conocidos por personas expertas en este campo;
- primera precipitación con disolvente orgánico;
- centrifugación para aislar el precipitado;
- disolución del precipitado así obtenido;
- 30 – segunda precipitación del producto "puro" y
- diálisis para eliminar disolventes y otros restos.

En los procedimientos del estado de la técnica, las etapas de "disolución del precipitado" y "segunda precipitación" se repiten varias veces para eliminar al menos los excesos de disolvente y reactivos.

35 Es evidente que el procedimiento de acuerdo con la presente invención difiere considerablemente de los procedimientos del estado de la técnica, en particular en algunas de las etapas, esquematizadas a continuación, teniendo en cuenta, en primer lugar, que el material de partida en el caso del procedimiento de acuerdo con la presente invención es exclusivamente sal de sodio, ya sea el caso del AH como tal, o uno de los derivados indicados anteriormente. Si el polímero inicial es AH, tendrá un MW inicial promedio que oscila entre 100.000 y 250.000 Da, en particular entre 180.000 y 230.000 Da o entre 500.000 y 750.000 Da, en particular entre 700.000 y 730.000 Da. En el estado de la técnica, aunque la sal de sodio es una posibilidad tenida en consideración, independientemente del MW utilizado, el material de partida generalmente es sal de tetrabutilamonio, es decir sal de ácido TBA (tetrabutilamonio) hialurónico, que debe sintetizarse previamente; esto implica una etapa de producción preliminar adicional.

45 Las etapas que caracterizan el procedimiento de acuerdo con la presente invención son las etapas a), c)-e) del siguiente procedimiento:

50 a) solubilización de AH-Na (o derivado de AH-Na), en un disolvente aprótico con la adición de un ácido sulfónico orgánico, preferiblemente ácido metanosulfónico; esta adición permite obtener una solución límpida real que, a 600 nm, tiene un valor de absorbancia $\leq 0,04$ UA, que es un valor de referencia patrón para definir la limpidez; la solubilización total del AH asegura la sulfatación cuantitativa del polímero, en el grado predeterminado. Este uso de ácido metanosulfónico u otros ácidos sulfónicos orgánicos, nunca se ha descrito para estos fines en el estado de la técnica;

- 55 – el disolvente aprótico se selecciona preferiblemente entre DMSO (dimetilsulfóxido), DMF (N,N-dimetilformamida) o NMP (N-metilpirrolidona), y es aún más preferiblemente DMSO;
- la cantidad de ácido metanosulfónico a utilizar varía de 4,5 a 5,5 moles/mol equivalentes, y es preferiblemente igual a 5 moles/mol equivalentes con respecto a la unidad repetitiva de disacárido de AH. Los valores más bajos no permiten la solubilización, mientras que los valores más altos permiten la solubilización pero, en la fase de precipitación final, se ha observado una caída drástica en el rendimiento (<60 %) (como se indica en la Tabla 1);

la solubilización se lleva a cabo durante un tiempo que varía de 20 a 28 horas, a una temperatura T que varía de 20 a 30 °C, preferiblemente durante 24 horas a 25 °C, hasta que se obtiene una solución límpida;

65 b) sulfatación: esta etapa se lleva a cabo de acuerdo con la técnica conocida, mediante la adición de un exceso

de SO₃-piridina, SO₃-trimetilamina u otros agentes conocidos por personas expertas en este campo, preferiblemente SO₃-piridina (complejo de piridina y trióxido de azufre);

c) primera precipitación en etanol, preferiblemente etanol absoluto, hasta que se obtenga un precipitado gomoso marrón;

5 d) solubilización del precipitado así obtenido en agua (técnica conocida), en presencia de NaCl y el mismo disolvente aprótico en el que se ha solubilizado la materia prima, con un ajuste de pH dentro de un intervalo de 3 a 4, preferiblemente de 3,3 a 3,5. La cantidad de NaCl añadido debe estar en exceso absoluto para garantizar que todos los grupos sulfato residuales estén en forma de sal de sodio (ver Tabla 2);

10 e) segunda precipitación con etanol, preferiblemente etanol absoluto, mediante el cual se obtiene un precipitado extremadamente fino y puro, con una sola etapa, que no requiere diálisis, y que puede pasar directamente a las etapas posteriores;

f) lavados repetidos y secado al vacío del producto así obtenido.

15 Los lavados proporcionados en la etapa f) del procedimiento de acuerdo con la presente invención pueden efectuarse en el producto obtenido en la etapa e) como sigue:

f) eliminación del disolvente lavando el precipitado tres veces con etanol/agua en una proporción de 8:2;

20 f") eliminación de los restos de piridina mediante lavados consecutivos con etanol/NaOH 0,1 M 8:2; etanol/HCl 8:2; etanol/agua 8:2 y finalmente con etanol absoluto. El lavado con etanol/NaOH 0,1 M 8:2 es particularmente importante en esta etapa ya que permite la eliminación casi total de la piridina, dando al polvo resultante una pureza extremadamente alta, siempre >98 % (la Tabla 3 indica las pruebas efectuadas en este sentido).

El secado al vacío se lleva a cabo de acuerdo con la técnica conocida.

25 El procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por rendimientos extremadamente altos: el procedimiento, de hecho, permite obtener rendimientos $\geq 98\%$; la combinación de etapas que caracterizan el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite que todo el AH utilizado se sulfate de forma prácticamente cuantitativa. Este resultado es absolutamente sorprendente ya que los procedimientos conocidos según el estado de la técnica describen rendimientos mucho más bajos:

30 Patente EP 889055, Shiseido, Ejemplo 2: se obtienen 1,2 g de AHS a partir de 2 g de AH inicial (rendimiento 50 %; grado de sulfatación calculado del 20 %);
Patente EP 702699, Fidia, Ejemplo 1: rendimiento del 62 % aproximadamente para el grado de sulfatación de 3;
35 Documento WO 2010130446, Fidia, Ejemplo 2: rendimiento descrito dentro del intervalo del 86-88 % para el AHS de grado 3 (se obtienen 9,7 g de AHS 3 a partir de 10 g de AH-TBA).

40 El procedimiento según la presente invención también se caracteriza por la producción de un producto que tiene una pureza superior al 98 %: el producto sulfatado obtenido es un polvo extremadamente fino, con restos insignificantes de piridina y disolvente orgánico, que en consecuencia no requiere una etapa de diálisis, a diferencia de lo que se conoce en el estado de la técnica:

45 Patente EP 889055, Shiseido, Ejemplo 2: diálisis "durante la noche" contra 3 litros de agua destilada, que se sustituirá 3 veces;
Patente EP 702699, Ejemplo 1 y documento WO 2010/130446, Ejemplo 2: duración de la diálisis no especificada, pero realizada hasta la eliminación de los restos de reacción.

50 La eliminación de la etapa de diálisis es extremadamente importante en términos industriales, ya que representa un ahorro significativo (menos etapas, tiempos de espera más cortos, menos eliminación de desechos). La ausencia de cualquier etapa de diálisis es, en consecuencia, un aspecto esencial del procedimiento de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, la producción de un producto de alta pureza es importante no solo porque permite eliminar una etapa industrial costosa, sino también, en un sentido absoluto, porque un producto final que puede usarse como tal proveniente del procedimiento de producción, sin cualquier otra precaución con respecto al grado de pureza, simplifica enormemente el trabajo de un formulador técnico; al usar AH sulfatado (o derivados de AH) de acuerdo con la presente invención, de hecho, puede prepararse cualquier forma farmacéutica sin ningún tipo de riesgo
55 relacionado con impurezas, normalmente presentes al final de una síntesis química.

60 Debe recordarse, de hecho, que para algunas formas farmacéuticas, son suficientes los productos que tienen un alto grado de pureza, pero no son absolutos, es decir, el denominado "grado cosmético"; por lo general, se trata de formas farmacéuticas que se utilizan, por ejemplo, en pieles no dañadas, en alimentos funcionales o en complementos alimenticios, etc.

Otras formas farmacéuticas, por otro lado, requieren productos con un "grado farmacéutico" de pureza: es decir, los productos deben ser extremadamente puros, para permitir que también se usen en formas farmacéuticas específicas, como, por ejemplo, inyecciones (intradérmicas, intramusculares, intravenosas, intraoculares) o en regiones particulares (piel dañada por úlceras, infecciones por herpes, trastornos vasculares, mucosa, etc.).

65

Estos resultados técnicos particularmente ventajosos se deben a la combinación de varias características esenciales del procedimiento de acuerdo con la presente invención y específicamente:

- 5 – a la presencia de un ácido sulfónico orgánico, preferiblemente ácido metanosulfónico, en la etapa de solubilización de AH-Na (o derivado de AH-Na) en el disolvente aprótico preseleccionado;
- a la solubilización del precipitado en agua, en presencia de un exceso de NaCl y disolvente aprótico utilizado inicialmente; y
- al ajuste del pH dentro de un intervalo de valores muy estrecho, antes de la precipitación final con etanol.
- 10 Los valores de pH son fundamentales: los datos indicados en la Tabla 2 a continuación muestran que incluso variaciones mínimas con respecto al intervalo reivindicado, dan lugar a la formación de un precipitado "fangoso" que inevitablemente requiere varias etapas de diálisis antes de poder lavarse y secarse con técnicas convencionales.
- 15 Este no es un ajuste descrito o previsto sobre la base de la técnica conocida, ya que la precipitación se describe en la técnica anterior a pH neutro (patente EP 8890559, documento WO 2010/130446) o definitivamente básico (patente EP 702699). Por consiguiente, era completamente impredecible que la estabilización a valores de pH típicamente ácidos pudiera dar lugar a los sorprendentes resultados del procedimiento de acuerdo con la presente invención.
- 20 El procedimiento de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, no solo mejora notablemente el rendimiento del procedimiento y la pureza del producto, sino que también permite eliminar algunas etapas del procedimiento con respecto a los procedimientos conocidos, por lo que también lo hace industrialmente más conveniente. Estos resultados son totalmente impredecibles y sorprendentes a la vista de los contenidos de la técnica anterior.

Tabla 1: Evaluación del efecto del ácido metanosulfónico en la solubilización de AH-Na en DMSO (T 24 °C; Tiempo: 24 horas)

HA-Na 200 kDa (g)	1,00 g	1,00 g	1,00 g	1,00 g	1,00 g	1,00 g	1,00 g
DMSO (ml)	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml	55 ml
Equivalentes de ácido metanosulfónico (mol/mol) vs unidad de disacárido HA	0	0,16 ml	0,48 ml	0,64 ml	0,73 ml	0,89 ml	
Absorbancia 600 nm (*)	0	1	3	4	4,5	5,5	
Solubilización	0,65	0,41	0,15	0,09	0,04	0,01	
	Suspensión no homogénea	Suspensión no homogénea	Suspensión no homogénea	Suspensión no homogénea	Suspensión no homogénea	Solución limpia incolora	Solución limpia incolora

* Medición efectuada con un espectrofotómetro UV/Vis contra DMSO (blanco); expresa el grado de limpidez: una solución es limpia cuando tiene valores de absorbancia a 600 nm \leq 0,04 UA.

La importancia de la adición de ácido metanosulfónico es evidente. Pruebas posteriores mostraron que al usar cantidades mayores de ácido metanosulfónico (6 y 6,5 mol/equivalentes mol), se completa la solubilización de AH-Na, pero en la fase de precipitación final, hay una reducción drástica en el rendimiento, que es menor que los rendimientos de los procedimientos de acuerdo con la técnica conocida, y además, el precipitado obtenido tiene un grado de pureza inferior al 90 %.

Tabla 2: Características del precipitado en relación con la presencia de NaCl, DMSO y el ajuste del pH antes de la 2ª precipitación con etanol.

	1	2	3	4	5	6	7
AHS3 (de la primera precipitación) como en el Ejemplo 1	Precipitado gomoso marrón	Precipitado gomoso marrón	Precipitado gomoso marrón	Precipitado gomoso marrón	Precipitado gomoso marrón	Precipitado gomoso marrón	Precipitado gomoso marrón
Solubilización en:							
H ₂ O (ml)	56 ml	56 ml	32 ml	32 ml	32 ml	32 ml	32 ml
NaCl (g)	1,3 g	1,3 g	0 g	1,3 g	1,3 g	1,3 g	1,3 g
DMSO (ml)	0 ml	0 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml
pH	pH 1,9	pH 3,4	pH 3,5	pH 4,5	pH 7	pH 1,9	pH 3,5
Apariencia del precipitado (después de la segunda precipitación con etanol)	Precipitado gomoso amarillento	Mezcla lechosa	Mezcla lechosa	Precipitado gomoso amarillento	Precipitado gomoso amarillento	Precipitado gomoso blanco	Polvo muy fino de color blanco amarillento

El pH de las soluciones indicadas en las columnas 2-5 y 7 se ajustó con NaOH 3 M. El pH indicado en las columnas 1 y 6 es el obtenido en el entorno de reacción.

La combinación de agua, disolvente orgánico y valor de pH correcto produce el efecto deseado: solo cuando las condiciones de presencia de DMSO, NaCl y ajuste de pH se verifican de acuerdo con el objeto de la presente invención, se obtiene el precipitado en forma de un polvo fino y puro, con altos rendimientos.

Tabla 3: Influencia de la mezcla de etanol/NaOH en las etapas de lavado

AHS3 después de la 2ª precipitación (Ejemplo 1)	Polvo muy fino de color blanco amarillento	Polvo muy fino de color blanco amarillento	Polvo muy fino de color blanco amarillento	Polvo muy fino de color blanco amarillento
Lavados (nr.):				
Etanol (agua (8:2))	nr. 6 x 15'	nr. 6 x 15'	nr. 3 x 15'	nr. 3 x 15'
Etanol/NaOH 0,1 M (8:2)	0	0	nr. 4 x 15'	nr. 3 x 15'
Etanol/HCl 0,1 M (8:2)	nr. 2 x 15'	0	0	nr. 2 x 15'
Etanol/Agua (8:2)	nr. 2 x 15'	nr. 4 x 15'	nr. 4 x 15'	nr. 2 x 15'
Etanol	nr. 2 x 15'	nr. 2 x 15'	nr. 2 x 15'	nr. 2 x 15'
Contenido de piridina después del secado (% p/p)	0,47 %	0,56 %	0,016 %	0,014 %

La adición de la mezcla de etanol/NaOH 0,1 M 8:2 en las etapas de lavado permite que el contenido residual de piridina en el producto final se reduzca drásticamente ($\leq 0,02$ % p/p), aún más cuando se usa antes de la mezcla de etanol/HCl 0,1 M. Esta última, por otro lado, si se usa sola, no permite una eliminación adecuada de la piridina.

En los siguientes ejemplos, como en las tablas anteriores, el grado de sulfatación se determinó mediante análisis ICP-OES (análisis de espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma), conocido por personas expertas en este campo; el DS molar se calcula con esta técnica, que expresa la cantidad de S unida a AH y, por lo tanto, el grado de sustitución por unidad de disacárido (patrón de azufre para ICP "18021 Sigma-Aldrich TraceCERT®). El MW promedio por unidad repetitiva de la muestra de AHS se calcula a partir del DS molar y, posteriormente, el contenido de moles que, en comparación con los del AH inicial, expresan el porcentaje de rendimiento (Macromolecules, 2005, 38, 4647-4654).

Las impurezas (piridina y DMSO) se analizaron mediante cromatografía de gases con inyección directa efectuada en el producto final, calculando su relación total (% en p/p) con respecto al AHS producido, de acuerdo con la técnica conocida (Farmacopea Europea 8.0, Párr. 5.4: Disolvente residual).

Como ya se ha mencionado, el ácido hialurónico sulfatado (o sus derivados) obtenido según la presente invención no solo es económicamente conveniente desde un punto de vista industrial, sino que, sobre todo, tiene un alto grado de pureza; esto significa que puede usarse como tal o combinarse adecuadamente con otras sustancias en la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas a cualquier vía de administración, desde cutánea a intravenosa, en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, en las que el papel terapéutico del AH sulfatado ha sido cuidadosamente examinado por estudios científicos y, por lo tanto, es bien conocido en el estado de la técnica.

A este respecto, debe recordarse que el AH sulfatado puede usarse en:

- enfermedades relacionadas con defectos del sistema inmunitario;
- enfermedades relacionadas con un aumento o activación de citoquinas inflamatorias, como, por ejemplo, TNF, que pueden surgir tanto sistémicamente (osteoartritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad vascular, vasculitis, trombosis venosa profunda, esclerodermia, etc.) y también en la piel (dermatitis no específica, dermatitis atópica, dermatitis seborreica, urticaria, fotodermatitis, eczema, irritaciones de la piel y/o mucosas, estomatitis aftosa, fisuras, etc.) o regiones particulares (cistitis intersticial, etc.);
- enfermedades relacionadas con manifestaciones dérmico-cutáneas de daño al endotelio vascular, como traumas, hemorragia vascular superficial y/o profunda, edema, hematoma, desbridamiento de coágulos (efecto fibrinolítico), etc.;
- trastornos autoinmunes, que comprenden artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y todas las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, asma, diabetes mellitus, esclerosis múltiple y enfermedades desmielinizantes, astrocitosis, astrogliosis, rechazo de órganos después del trasplante, etc. Además, las enfermedades autoinmunes con manifestaciones cutáneas incluyen psoriasis, lupus eritematoso y/o discoide, dermatitis, eccema, etc.
- enfermedades virales como infecciones por VIH, *herpes simple labial o genital*, *citomegalovirus*, virus de estomatitis vesicular. Para estas enfermedades, el AHS sulfatado de grado 1 o 3 ha demostrado ser particularmente activo. Sulfatado

El AH también tiene propiedades hidratantes extremadamente altas, gracias a los grupos sulfato que le permiten atravesar la barrera cutánea con mucha más facilidad que la molécula inicial y acumularse en las capas superficiales de la piel. Estas propiedades se pueden aplicar en cualquier forma de enfermedad de la piel caracterizada por sequedad, liquenificación, aspereza, picazón, enrojecimiento, inflamación y descamación superficial.

Gracias a su notable penetración en la piel, el AH sulfatado actúa como un excelente promotor de la absorción dérmica de moléculas que, por sí solas, no pueden atravesar la barrera cutánea. De esta forma, las moléculas pueden alcanzar la dermis y ejercer su efecto. Estas moléculas pueden ser medicamentos (por ejemplo, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, quimioterapéuticos para uso tópico, antibióticos, antivirales, anticoagulantes y/o fibrinolíticos, anestésicos locales, anticolinérgicos, vasodilatadores, vasoconstrictores), hormonas, proteínas, enzimas (por ejemplo, colagenasa, hialuronidasa, proteasa), extractos de plantas, otros polímeros (por ejemplo, sulfato de condroitina, derivados químicamente modificados del ácido hialurónico).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden ácido hialurónico sulfatado o derivados de AH sulfatados, y/o sus mezclas, con un grado de sulfatación que varía de 1 a 3 y con un grado de pureza superior al 98 %, que se puede obtener con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, en presencia de aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados, pueden usarse para su administración tópica (en forma de cremas, geles, ungüentos, pomadas, películas, lociones, enlucidos medicinales y transdérmicos, etc.), administración oral (en forma de cápsulas, comprimidos, polvos, granulados, bebidas, alimentos funcionales, etc.), administración inyectable (intradérmica, intraarticular, intravenosa, intramuscular, etc.), administración transmucosa (rectal, vaginal, bucal), por inhalación y administración locorregional (por ejemplo, intraocular, intravesical).

La forma farmacéutica se selecciona obviamente en función del uso terapéutico y el sitio de aplicación; independientemente de la forma farmacéutica seleccionada, dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender además sustancias biológica y/o farmacológicamente activas, tanto sintéticas como de origen natural, tales como fármacos, extractos vegetales, proteínas, péptidos, vitaminas, aminoácidos, glicosaminoglicanos, polímeros de un origen natural, semisintético o sintético; la última categoría también incluye los derivados del ácido hialurónico obtenidos por esterificación con alcohol bencílico (HYAFF®), por amidación con hexadecil amida (HYADD®, grado de amidación 5 %), por esterificación interna (ACP®, grado de esterificación 5 %), etc.

Entre las posibles asociaciones, se pueden mencionar las siguientes:

AHS de grado 1 o 2 según la presente invención asociado con ácido hialurónico esterificado con alcohol bencílico, con un porcentaje de esterificación que varía del 50 al 100 %, preferiblemente del 50 al 75 %, en el tratamiento de la cistitis intersticial;

AHS de grado 1 o 3 asociado con extractos naturales (Boswellia), vitaminas y urea en el tratamiento de la

psoriasis y la dermatitis seborreica.

AHS de grado 1 o 2 asociado con sulfato de condroitina en el tratamiento locorregional de enfermedades del sistema urinario;

5 AHS de grado 1 o 2 y/o con sulfato de condroitina y/o AH para el tratamiento intraarticular del daño del cartílago (por envejecimiento, trauma, osteoartritis).

La presente invención se ilustra con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

10 **Ejemplo 1:** sulfatación de la sal de sodio del ácido hialurónico (HANa) con un MW de 200 kDa en DMSO - grado de sulfatación 3.

15 1) Se suspendieron 1,00 gramos de HANa en 55 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadieron 0,8 ml de ácido metanosulfónico puro a esta suspensión y la mezcla se mezcló durante 24 horas a 25 °C; se obtuvo así una solución límpida incolora (Absorbancia a 600 nm = 0,02 UA). Se añadieron 5,0 g del complejo de trióxido de azufre y piridina (piridina SO₃) a esta solución, dejando la mezcla bajo agitación durante otras 24 horas a 25 °C.

20 2) A continuación se añadieron 90 ml de etanol a la solución, obteniendo un precipitado gomoso de color marrón. El producto así obtenido se separó por filtración, se solubilizó en 32 ml de agua y se añadieron 1,3 g de NaCl. Finalmente se añadieron 24 ml de DMSO y el pH se ajustó a un valor igual a 3,4 con NaOH 3 M. El derivado así obtenido se precipitó en forma de un polvo muy fino, mediante la adición de 90 ml de etanol. El producto así obtenido se separó por filtración, se lavó 3 veces con una solución de etanol/agua (8/2). Para eliminar la piridina residual, el polvo se lavó 3 veces con una solución de etanol/NaOH 0,1 M (8:2), dos veces con una solución de etanol/HCl 0,1 M (8:2), dos veces con una solución de etanol/agua (8:2) y finalmente, dos veces con etanol puro. El polvo blanco amarillento así obtenido se secó en una bomba de vacío a 40 °C durante 24 horas.

25 Se obtuvieron 1,70 g de un polvo blanco amarillento muy fino, que corresponde a un rendimiento del 98 %, con una pureza del 99,4 %.

30 **Ejemplo 2:** Sulfatación de sal sódica de ácido hialurónico (HANa) con un MW de 200 kDa en DMSO - grado de sulfatación 2.

Se suspendieron 1,00 gramos de HANa en 55 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadieron 0,8 ml de ácido metanosulfónico puro a esta suspensión y la mezcla se mezcló durante 20 horas a 25 °C; se obtuvo así una solución límpida incolora (Absorbancia a 600 nm = 0,02 UA). Se añadieron 4,0 g del complejo trióxido de azufre y piridina (piridina SO₃) a esta solución, dejando la mezcla en agitación durante otras 22 horas a 23 °C.

35 A continuación se realizó el mismo procedimiento de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1, punto 2. Se obtuvieron 1,51 g de un polvo blanco amarillento muy fino, que corresponde a un rendimiento del 98 %, con una pureza del 99,2 %.

40 **Ejemplo 3:** Sulfatación de sal sódica de ácido hialurónico (HANa) con un MW de 200 kDa en DMSO - grado de sulfatación 1.

45 Se suspendieron 1,00 gramos de HANa en 55 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadieron 0,8 ml de ácido metanosulfónico puro a esta suspensión y la mezcla se mezcló durante 26 horas a 26 °C; se obtuvo así una solución límpida incolora (Absorbancia a 600 nm = 0,02 UA). Se añadieron 2,4 g del complejo de trióxido de azufre y piridina (piridina SO₃) a esta solución, dejando la mezcla bajo agitación durante 27 horas más a 27 °C.

50 A continuación se realizó el mismo procedimiento de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1, punto 2. Se obtuvieron 1,26 g de un polvo blanco muy fino, que corresponde a un rendimiento del 99 %, con una pureza del 99,5 %.

Ejemplo 4: Sulfatación de sal sódica de ácido hialurónico (HANa) con un MW de 700 kDa en DMSO - grado de sulfatación 3.

55 Se suspendieron 1,00 gramos de HANa en 55 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadieron 0,8 ml de ácido metanosulfónico puro a esta suspensión y la mezcla se mezcló durante 20 horas a 28 °C; se obtuvo así una solución límpida incolora (Absorbancia a 600 nm = 0,02 UA). Se añadieron 5,0 g del complejo trióxido de azufre y piridina (piridina SO₃) a esta solución, dejando la mezcla bajo agitación durante 1,5 horas más a 29 °C.

60 A continuación se realizó el mismo procedimiento de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1, punto 2. Se obtuvieron 1,75 g de un polvo blanco amarillento muy fino, que corresponde a un rendimiento del 98 %, con una pureza del 99,1 %.

Ejemplo 5: Sulfatación de sal sódica de ácido hialurónico (HANa) con un MW de 200 kDa en NMP - grado de sulfatación 3.

65 Se suspendieron 1,00 gramos de HANa en 55 ml de N-metil-pirrolidona (NMP). Se añadieron 0,8 ml de ácido

metanosulfónico puro a esta suspensión y la mezcla se mezcló durante 23 horas a 25 °C; se obtuvo así una solución límpida incolora (Absorbancia a 600 nm = 0,02 UA). Se añadieron 5,0 g del complejo trióxido de azufre y piridina (piridina SO₃) a esta solución, dejando la mezcla en agitación durante 20 horas más a 24 °C.

- 5 A continuación se realizó el mismo procedimiento de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1, punto 2. Se obtuvieron 1,67 g de un polvo blanco amarillento muy fino, que corresponde a un rendimiento del 98 %, con una pureza del 98,9 %.

- 10 **Ejemplo 6:** Sulfatación de sal sódica de ácido hialurónico (AH-Na) con un MW de 200 kDa en N,N-dimetilformamida (DMF) - grado de sulfatación 3.

- 15 Se suspendieron 1,00 gramos de HANA en 55 ml de N,N-dimetilformamida (DMF). Se añadieron 0,8 ml de ácido metanosulfónico puro a esta suspensión y la mezcla se mezcló durante 25 horas a 22 °C; se obtuvo así una solución límpida incolora (Absorbancia a 600 nm = 0,02 UA). Se añadieron 5,0 g del complejo trióxido de azufre y piridina (piridina SO₃) a esta solución, dejando la mezcla en agitación durante otras 25 horas a 22 °C.

- 20 A continuación se realizó el mismo procedimiento de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1, punto 2. Se obtuvieron 1,73 g de un polvo blanco amarillento muy fino, que corresponde a un rendimiento del 98 %, con una pureza del 99,1 %.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento mejorado de producción de ácido hialurónico sulfatado (AH), derivados de AH sulfatados y/o sus mezclas, que tienen una alta pureza y un grado de sulfatación que varía de 1 a 3, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 10 a) solubilización de AH-Na o derivado de AH-Na, en un disolvente aprótico preferiblemente seleccionado entre dimetilsulfóxido, N,N-dimetilformamida o N-metilpirrolidona, más preferiblemente dimetilsulfóxido, en presencia de un ácido sulfónico orgánico en una cantidad que varía de 4,5 a 5,5 moles/mol equivalentes con respecto a la unidad repetitiva de disacárido de AH o derivado de AH;
- 15 b) sulfatación de la solución obtenida al final de la etapa a) mediante la adición de un exceso de SO₃-piridina, SO₃-trimetilamina u otros agentes sulfatantes, preferiblemente de SO₃-piridina;
- c) precipitación en etanol, preferiblemente etanol absoluto, para obtener un precipitado;
- d) solubilización del precipitado así obtenido en una mezcla de agua y el disolvente aprótico utilizado en la etapa a), en presencia de un exceso de NaCl, calculándose dicho exceso con respecto a los grupos sulfato residuales, con un ajuste de pH dentro de un intervalo de 3 a 4;
- e) precipitación adicional con etanol, preferiblemente etanol absoluto, para obtener un polvo;
- f) lavados del polvo procedente de la etapa e) y secado al vacío del producto así obtenido.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los lavados de la etapa f) son los siguientes:
- f) eliminación del disolvente lavando el precipitado tres veces con etanol/agua en una proporción de 8:2;
- f") eliminación de los restos de piridina mediante lavados sucesivos con etanol/NaOH 0,1 M 8:2; etanol/HCl 8:2; etanol/agua 8:2 y finalmente con etanol absoluto.
- 25 3. El procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de solubilización a) se lleva a cabo durante un tiempo que varía de 20 a 28 horas, a una temperatura T que varía de 20 a 30 °C, preferiblemente durante 24 horas a 25 °C.
- 30 4. El procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de solubilización a) se lleva a cabo en presencia de un ácido sulfónico orgánico que es ácido metanosulfónico.
5. El procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa d), el pH se ajusta dentro de un intervalo de 3,3 a 3,5.
- 35 6. El procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido hialurónico del AH-Na usado en la etapa a) tiene un peso molecular promedio inicial entre 100.000 y 250.000 Da, preferiblemente entre 180.000 y 230.000 Da, o entre 500.000 y 750.000 Da, preferiblemente de 700.000 a 730.000 Da.
- 40 7. El procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado de AH del derivado de AH-Na utilizado en la etapa a) se selecciona entre
- 45 - amidas de AH con aminas de las series alifática, arilalifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación que varía del 0,1 al 50 %;
- ésteres de AH con alcoholes de las series alifática, arilalifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de esterificación que varía según el tipo y la longitud de la cadena del alcohol seleccionado, preferiblemente entre el 50 y el 100 %;
- 50 - ésteres internos de AH con un porcentaje de esterificación no superior al 20 %, preferiblemente entre el 0,05 y el 10 %;
- el porcentaje restante de AH, no sometido a amidación o no esterificado, respectivamente, se salifica con bases orgánicas y/o inorgánicas.