

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 013**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

C08L 5/00 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2016** **PCT/EP2016/082783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017** **WO17114867**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2016** **E 16822477 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 3397651**

54 Título: **Reticulante de carbohidratos**

30 Prioridad:

29.12.2015 EP 15202944

31.05.2016 EP 16172254

31.05.2016 EP 16172225

31.05.2016 EP 16172241

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2021

73 Titular/es:

GALDERMA S.A. (100.0%)

Zugerstrasse 8

6330 Cham, CH

72 Inventor/es:

OLSSON, JOHAN;

HARRIS, CRAIG STEVEN;

MOJARRADI, HOTAN;

GERFAUD, THIBAUT;

TOMAS, LOÏC y

BOITEAU, JEAN-GUY

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 810 013 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

Reticulante de carbohidratos

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se relaciona con el campo de los hidrogeles que contienen polisacáridos reticulados y el uso de tales hidrogeles en aplicaciones médicas y/o cosméticas. Más específicamente, la presente invención se refiere a hidrogeles hechos de glucosaminoglicanos reticulados, particularmente ácido hialurónico reticulado, condroitina o sulfato de condroitina.

Antecedentes de la invención

15 Los geles absorbentes de agua, o hidrogeles, son ampliamente utilizados en el campo biomédico. Generalmente se preparan mediante reticulación química de polímeros hasta redes infinitas. Mientras que muchos polisacáridos absorben agua hasta que se disuelven completamente, los geles reticulados de los mismos polisacáridos generalmente pueden absorber una cierta cantidad de agua hasta que se saturan, es decir, tienen una capacidad finita de retención de líquido, o grado de hinchamiento.

20 El ácido hialurónico, la condroitina y el sulfato de condroitina son polímeros biocompatibles bien conocidos. Son polisacáridos naturales que pertenecen al grupo de los glucosaminoglicanos (GAG). Todos los GAG son cadenas de heteropolisacáridos con carga negativa, los cuales tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua.

25 El ácido hialurónico (AH) es uno de los polímeros biocompatibles más ampliamente utilizados para uso médico y cosmético. El AH es un polisacárido natural que pertenece al grupo de los glucosaminoglicanos (GAG). El ácido hialurónico, y los productos derivados del ácido hialurónico, se usan ampliamente en los campos biomédico y cosmético, por ejemplo, durante la cirugía en condiciones de alta viscosidad y como relleno dérmico.

30 El sulfato de condroitina (SC) es un GAG muy abundante que se encuentra en los tejidos conectivos de los mamíferos donde, junto con otros GAG sulfatados, se une a las proteínas como parte de los proteoglicanos. Se ha demostrado previamente que los hidrogeles, que contienen SC, se pueden usar con éxito en aplicaciones biomédicas debido a su parecido con la matriz extracelular natural (Lauder, RM, Complement Ther Med 17: 56-62, 2009). El sulfato de condroitina además se usa en el tratamiento de la osteoartritis, por ejemplo, como un suplemento dietético.

35 La reticulación de los glucosaminoglicanos prolonga la duración de los polímeros degradables que conforman la red, lo cual es útil en posibles aplicaciones. Sin embargo, la reticulación además puede reducir las propiedades originales de los glucosaminoglicanos. Por lo tanto, normalmente, se desea mantener un bajo grado de modificación mediante una reticulación eficiente para conservar las propiedades originales y los efectos del glucosaminoglicano mismo.

Resumen de la invención

40 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un hidrogel que tenga un glucosaminoglicano (GAG) como un polímero hinchable.

45 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un método para la reticulación de moléculas de GAG con un efecto reducido sobre las propiedades originales de las moléculas de GAG.

50 Además, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para la preparación de hidrogeles de moléculas de GAG mediante rutas suaves y eficientes.

55 Para estos y otros objetivos que serán evidentes a partir de esta descripción, la presente invención proporciona, de acuerdo con un primer aspecto, un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglicano como un polímero hinchable, en donde las moléculas de glucosaminoglicano están reticuladas covalentemente a través de reticulaciones que consisten, esencialmente, en un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos, en donde las moléculas de glucosaminoglicano reticulado están libres, o esencialmente libres, de estructuras sintéticas o enlazadores no carbohidratos.

60 Con referencia a los procesos inventivos de preparación de productos de hidrogel descritos en el presente documento, el término "reticulante" se refiere a una molécula que tiene dos o más grupos funcionales, particularmente grupos funcionales nucleófilos, unidos a un grupo separador no reactivo, particularmente un di, tri, tetra u oligosacárido. Cada uno de los dos o más grupos funcionales es capaz de reaccionar con grupos carboxílicos ácidos en las moléculas de GAG para formar enlaces covalentes estables. Preferiblemente, el reticulante consiste de dos o más grupos funcionales y el separador.

Con referencia a los productos de hidrogel de la invención descritos en el presente documento, el término "reticulado" se refiere a la porción, o residuo, del reticulante mediante el cual las moléculas de GAG se unen covalentemente después de la reticulación. El reticulado consiste típicamente en i) el grupo separador y ii) los grupos de unión formados tras la reacción de los grupos funcionales del reticulante con los grupos carboxílicos ácidos en el GAG. El grupo separador puede estar compuesto por un tetrasacárido de ácido hialurónico, un hexasacárido de ácido hialurónico, trehalosa, lactosa, maltosa, sacarosa, celobiosa o un residuo de rafinosa.

La reticulación mediante reticulantes que comprenden un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos proporciona un producto de hidrogel basado completamente en estructuras de tipo carbohidrato o derivados de los mismos, lo cual minimiza la perturbación de la reticulación sobre las propiedades originales de los glucosaminoglicanos. El di, tri, tetra u oligosacárido está, preferiblemente, bien definido en términos de estructura y peso molecular. Preferiblemente, el separador se selecciona a partir de una estructura específica de di, tri, tetra u oligosacárido. Preferiblemente, el di, tri, tetra u oligosacárido es monodisperso o tiene una distribución restringida de peso molecular. El uso de reticulantes bien definidos basados en di, tri, tetra u oligosacáridos junto con una reacción de condensación altamente eficiente permite que el producto se ensamble de manera controlada. El reticulante, en sí mismo, además puede contribuir a mantener o aumentar las propiedades del hidrogel, por ejemplo, cuando se reticula con una estructura que se correlaciona con el ácido hialurónico (por ejemplo, un tetrasacárido de ácido diamino hialurónico) o cuando se reticula con una estructura con altas propiedades de retención de agua (por ejemplo, trehalosa).

Los GAG pueden ser, por ejemplo, glucosaminoglucanos sulfatados o no sulfatados, como hialuronano, sulfato de condroitina, sulfato de heparán, heparosano, heparina, sulfato de dermatán y sulfato de queratán. En algunas modalidades, el GAG es ácido hialurónico, condroitina o sulfato de condroitina. En una modalidad preferida, el GAG es ácido hialurónico.

En modalidades preferidas, el GAG es un GAG natural. El GAG usado en relación con la invención es, preferiblemente, un GAG natural. El GAG se usa preferiblemente en su estado natural. Es decir, la estructura química del GAG preferiblemente no se ha alterado, o modificado, mediante la adición de grupos funcionales o similares. Se prefiere usar el GAG en su estado natural porque esto proporcionará una estructura reticulada que se parecerá más a las moléculas naturales, las cuales conservan las propiedades naturales y los efectos del propio GAG, y puede minimizar la respuesta inmune cuando el GAG reticulado se introduce en el cuerpo.

Las moléculas de GAG reticuladas covalentemente consisten preferiblemente, o consisten esencialmente, en estructuras de tipo carbohidrato o derivados de los mismos. Esto significa que las moléculas de GAG reticuladas están preferiblemente libres, o esencialmente libres de estructuras, o enlazantes sintéticos, no carbohidratos. Esto se puede lograr mediante el uso de un GAG en su estado natural junto con un reticulante que consista, o consista esencialmente, en estructuras de tipo carbohidrato o derivados de las mismas. Los grupos funcionales del reticulante se unen, de manera covalente, directamente a los grupos carboxilo del GAG. Los reticulados del GAG covalentemente reticulado, por lo tanto, consisten preferiblemente, o consisten esencialmente, en grupos separadores de di, tri, tetra y oligosacáridos.

La presente invención proporciona, de acuerdo con un segundo aspecto, un proceso de preparación de un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglicano reticulado, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una solución de moléculas de glucosaminoglicano;
- (b) activar los grupos carboxilo en las moléculas de glucosaminoglicano con un agente de acoplamiento para formar moléculas de glucosaminoglicano activadas;
- (c) reticular las moléculas de glucosaminoglicano activadas a través de sus grupos carboxilo activados usando un reticulante funcional, di o multinucleófilo, que comprende un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos para obtener moléculas de glucosaminoglicano reticulado.

La presente invención implica la reticulación de moléculas de glucosaminoglicano por enlaces covalentes, preferiblemente enlaces amida, usando típicamente un agente activador para los grupos carboxilo en la cadena principal de la molécula de glucosaminoglicano y un reticulante funcional di o multinucleófilo que comprende un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos. La reticulación, de acuerdo con el método de la invención, se puede lograr mediante rutas suaves y eficientes que dan como resultado altos rendimientos con una degradación mínima de las moléculas de GAG.

El reticulante funcional di o multinucleófilo contiene un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos, el cual permanece en los reticulados entre las moléculas de GAG. Los di, tri, tetra y oligosacáridos funcionales di o multinucleófilos comprenden, al menos, dos grupos funcionales nucleófilos unidos a los mismos. Los, al menos, dos grupos funcionales nucleófilos están separados preferiblemente por el grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos.

El reticulante funcional di o multinucleófilo comprende dos o más grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos carboxilos funcionales del GAG, dando como resultado la formación de enlaces covalentes, preferiblemente

enlaces amida. Los grupos funcionales nucleófilos son preferiblemente capaces de reaccionar con los grupos carboxilo en la molécula de glucosaminoglucano para formar enlaces amida. En algunas modalidades, los grupos funcionales nucleófilos de los di, tri, tetra y oligosacáridos se seleccionan del grupo que consiste en una amina primaria, hidracina, hidracida, carbazato, semi-carbazida, tiosemicarbazida, tiocarbazato y aminoxi.

Los di, tri, tetra y oligosacáridos funcionales di o multinucleófilos pueden derivarse de polisacáridos funcionales nucleófilos, tales como la quitobiosa derivada de la quitina. Los di, tri, tetra y oligosacáridos di o multinucleófilos funcionales además pueden ser di, tri, tetra y oligosacáridos los cuales han sido modificado mediante la introducción de dos o más grupos funcionales nucleófilos.

Un grupo preferido de reticulante funcional di o multinucleófilo incluye aminas primarias homo- o heterobifuncionales, hidracinas, hidracidas, carbazatos, semi-carbazidas, tiosemicarbazidas, tiocarbazatos y aminoxi.

En ciertas modalidades, la etapa de activación (b) y la etapa de reticulación (c) ocurren simultáneamente. En otras modalidades, la etapa de activación (b) ocurre antes y por separado de la etapa de reticulación (c).

En una modalidad preferida, la etapa (c) comprende además proporcionar partículas de la molécula de GAG reticulada, que tienen un tamaño promedio en el intervalo de 0,01-5 μ m, preferiblemente 0,1-0,8 μ m.

En una modalidad preferida, el agente de acoplamiento de la etapa (b) es un reactivo de acoplamiento de péptidos. El reactivo de acoplamiento de péptidos se puede seleccionar del grupo que consiste en reactivos de acoplamientos basados en triazina, reactivos de acoplamiento de carbodiimida, reactivos de acoplamiento derivados de imidazolio, Oxyma y COMU. Un reactivo de acoplamiento de péptidos preferido es un reactivo de acoplamiento basado en triazina, que incluye el grupo que consiste en cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) y 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT), preferiblemente DMTMM. Otro reactivo de acoplamiento de péptidos preferido es un reactivo de acoplamiento de carbodiimida, preferiblemente N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) combinado con N-hidroxisuccinimida (NHS).

De acuerdo con un aspecto relacionado, la presente descripción además proporciona el uso del producto de hidrogel como medicamento, tal como en el tratamiento de trastornos de tejidos blandos. Se proporciona un método para tratamiento de un paciente que padece un trastorno de tejidos blandos mediante la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del producto de hidrogel. Además se proporciona un método para proporcionar tratamiento correctivo o estético a un paciente mediante la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del producto de hidrogel.

Otros aspectos y modalidades preferidas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y las reivindicaciones adjuntas.

En una modalidad preferida, al menos el 95 % de los enlaces entre las moléculas de glucosaminoglicanos y los reticulados son enlaces amida.

En una modalidad preferida, menos del 5 % de los enlaces entre las moléculas de glucosaminoglicanos y los reticulados son enlaces éster.

En una modalidad preferida, menos del 1 % de los enlaces entre las moléculas de glucosaminoglicanos y los reticulados son enlaces éster.

En una modalidad preferida, la reticulación de la etapa (c) proporciona enlaces amida entre moléculas de glucosaminoglicanos y reticulantes.

En una modalidad preferida, el agente de acoplamiento y el reticulante se adicionan simultáneamente al glucosaminoglicano.

En una modalidad preferida, la etapa (c) comprende además proporcionar partículas del glucosaminoglicano reticulado, que tienen un tamaño promedio en el intervalo de 0,01-5 μ m, preferiblemente 0,1-0,8 μ m.

En modalidades preferidas, el reticulante se selecciona del grupo que consiste en un tetrasacárido del ácido diamino hialurónico, un hexasacárido del ácido diamino hialurónico, diamino trehalosa, diamino lactosa, diamino maltosa, diamino sacarosa, quitobiosa o diamino rafinosa.

En una modalidad preferida, el proceso comprende además la etapa: (d) someter las moléculas de glucosaminoglicano reticulado obtenidas en la etapa (c) a un tratamiento alcalino.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona procesos ventajosos para preparar hidrogeles hechos de moléculas de glucosaminoglicano reticulado (GAG), los productos de hidrogel resultantes y sus usos. Los GAG son cadenas de heteropolisacáridos cargados negativamente que tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua. En los productos de hidrogel de acuerdo con la invención, la molécula de GAG reticulada es el polímero hinchable el cual proporciona las propiedades del gel. El proceso de preparación descrito en la presente es suave para las moléculas GAG pero proporciona una reticulación eficiente.

De este modo, la presente invención proporciona hidrogeles de moléculas de GAG mediante reticulación en medio acuosos utilizando un reticulante funcional di o multinucleófilo capaz de formar enlaces covalentes directamente con grupos carboxílicos ácidos de las moléculas de GAG mediante una reacción que implica el uso de un agente de acoplamiento.

El GAG, de acuerdo con la invención, se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina. En una modalidad preferida, la molécula de GAG es ácido hialurónico. El ácido hialurónico (AH) es uno de los polímeros biocompatibles más ampliamente utilizados para uso médico y cosmético. El AH es un polisacárido natural que pertenece al grupo de los glucosaminoglicanos (GAG). El ácido hialurónico y los productos derivados del ácido hialurónico se usan ampliamente en los campos biomédico y cosmético, por ejemplo, durante cirugías en condiciones de alta viscosidad y como relleno dérmico.

A menos que se indique lo contrario, el término "ácido hialurónico" abarca todas las variantes y combinaciones de variantes de ácido hialurónico, hialuronato o hialuronano, de diversas longitudes de cadena y estados de carga, así como con diversas modificaciones químicas. Es decir, el término además abarca las diversas sales de hialuronato del ácido hialurónico con varios contra-iones, como el hialuronato de sodio. El ácido hialurónico se puede obtener de varias fuentes de origen animal y no animal. Las fuentes de origen no animal incluyen levadura y preferiblemente bacterias. El peso molecular de una sola molécula de ácido hialurónico está típicamente en el intervalo de 0,1-10 MDa, pero son posibles otros pesos moleculares.

El término "condroitina" se refiere a GAGs que tienen una unidad repetitiva de disacárido que consiste en fracciones alternantes de ácido D-glucurónico no sulfatado y N-acetil-D-galactosamina. Para evitar dudas, el término "condroitina" no abarca ninguna forma de sulfato de condroitina.

El término "sulfato de condroitina" se refiere a los GAGs que tienen una unidad repetitiva de disacárido que consiste en fracciones alternantes de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-galactosamina. La fracción sulfato puede estar presente en varias posiciones diferentes. Las moléculas de sulfato de condroitina preferidas son condroitina-4-sulfato y condroitina-6-sulfato.

Las moléculas de condroitina se pueden obtener de diversas fuentes de origen animal y no animal. Las fuentes de origen no animal incluyen levadura y preferiblemente bacterias. El peso molecular de una sola molécula de condroitina está típicamente en el intervalo de 1-500 kDa, pero son posibles otros pesos moleculares.

El GAG reticulado comprende reticulados entre las cadenas de moléculas GAG, lo que crea una red continua de moléculas de GAG las cuales se mantiene unidas por los reticulados covalentes.

Las cadenas de moléculas de GAG se reticulan preferiblemente entre sí mediante reticulantes que comprenden un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos.

Se prefiere que los reticulantes estén unidos a las moléculas de glucosaminoglicano mediante enlaces amida.

El producto de GAG reticulado es preferiblemente biocompatible. Esto implica que no ocurre una respuesta inmune, o solo muy leve, en el individuo tratado. Es decir, no se producen efectos locales o sistémicos no deseados, o muy leves, en el individuo tratado.

El producto reticulado de acuerdo con la invención es un gel o un hidrogel. Es decir, se puede considerar como un sistema reticulado de moléculas de GAG insoluble en agua, pero sustancialmente diluido cuando se somete a un líquido, típicamente un líquido acuoso.

El gel contiene principalmente líquido por peso y puede, por ejemplo, contener 90-99,9 % de agua, pero se comporta como un sólido debido a una red tridimensional de moléculas de GAG reticuladas dentro del líquido. Debido a su importante contenido líquido, el gel es estructuralmente flexible y similar al tejido natural, lo que lo hace muy útil como matriz en la ingeniería de tejidos y para el aumento de tejidos. Además es útil para el tratamiento del trastorno de tejidos blandos y para el tratamiento correctivo o estético. Se usa preferiblemente como una formulación inyectable.

La reticulación de la molécula GAG se puede lograr mediante la activación con un agente de acoplamiento, seguido de la reacción con un agente de reticulación. La concentración de la molécula GAG y el grado de extensión de la reticulación afectan las propiedades mecánicas, por ejemplo, el módulo elástico G' , y las propiedades de estabilidad del gel. Los geles de moléculas de GAG reticuladas se pueden caracterizar en términos de "grado de modificación".

El grado de modificación de los geles de moléculas de GAG generalmente varía entre 0,01 y 15 % en moles. El grado de modificación (en % en moles) describe la cantidad de agente (s) de reticulación que está unido a la molécula GAG, es decir, la cantidad molar del agente (s) de reticulación unido en relación con la cantidad molar total de unidades repetidas de disacárido. El grado de modificación refleja hasta qué grado la molécula de GAG ha sido modificada químicamente por el agente de reticulación. Las condiciones de reacción para la activación y la reticulación y las técnicas analíticas adecuadas para determinar el grado de modificación son bien conocidas por la persona experta en la técnica, que puede ajustar fácilmente estos y otros factores relevantes y, por lo tanto, proporcionar condiciones adecuadas para obtener un grado deseable de modificación y verificar las características del producto resultante con respecto al grado de modificación.

El producto de hidrogel además puede comprender una porción de moléculas de GAG que no están reticuladas, es decir, no están unidas a la red tridimensional de moléculas de GAG reticulado. Sin embargo, se prefiere que al menos el 50 % en peso, preferiblemente al menos el 60 % en peso, más preferiblemente al menos el 70 % en peso, y lo más preferiblemente al menos el 80 % en peso, de las moléculas de GAG en una composición de gel formen parte de la red de moléculas de GAG reticulado.

La molécula de GAG reticulado está presente preferiblemente en forma de partículas de gel. Las partículas de gel tienen preferiblemente un tamaño promedio en el intervalo de 0,01-5 mm, preferiblemente 0,1-0,8 mm, tal como 0,2-0,5 mm o 0,5-0,8 mm.

El producto de hidrogel puede estar presente en una solución acuosa, pero además puede estar presente en forma seca o precipitada, por ejemplo, en etanol. El producto de hidrogel es preferiblemente inyectable.

El producto de hidrogel puede prepararse mediante un proceso que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una solución de moléculas de glucosaminoglicano;
- (b) activar los grupos carboxilo en las moléculas de glucosaminoglucano con un agente de acoplamiento para formar moléculas de glucosaminoglucano activadas;
- (c) reticular las moléculas de glucosaminoglicano activadas a través de sus grupos carboxilo activados usando un reticulante funcional, di o multinucleófilo, que comprende un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos para obtener moléculas de glucosaminoglicano reticulado.

El GAG, de acuerdo con la invención, se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina. En una modalidad preferida, la molécula de GAG es ácido hialurónico.

En la etapa de activación (b), los grupos carboxilo en las moléculas GAG se activan con un agente de acoplamiento para formar moléculas GAG activadas.

En una modalidad preferida, el reactivo de acoplamiento de péptidos se selecciona del grupo que consiste en reactivos de acoplamiento basados en triazina, reactivos de acoplamiento de carbodiimida, reactivos de acoplamiento derivados de imidazolio, Oxyma y COMU.

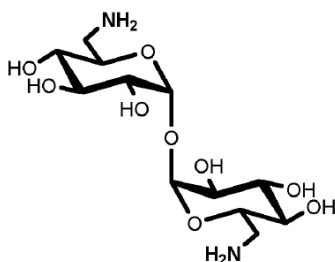
El reactivo de acoplamiento de péptidos es preferiblemente un reactivo de acoplamiento basado en triazina, tal como cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) y 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT). Un reactivo preferido de acoplamiento de péptidos basado en triazina es el DMTMM.

Otros reactivos de acoplamiento de péptidos preferidos son los reactivos de acoplamiento de carbodiimida, preferiblemente N- (3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) combinada con N-hidroxisuccinimida (NHS).

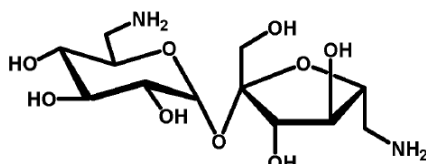
En la etapa de reticulación (c), la reticulación de las moléculas de GAG activadas se produce a través de sus grupos carboxilo usando un reticulante. El reticulante es un reticulante funcional di o multinucleófilo que comprende un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos. El reticulante conecta las cadenas de GAG entre sí mediante los grupos carboxilo en la cadena principal de GAG. El grupo separador puede ser, por ejemplo, un tetrasacárido del ácido hialurónico, un hexasacárido del ácido hialurónico, trehalosa, lactosa, maltosa, sacarosa, celobiosa o residuos de rafinosa. Por el término "residuo" se entiende aquí que la estructura del compuesto es similar, pero no idéntica, a los compuestos originales el tetrasacárido de ácido hialurónico, el hexasacárido de ácido hialurónico, la trehalosa, lactosa, maltosa, sacarosa, celobiosa o rafinosa, respectivamente. La estructura del residuo puede diferir de la estructura del compuesto original en que ha sido provisto con dos o más grupos funcionales nucleófilos y opcionalmente unidos covalentemente a través de dichos grupos funcionales nucleófilos y los grupos carboxilo en la cadena principal del GAG.

El reticulante funcional di o multinucleófilo comprende dos o más grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos carboxilos funcionales del GAG, dando como resultado la formación de enlaces covalentes, preferiblemente enlaces amida.

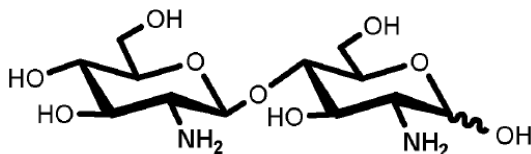
- 5 Un grupo preferido de reticulante funcional di o multinucleófilo incluye aminas primarias homo- o heterobifuncionales, hidracinas, hidracidas, carbazatos, semi-carbazidas, tiosemicarbazidas, tiocarbazatos y aminoxi. Los ejemplos no limitantes de dichos reticulantes heterobifuncionales útiles en la presente invención incluyen:



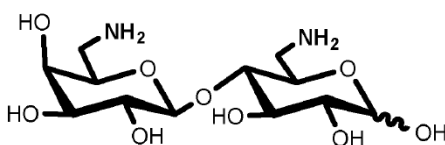
Diaminotrehalosa (6,6'-diamino-6,6'-dideoxitrehalosa);



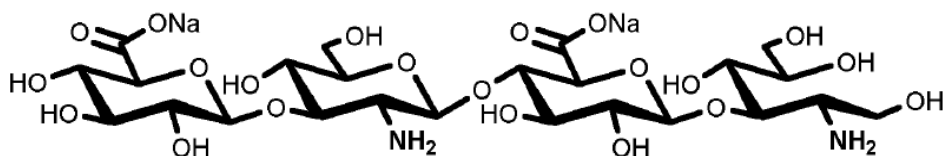
Diaminosucrose (6,6'-diamino-6,6'-dideoxysucrose);



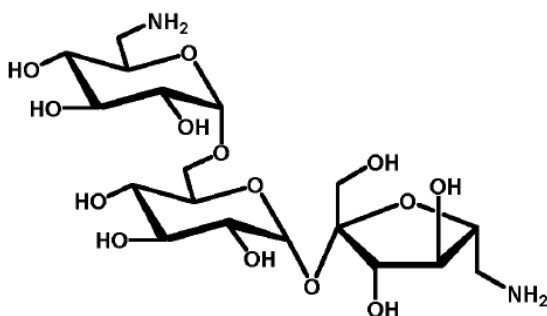
Quibiosamina (2,2'-diamino-2,2'-dideoxycellobiosamina);



Diaminolactosa (6,6'-diamino-6,6'-dideoxilactosa);

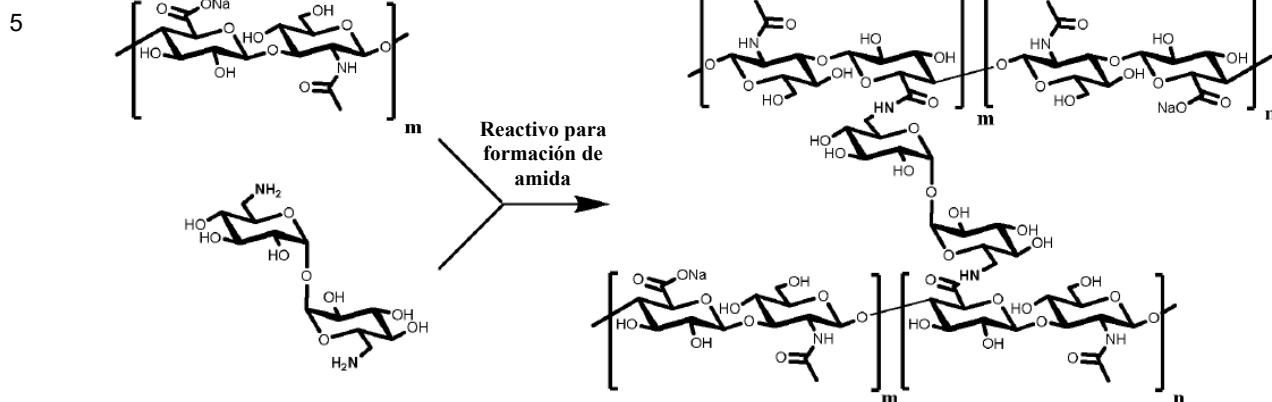


"Tetrasacárido del ácido hialurónico *N*- desacetilado reducido" o "Tetrasacárido del ácido diamino hialurónico reducido"; y

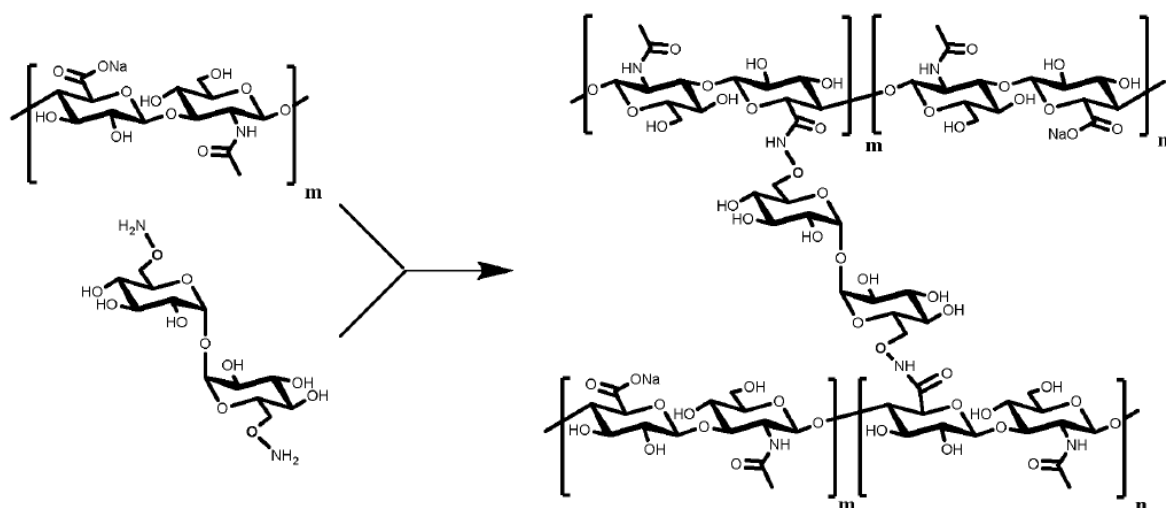


Diaminorafinosa (6,6''-diamino-6,6''-dideoxirafinosa);

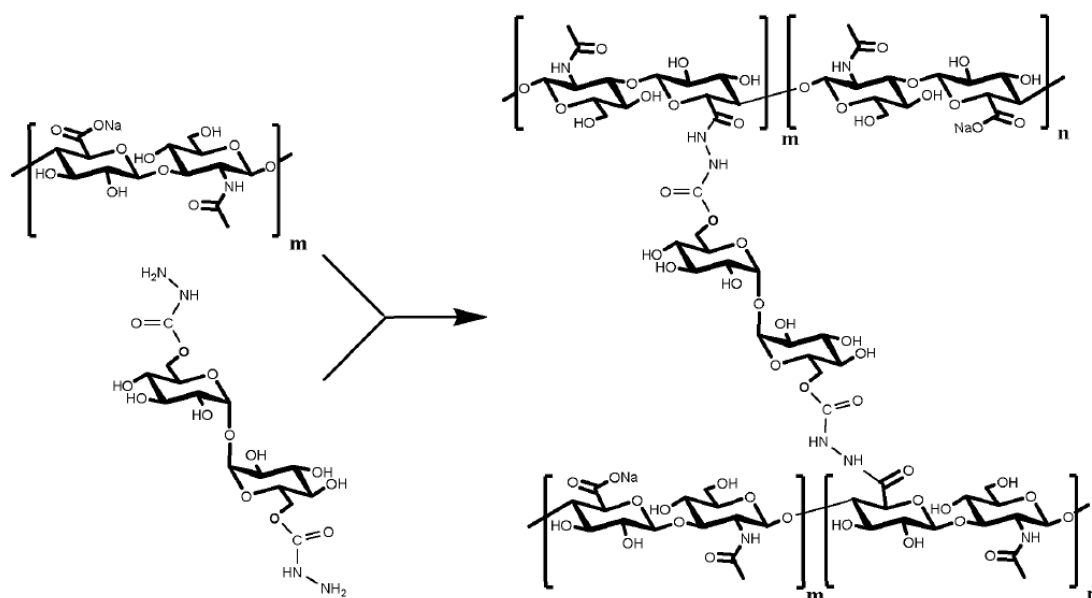
Los esquemas de reacción 1a-1h ilustran, esquemáticamente, ejemplos de acoplamiento por amina primaria heterobifuncional (1a), aminoxi (1b), carbazato (1c), semi-carbazida (1d), tiosemicarbazida (1e), tiocarbazato (1f), hidracina (1g) e hidracida (1h)



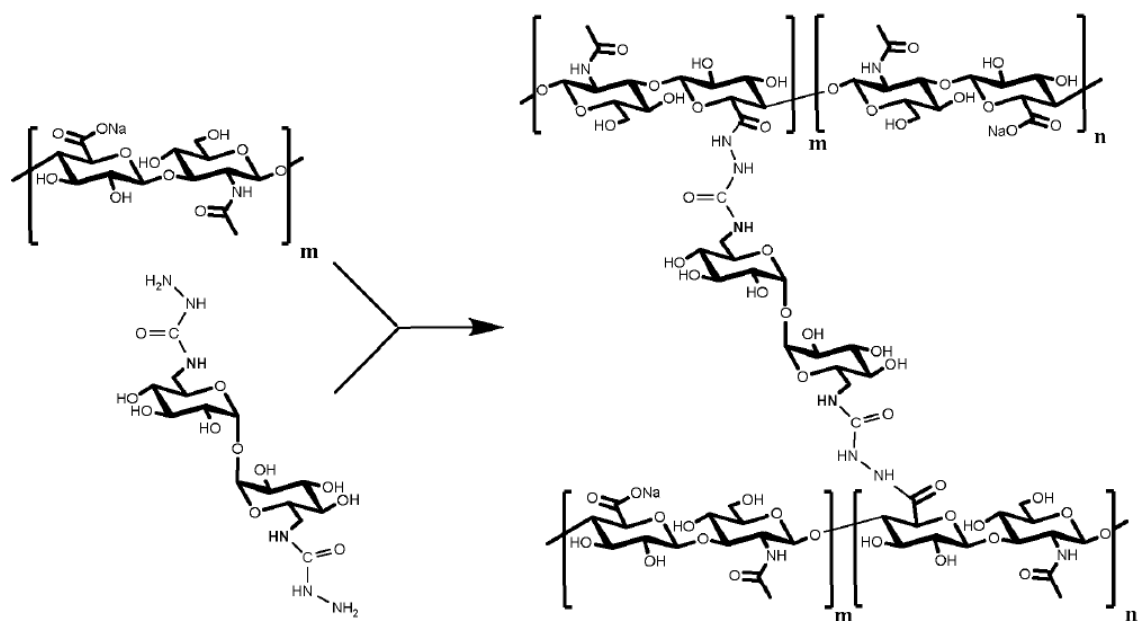
Esquema 1a



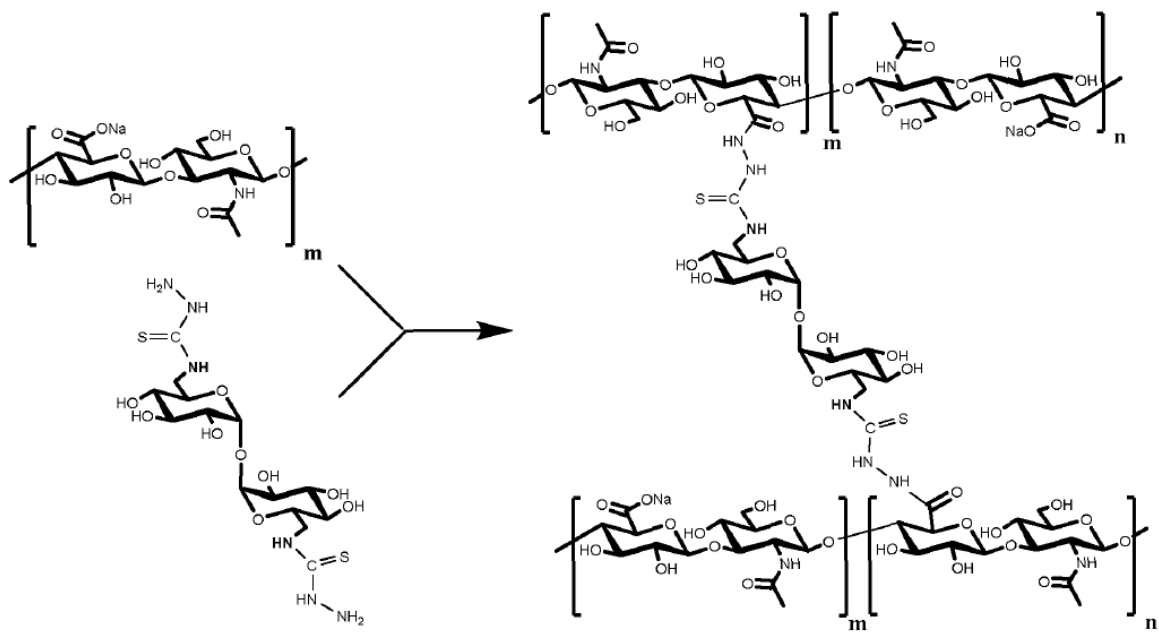
Esquema 1b



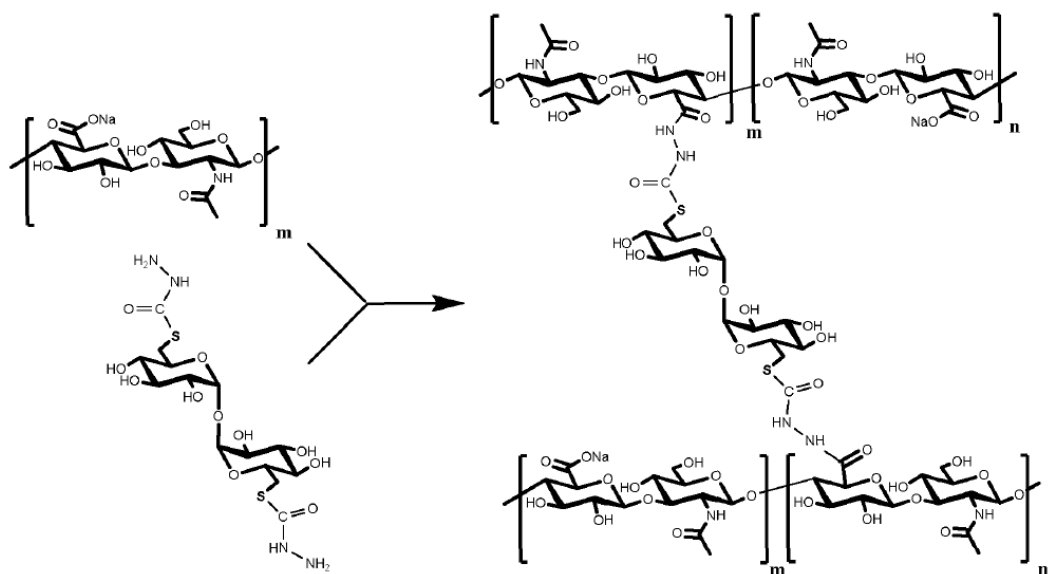
Esquema 1c



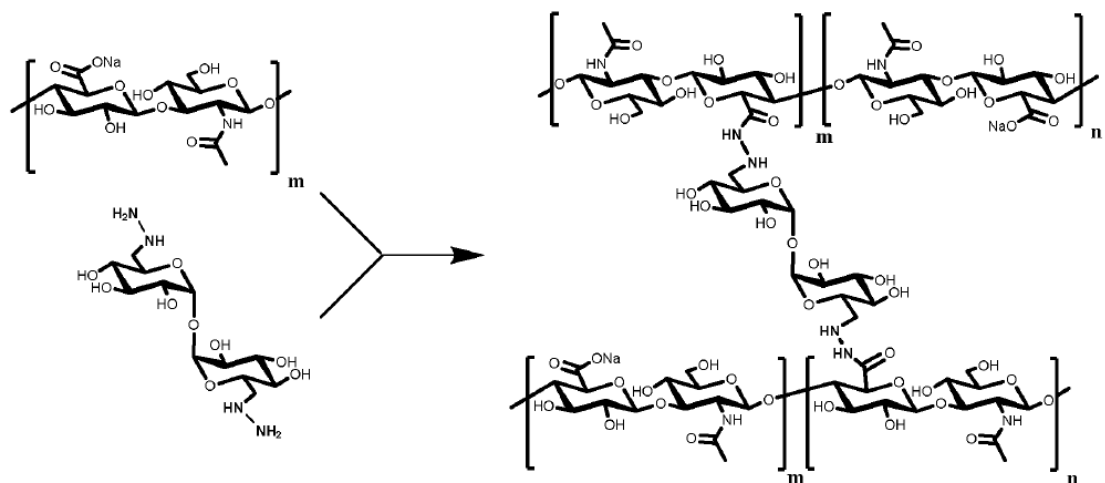
Esquema 1d



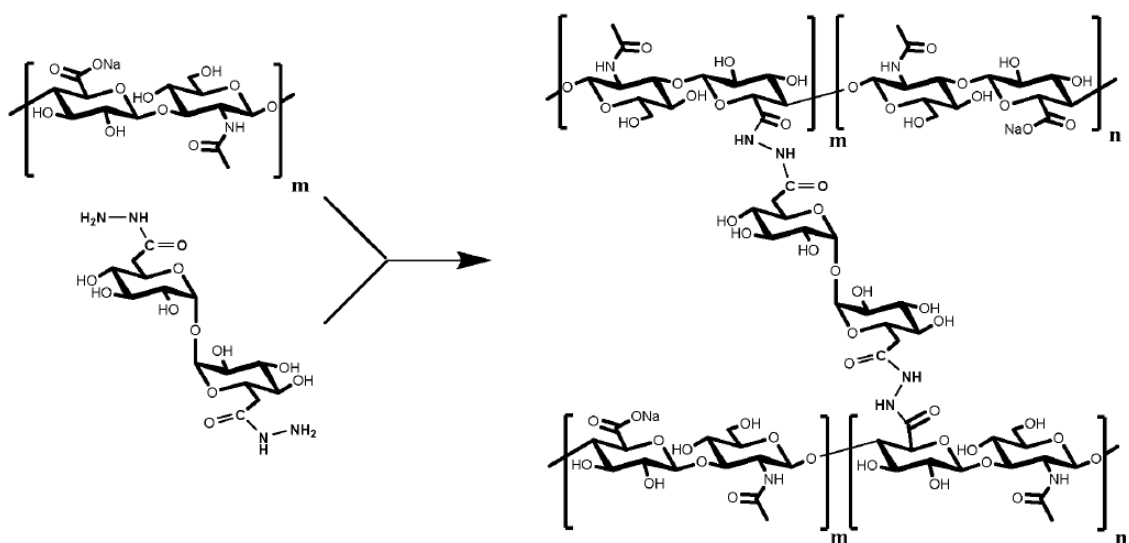
Esquema 1e



Esquema 1f



Esquema 1g



Esquema 1h

El reticulante funcional di o multinucleófilo contiene un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos, el cual permanece en los reticulados entre las moléculas de GAG.

El proceso se puede realizar en un único recipiente en medios acuosos, que implica el acoplamiento covalente de reticulantes funcionales di o multinucleófilos directamente a grupos carboxílicos ácidos inherentes en los GAG naturales usando un agente de acoplamiento adecuado. En una modalidad preferida, la etapa de activación (b) y la etapa de reticulación (c) ocurren simultáneamente.

En otra modalidad, la etapa de activación (b) ocurre antes y por separado de la etapa de reticulación (c).

El proceso para generar el hidrogel reticulado típicamente implica la preparación de una mezcla de una molécula de GAG, tal como ácido hialurónico junto con un agente reticulante, tal como diaminotrehalosa, DATH, (0.001-10 equivalentes molares de amina por grupos carboxílicos ácidos o preferiblemente 0.001-1 equivalentes molares) y un agente de acoplamiento tal como DMTMM (0,01-10 equivalentes molares por grupos carboxílicos ácidos, o preferiblemente 0,05-1 equivalentes molares). La incubación de la mezcla a 5-50 °C, preferiblemente 10-40 °C o incluso más preferiblemente 20-35 °C, durante 2-120 horas, preferiblemente 4-48 horas, seguido de un tratamiento alcalino, neutralización, precipitación, lavado y secado bajo vacío, produce un polisacárido reticulado como un sólido. El precipitado se hinchó en un tampón fosfato que contenía NaCl para formar un hidrogel, el hidrogel se microniza preferiblemente a partículas de hidrogel del tamaño de 0,01-5 mm, preferiblemente 0,1-1 mm.

Una aplicación típica del producto de hidrogel resultante implica la preparación de formulaciones inyectables para el tratamiento de trastornos de tejidos blandos, que incluyen, pero no se limitan, a tratamientos correctivos y estéticos.

En una modalidad más específica, la reticulación del sulfato de condroitina con DATH se puede lograr de la siguiente manera: la diaminotrehalosa (DATH) se sintetiza como se describe en "Polímeros sintéticos de carbohidratos que contienen residuos de trehalosa en la cadena principal: preparación y propiedades características"; Keisuke Kurita, *Nao Masuda, Sadafumi Aibe, Kaori Murakami, Shigeru Ishii y Shin-Ichiro Nishimurat; *Macromolecules* 1994, 27, 7544-7549.

El sulfato de condroitina (SC) (10-200 kDa) se pesa en un tubo Falcon. Se prepara una solución madre de diaminotrehalosa (DATH) disolviendo DATH en un tampón fosfato pH 7,4. El DMTMM se pesa en un recipiente y la solución de DATH se agrega al DMTMM. El pH de la solución de DMTMM-DATH se ajusta a aprox. 7 mediante la adición de HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M, y la mezcla se adiciona posteriormente al SC. Los contenidos se homogenizan minuciosamente y luego se incuban a 15-55 °C durante 2-48 h. El material resultante se presiona, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y se hincha en NaOH. El gel se neutraliza con HCl 1,2 M hasta pH 7 y se precipita con etanol. El precipitado resultante se lava con NaCl 100 mM en etanol al 70 %, con etanol al 70 % y etanol. El sólido obtenido se seca a 25 °C al vacío. El precipitado se hincha en un tampón fosfato de NaCl al 0,7 % pH 7,4 y se presiona, tres veces, a través de un filtro de malla. El gel de SC reticulado se llena en jeringas y se esteriliza.

En otra modalidad más específica, la reticulación del AH con diaminosucrosa se puede lograr de la siguiente manera: la diaminosucrosa se prepara como se describe en "Biblioteca de protocolos suaves y económicos para la derivatización selectiva de sacarosa bajo irradiación de microondas"; M. Teresa Barros, Krasimira T. Petrova, Paula Correia-da-Silva y Taterao M. Potewar; *Green Chem.*, 2011, 13, 1897-1906.

El ácido hialurónico (AH) (10-1000 kDa) se pesa en un recipiente. Se prepara una solución madre de diaminosucrosa disolviendo diaminosucrosa en un tampón fosfato a pH 7,4. El DMTMM se pesa en un recipiente y la solución de diaminosucrosa se adiciona al DMTMM. El pH de la solución de DMTMM-diaminosucrosa se ajusta a aprox. 7 mediante la adición de HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M, y la mezcla se adiciona posteriormente al AH. Los contenidos se homogenizan minuciosamente y luego se incuban a 15-55 °C durante 2-48 h. El material resultante se presiona, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y se hincha en NaOH. El gel se neutraliza con HCl 1,2 M hasta pH 7 y se precipita con etanol. El precipitado resultante se lava con NaCl 100 mM en etanol al 70 %, con etanol al 70 % y etanol. El sólido obtenido se seca a 25 °C al vacío. El precipitado se hincha en un tampón fosfato de NaCl al 0,7 % pH 7,4 y se presiona, tres veces, a través de un filtro de malla. El gel de AH reticulado se llena en jeringas y se esteriliza.

En otra modalidad más específica, la reticulación del AH con quitobiosa se puede lograr de la siguiente manera: se pesa el ácido hialurónico (AH) (10-1000 kDa) en un recipiente. Se prepara una solución madre de quitobiosa (comprada en Carbosynth Ltd. UK) disolviendo la quitobiosa en un tampón fosfato pH 7,4. El DMTMM se pesa en un recipiente y la solución de quitobiosa se adiciona al DMTMM. El pH de la solución de DMTMM-quitobiosa se ajusta a aprox. 7 mediante la adición de HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M, y la mezcla se adiciona posteriormente al AH. Los contenidos se homogenizan minuciosamente y luego se incuban a 15-55 °C durante 2-48 h. El material resultante se presiona, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y se hincha en NaOH. El gel se neutraliza con HCl 1,2 M hasta pH 7 y luego se precipita con etanol. El precipitado resultante se lava con NaCl 100 mM en etanol al 70 %, con etanol al 70 % y etanol. El sólido obtenido se seca a 25 °C al vacío. El precipitado se hincha en un tampón

fosfato de NaCl al 0,7 % pH 7,4 y se presiona, tres veces, a través de un filtro de malla. El gel de AH reticulado se llena en jeringas y se esteriliza.

En otra modalidad más específica, la reticulación del AH con un diamino tetrasacárido reducido de AH se puede lograr de la siguiente manera:

El ácido hialurónico (AH) (10-1000 kDa) se pesa en un recipiente. Se prepara una solución madre de un diamino tetrasacárido reducido de AH disolviendo el diamino tetrasacárido reducido de AH en un tampón fosfato pH 7,4. El DMTMM se pesa en un recipiente y la solución del diamino tetrasacárido reducido de AH se adiciona al DMTMM. El pH del DMTMM y de la solución del diamino tetrasacárido reducido de AH se ajusta a aprox. 7 mediante la adición de HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M, y la mezcla se adiciona posteriormente a HA. Los contenidos se homogenizan minuciosamente y se incuban a 15-55 °C durante 2-48 h. El material resultante se presiona, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y se hincha en NaOH. El gel se neutraliza con HCl 1,2 M hasta pH 7 y se precipita con etanol. El precipitado resultante se lava con NaCl 100 mM en etanol al 70 %, con etanol al 70 % y etanol. El sólido obtenido se seca a 25 °C al vacío. El precipitado se hincha en un tampón fosfato de NaCl al 0,7 % pH 7,4 y se presiona, tres veces, a través de un filtro de malla. El gel de AH reticulado se llena en jeringas y se esteriliza.

En otra modalidad más específica, la reticulación del AH con dicarbazato trehalosa se puede lograr de la siguiente manera: α , α -D-trehalosa (1 equiv.) (anhidra) (Carbosynth Ltd. UK) se disuelve en dimetilformamida seca (DMF) y trietilamina (2-6 equiv.) y se adiciona posteriormente. El matraz se enfría a 0 °C (hielo/agua) y bajo atmósfera de N₂. Se adiciona al matraz cloruro de 4-nitrofenilo (2-6 equiv.) gota a gota. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente durante 2-48 h y luego se concentra, se purifica por CF y se seca al vacío. El producto se disuelve en DMF, y se adiciona monohidrato de hidracina (2-20 equiv.) a la solución y se agita a 0-50 °C durante 4-48 h. La reacción luego se concentra, se purifica por CF y se seca al vacío para obtener α , α -D-6,6'-didesoxi-6,6'-dicarbazato trehalosa (dicarbazato trehalosa, DCT).

El ácido hialurónico (AH) (10-1000 kDa) se pesa en un recipiente. Se prepara una solución madre de dicarbazato trehalosa (DCT) disolviendo DCT en un tampón fosfato pH 7,4. El DMTMM se pesa en un recipiente y la solución de DCT se adiciona al DMTMM. El pH de la solución de DMTMM-DCT se ajusta a aprox. 7 mediante la adición de HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M, y la mezcla se adiciona posteriormente al AH. Los contenidos se homogenizan minuciosamente y se incuban a 15-55 °C durante 2-48 h. El material resultante se presiona, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y se hincha en NaOH. El gel se neutraliza con HCl 1,2 M hasta pH 7 y se precipita con etanol. El precipitado resultante se lava con NaCl 100 mM en etanol al 70%, con etanol al 70% y etanol. El sólido obtenido se seca a 25 °C al vacío. El precipitado se hincha en un tampón fosfato de NaCl al 0,7 % pH 7,4 y luego se presiona, tres veces, a través de un filtro de malla. El gel de AH reticulado se llena en jeringas y se esteriliza.

En otra modalidad más específica, la reticulación del AH con diaminoxitrehalosa se puede lograr de la siguiente manera: a una suspensión agitada de α , α -D-trehalosa (1 equiv.) (anhidra) (Carbosynth Ltd. UK) en THF anhidro, se adiciona N-hidroxifalimida (2-10 equiv.) y trifetilfosfina (2-10 equiv.), y la mezcla se agita durante 5-60 min. Luego se adiciona, gota a gota, azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD, 2-10 equiv.) a 0-40 °C y la mezcla se agita durante 2-48 h a 0-40 °C. El disolvente se elimina al vacío y el producto bruto se purifica por CF y se seca al vacío. Una suspensión del producto en una mezcla de MeOH y CH₂Cl₂ se trata con monohidrato de hidracina (2-20 equiv.), y la mezcla se agita a 0-40 °C durante 2-24 h seguido de concentración, purificación por CF y secado al vacío para obtener la diaminoxitrehalosa.

El ácido hialurónico (AH) (10-1000 kDa) se pesa en un recipiente. Se prepara una solución madre de diaminoxitrehalosa (DAOT) disolviendo la DAOT en un tampón fosfato pH 7,4. El DMTMM se pesa en un recipiente y la solución de DAOT se adiciona al DMTMM. El pH de la solución DMTMM-DAOT se ajusta a aprox. 7 mediante la adición de HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M, y la mezcla se adiciona posteriormente al AH. Los contenidos se homogenizan minuciosamente y se incuban a 15-55 °C durante 2-48 h. El material resultante se presiona, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y se hincha en NaOH. El gel se neutraliza con HCl 1,2 M hasta pH 7 y se precipita con etanol. El precipitado resultante se lava con NaCl 100 mM en etanol al 70 %, con etanol al 70 % y etanol. El sólido obtenido se seca a 25 °C al vacío. El precipitado se hincha en un tampón fosfato de NaCl al 0,7 % pH 7,4 y luego se presiona, tres veces, a través de un filtro de malla. El gel de AH reticulado se llena en jeringas y se esteriliza.

Ejemplos

Sin desear estar limitado a ello, la presente invención se ilustrará a continuación a modo de ejemplos.

Definiciones y Análisis

SwF - Análisis del factor de hinchazón se realiza en solución salina.

[PS] - Concentración del polisacárido, por ejemplo, concentración del AH. La concentración de PS se mide con LC-SEC-UV o NIR.

GelP - Parte de gel (además denominada a veces contenido de gel o GelC) es una descripción del porcentaje del polisacárido que es parte de la red del gel. Un número 90 % significa que solo el 10% del polisacárido no forma parte de la red. La cantidad de polisacárido libre en el gel se midió con LC-SEC-UV.

SwC - Capacidad de hinchamiento es la absorción total de líquido por un gramo de polisacárido, no corregida por la parte del gel.

$$SwC = \frac{SwF}{[PS]}$$

SwCC - Capacidad de hinchamiento corregida (además denominada a veces SwDC) es la absorción total de líquido por un gramo de polisacárido, corregida por la parte del gel.

$$SwCC = \frac{SwF}{GelP * [PS]}$$

CrR - Relación de reticulación efectiva se analiza con LC-SEC-MS y se define como:

$$CrR = \frac{\text{Mol de reticulante reticulado con enlaces amida}}{\text{Mol de reticulante unido con enlaces amida}}$$

Un CrR de 1,0 significa que todo el reticulante se ha reticulado.

Hidrólisis alcalina o por calor

En algunos de los ejemplos a continuación, el producto se sometió a una hidrólisis alcalina o térmica para hidrolizar los enlaces éster formados durante el proceso de reticulación. La hidrólisis alcalina/térmica produce solo enlaces de reticulación de amida en el producto final. La hidrólisis alcalina/térmica se realiza de la siguiente manera:

Hidrólisis alcalina

El material se hincha en NaOH 0,25 M (1 g de material: 9 g de NaOH 0,25 M dando como resultado un pH 13) durante al menos 1 h a temperatura ambiente. El gel se neutralizó con HCl 1,2 M hasta pH 7 y luego se precipitó con etanol. El precipitado resultante se lavó con NaCl 100 mM en etanol al 70 % para eliminar el exceso de reactivos y luego con etanol al 70 % para eliminar las sales y finalmente con etanol para eliminar el agua. El etanol se eliminó en un secador de vacío durante la noche.

El precipitado se hinchó en un tampón fosfato de NaCl al 0,7 % pH 7,4 y luego se presionó, tres veces, a través de un filtro de malla fina. El gel se llenó en jeringas y se esterilizó. En algunos casos, un par de jeringas no fueron esterilizadas para ver el efecto de la esterilización.

Hidrólisis por calor

El material se hincha en un tampón fosfato de NaCl al 0,7 %, pH 7,4 a temperatura ambiente. El pH se ajusta a 7,2-7,5 si es necesario. El gel se deja a 70 °C durante 20-24 h y luego se reduce el tamaño de partícula a través de un filtro de malla fina tres veces. El gel se llenó en jeringas y se esterilizó. En algunos casos, un par de jeringas no fueron esterilizadas para ver el efecto de la esterilización.

Síntesis de diaminotrehalosa hialurónica

La diaminotrehalosa (DATH) se sintetizó como se describe en "Polímeros sintéticos de carbohidratos que contienen residuos de trehalosa en la cadena principal: preparación y propiedades características"; Keisuke Kurita, *Nao Masuda, Sadafumi Aibe, Kaori Murakami, Shigeru Ishii y Shin-Ichiro Nishimura; *Macromolecules* 1994, 27, 7544-7549.

Ejemplo 1 - Reticulación de ácido hialurónico con diaminotrehalosa (DATH)

Se realizaron una serie de experimentos (Ejemplos 1-1 a 1-5) que implicaron la reticulación del ácido hialurónico (AH) de diferentes pesos moleculares con diversas relaciones molares de DATH usando cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) como agente de acoplamiento. Las relaciones entre AH, DATH y DMTMM se exponen en la Tabla 1 a continuación.

El hialuronano (peso molecular (M_w) desde aproximadamente 100 kDa hasta aproximadamente 1000 kDa) se pesó en un tubo Falcon. Se preparó una solución madre de diaminotrehalosa (DATH) disolviendo DATH (0,001-0,005 equiv.) en un tampón fosfato pH 7,4. Se pesó DMTMM (0,05 equiv.) en un recipiente de PETF y se adicionó la solución de DATH a DMTMM para disolverlo. El pH de la solución DMTMM-DATH se ajustó a 6-7 con HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M y luego se adicionó al AH. Los contenidos se homogenizaron minuciosamente y luego se incubaron a 35 °C durante 24 h.

El material resultante se presionó, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y luego se trató con una solución de NaOH. El gel se neutralizó con HCl 1,2 M hasta pH 7 y luego se precipitó con etanol. El precipitado resultante se lavó con NaCl 100 mM en etanol al 70 % para eliminar el exceso de reactivos y luego con etanol al 70 % para eliminar las sales y finalmente con etanol para eliminar el agua. El etanol se eliminó en un secador de vacío durante la noche.

El precipitado se hinchó en un tampón fosfato de NaCl al 0,7 % pH 7,4 y luego se presionó, tres veces, a través de un filtro de malla. El gel se llenó en jeringas y se esterilizó.

Tabla 1.

Ejemplo	<M _w > (MDa)	Eq DMTMM	EQ DATH	Monofásico[HA] 50mg/mL	CrR	GelC (%)	SwCC (ml/g)
1-1	1,06	0,05	0,003	No	0,99	NA	NA
1-2	1,06	0,05	0,001	Sí	0,99	74	101
1-3	0,64	0,05	0,005	Sí	NA	93	38
1-4	0,31	0,05	0,005	Sí	NA	85	49
1-5	0,11	0,05	0,005	Sí	NA	84	123
NA: no disponible ya que no se realizó el análisis							

Ejemplo 2 - Reticulación del ácido hialurónico con diaminotrehalosa (DATH)

Se realizaron una serie de experimentos (Ejemplos 2-1 a 2-11) que implicaron la reticulación del ácido hialurónico (AH) de diferentes pesos moleculares con diversas relaciones molares de DATH usando cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) como agente de acoplamiento. Las relaciones entre AH, DATH y DMTMM se exponen en la Tabla 2 a continuación.

El ácido hialurónico se pesó en un recipiente de reacción. Se preparó una solución madre del reticulante (DATH) disolviéndolo en un tampón fosfato pH 7,4. Se pesó el DMTMM en un recipiente de PETF y se adicionó la solución de reticulante al DMTMM para disolverlo. El pH de la solución de reticulante DMTMM se ajustó a 6-7 con HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M y luego se adicionó al AH. Los contenidos se homogenizaron minuciosamente y luego se incubaron a 35 °C durante 24 h. El material resultante se presionó, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y luego se trató con calor o vía alcalina. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de la reticulación del ácido hialurónico con (DATH)

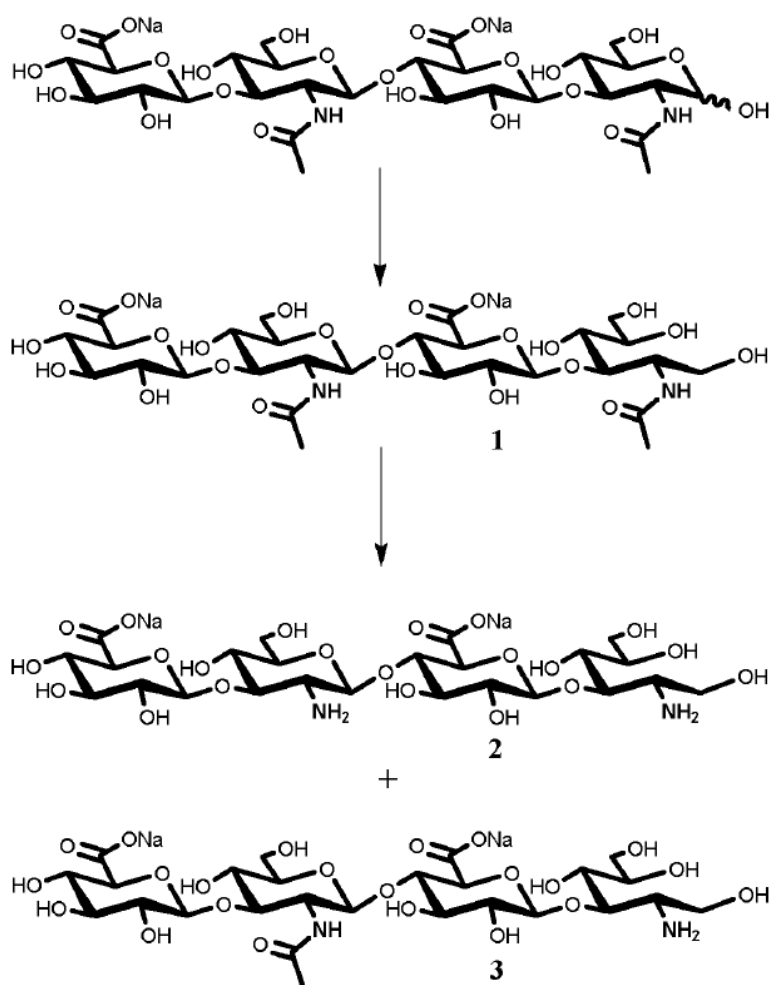
Ejemplo	<M _n > (MDa)	DMTMM/AH (% mol)	DATH/AH (% mol)	DMTMM/DATH	Hidrólisis	CrR	GelP después de la esterilización (%)	SwCC (ml/g)
2-1	1	5,0	0,08	61	Alcalino	0,99	74	101
2-2	1	0,7	0,06	12	Calor	0,51	45	309
2-3	1	2,4	0,03	74	Calor	0,94	55	259
2-4 (n = 4)	0,6	1,2	0,32	3,6	Calor	0,45	72±4	132±23
2-5 (n = 4)	0,6	1,2	0,32	3,6	Alcalino	0,43	63±1	218±13
2-6	0,3	5,0	0,25	20	Alcalino		77	79
2-7	0,2	4,9	0,57	8,7	Calor	0,86	77	106
2-8	0,2	4,0	0,57	7,0	Alcalino	0,63	52	445
2-9	0,1	4,5	0,65	7,0	Calor	0,55	50	337
2-10	0,1	6,9	0,79	8,8	Calor	0,89	91	91
2-11	0,1	5,5	0,65	8,5	Calor	0,75	87	146
Celdas vacías - no se realizó ningún análisis.								

Ejemplo 3 - Reticulación de ácido hialurónico con quitobiosa (CB)

El ácido hialurónico se pesó en un recipiente de reacción. Se preparó una solución madre del reticulante (quitobiosa) disolviéndolo en un tampón fosfato pH 7,4. Se pesó el DMTMM en un recipiente de PETF y se adicionó la solución de reticulante al DMTMM para disolverlo. El pH de la solución de reticulante DMTMM se ajustó a 6-7 con HCl 1,2 M y luego se adicionó al AH. Los contenidos se homogenizaron minuciosamente y luego se incubaron a 35 °C durante 24 h. El material resultante se presionó, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y luego se trató con calor o vía alcalina de acuerdo con los procedimientos generales. Las relaciones entre AH, quitobiosa y DMTMM se exponen a continuación en la Tabla 3 (Ejemplos 3-1 a 3-2).

Ejemplo 4 - Reticulación de ácido hialurónico con diaminotetra-AH (DA-4AH)

El diaminotetra-AH (DA-4HA) se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema:



Etapa 1

Una solución de AH-4 (500 mg, 0,61 mmol) en agua (5 ml) a temperatura ambiente se trató con borohidruro de sodio (23,05 mg, 0,61 mmol) y la solución resultante se agitó durante 3 h, se concentró a sequedad para proporcionar el producto reducido 1 (532 mg, asumido 100 %) como un espumado blanco. LCMS (t_r = 0,28 min., ES+ = 779,4 (M-2 Na + 2H))

Etapa 2

El producto reducido 1 (532 mg) se disolvió en NH₂OH acuoso (5 ml, 50 % v/v) y se adicionó NH₄I sólido (100 mg). La suspensión resultante se calentó a 70 °C durante 48 h, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a sequedad para proporcionar un residuo. El residuo se precipitó en EtOH puro y el precipitado resultante se colectó por filtración y se secó hasta un peso constante para proporcionar una mezcla 1:1 de diamina 2 y monoamina 3 con un rendimiento cuantitativo. El producto bruto de reacción se usó sin purificación adicional.

2: LCMS ($t_r = 0,16$ min, ES+ = 695,36 (M-2 Na + 2H))

3: LCMS ($t_r = 0,19$ min, ES+ = 737,47 (M-2 Na + 2H))

El ácido hialurónico se pesó en un recipiente de reacción. Se preparó una solución madre del reticulante (diaminotetra-AH), sintetizada como se describió anteriormente, y DMTMM respectivamente disolviéndolo en un tampón fosfato pH 7,4. El pH de las soluciones se ajustó a 7 y luego se adicionó al HA. Los contenidos se homogenizaron minuciosamente y luego se incubaron a 23 °C durante 24 h. El material resultante se presionó, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y luego se trató con calor de acuerdo con los procedimientos generales. La relación entre AH, diaminotetra-AH y DMTMM se establece a continuación en la Tabla 3 (Ejemplo 4).

Ejemplo 5 - Reticulación de heparosano (HEP) con diaminotrehalosa (DATH)

El agente de acoplamiento DMTMM y el reticulante DATH se pesaron en recipientes de reacción separados y se disolvieron en un tampón fosfato (pH 7,4). El pH de las soluciones se ajustó a pH 7-7,5 con HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M. Posteriormente, las soluciones de DMTMM y DATH se adicionaron sucesivamente al heparosano pesado en un recipiente de reacción. Los contenidos se homogenizaron minuciosamente y luego se incubaron a 35 °C durante 24 h. El material resultante se presionó, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y luego se trató con calor de acuerdo con los procedimientos generales. Las relaciones entre heparosano, DATH y DMTMM se exponen en la Tabla 3 a continuación (Ejemplos 5-1 a 5-2).

Ejemplo 6 - Reticulación de sulfato de condroitina (SC) con diaminotrehalosa (DATH)

El agente de acoplamiento DMTMM y el reticulante DATH se pesaron en recipientes de reacción separados y se disolvieron en un tampón fosfato (pH 7,4). El pH de las soluciones se ajustó a pH 7-7,5 con HCl 1,2 M o NaOH 0,25 M. Posteriormente, las soluciones de DMTMM y DATH se adicionaron sucesivamente al sulfato de condroitina pesado en un recipiente de reacción. Los contenidos se homogenizaron minuciosamente y luego se incubaron a 35 °C durante 24 h. El material resultante se presionó, dos veces, a través de una malla de acero de 1 mm y luego se trató con calor de acuerdo con los procedimientos generales. Las relaciones entre sulfato de condroitina, DATH y DMTMM se exponen, a continuación, en la Tabla 3 (Ejemplos 6-1 a 6-2).

Tabla 3. Resumen de ejemplos de reticulación 3-6

Ejemplo	PS Mw	Reticulante	DMTMM/PS (% mol)	Reticulante/PS (% mol)	DMTMM/retic ulante	Hidrólisis	GelP (%)	SwCC (mL/g)	SwC (mL/g)	G' 0,1 Hz (kPa)
3-1	AH 1 MDa	CB	2,4	0,13	18,5	Calor	60	224		
3-2	AH 1 MDa	CB	2,4	0,13	18,5	Alcalino	45	335		
4	AH 0,2 MDa	DA-4AH	24	1,0	24	Calor			47	
5-1	HEP 140 kDa	DATH	7	1,0	7	Calor	36	175		
5-2	HEP 140 kDa	DATH	10,5	1,5	7	Calor	80	101		
6-1	SC 30 kDa	DATH	35	5,0	7,0	Calor			48	1,6
6-2	SC 30 kDa	DATH	35	5,0	7,0	Calor			44	1,5
PS = polisacárido, HA = hialuronano, HEP = heparosano, SC = sulfato de condroitina, DA-4HA = diaminotetra-AH, CB = quitobiosa Celdas vacías - no se realizó ningún análisis.										

REIVINDICACIONES

1. Un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglucano como el polímero hinchable, en donde las moléculas de glucosaminoglucano se reticulan covalentemente mediante reticulaciones que consisten esencialmente en un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos, en donde las moléculas de glucosaminoglucano reticuladas están libres, o esencialmente libres de estructuras o enlazadores sintéticos no carbohidratos.
2. Un producto de hidrogel de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las moléculas de glucosaminoglucano son ácido hialurónico.
3. Un producto de hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el grupo separador es un residuo de tetrasacárido de ácido hialurónico, un hexasacárido de ácido hialurónico, trehalosa, lactosa, maltosa, sacarosa, celobiosa o rafinosa.
4. Un producto de hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el grupo separador se selecciona del grupo que consiste en di, tri y tetrasacáridos.
5. Un producto de hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos el 90 % de los enlaces entre las moléculas de glucosaminoglucanos y los reticulados son enlaces amida.
6. Un producto de hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde menos del 5 % de los enlaces entre las moléculas de glucosaminoglucano y los reticulados son enlaces éster.
7. Un producto de hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de formulación inyectable.
8. Un proceso para la preparación de un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglucano reticulado, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una solución de moléculas de glucosaminoglucano;
 - (b) activar los grupos carboxilo en las moléculas de glucosaminoglucano con un agente de acoplamiento para formar moléculas de glucosaminoglucano activadas;
 - (c) reticular las moléculas de glucosaminoglucano activadas a través de sus grupos carboxilo activados mediante el uso de un reticulante funcional di o multinucleófilo que comprende un grupo separador seleccionado del grupo que consiste en di, tri, tetra y oligosacáridos para obtener moléculas de glucosaminoglucano reticulado, en donde las moléculas de glucosaminoglucano reticulado están libres, o esencialmente libres de estructuras o enlazadores sintéticos no carbohidratos.
9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde las moléculas de glucosaminoglucano son ácido hialurónico.
10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde el grupo separador es un residuo de tetrasacárido de ácido hialurónico, un hexasacárido de ácido hialurónico, trehalosa, lactosa, maltosa, sacarosa, celobiosa o rafinosa.
11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el grupo separador se selecciona del grupo que consiste en di, tri y tetrasacáridos.
12. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde los grupos nucleófilos del reticulante se seleccionan del grupo que consiste en amina primaria, hidracina, hidracida, carbazato, semi-carbazida, tiosemicarbazida, tiocarbazato y aminoxi.
13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde la reticulación de la etapa (c) proporciona enlaces amida entre las moléculas de glucosaminoglucanos y los reticulantes.
14. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en donde el agente de acoplamiento es un reactivo de acoplamiento basado en triazina, preferiblemente DMTMM.
15. Un método de tratamiento cosmético de la piel, que comprende administrar a la piel un producto de hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o un producto de hidrogel obtenible por un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-14.