

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 223**

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/EP2016/082774**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017 WO17114861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2016 E 16819582 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3397648**

54 Título: **Método de desacetilación de biopolímeros**

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:

16.03.2021

73 Titular/es:

GALDERMA S.A. (100.0%)

Zugerstrasse 8

6330 Cham, CH

72 Inventor/es:

OLSSON, JOHAN y

HARRIS, CRAIG STEVEN

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 812 223 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

Método de desacetilación de biopolímeros

5 Campo técnico de la invención

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

10

Antecedentes de la invención

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

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

25 El ácido hialurónico (HA) es uno de los polímeros biocompatibles más ampliamente usado para uso médico y cosmético. El HA es un polisacárido de origen natural que pertenece al grupo de los glucosaminoglucanos (GAG). El ácido hialurónico y los productos derivados del ácido hialurónico se usan ampliamente en los campos biomédico y cosmético, por ejemplo, durante la viscoscirugía y como relleno dérmico.

30 El sulfato de condroitina (CS) 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. Anteriormente se ha demostrado que los hidrogeles que contienen CS pueden usarse con éxito en aplicaciones biomédicas debido a su parecido con la matriz extracelular natural (Lauder, R.M., Complement Ther Med 17: 56-62, 2009). El sulfato de condroitina también se usa en el tratamiento de la osteoartritis, por ejemplo, como un suplemento dietético.

35

La reticulación de los glucosaminoglucanos prolonga la duración de los polímeros degradables que forman la red, lo cual es útil en muchas aplicaciones. Sin embargo, la reticulación también puede reducir las propiedades naturales de los glucosaminoglucanos. Por lo tanto, normalmente se desea mantener un bajo grado de modificación mediante una reticulación eficiente para conservar las propiedades naturales y los efectos del glucosaminoglucano en sí mismo.

40

Resumen de la invención

45 La presente invención se expone de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

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

50 Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un método para reticular moléculas de GAG que da como resultado un producto de hidrogel basado completamente en estructuras de tipo carbohidrato.

También es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para preparar hidrogeles de moléculas de GAG mediante rutas moderadas y eficientes.

55

También es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para la desacetilación al menos parcial de un glucosaminoglucano que comprende grupos N-acetilo mediante rutas moderadas y eficientes.

60 De acuerdo con los aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un método para la desacetilación al menos parcial de un glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo, que comprende:

- a1) proporcionar un glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo;
- a2) hacer reaccionar el glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo con hidroxilamina (NH₂OH) o una sal de la misma a una temperatura de 100 °C o menos durante 2 a 200 horas para formar un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado; y
- a3) recuperar el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado.

65

El término "biopolímero" como se describe en la presente descripción se refiere a polímeros producidos por organismos vivos. Los biopolímeros se dividen en las tres clases principales, polinucleótidos, polipéptidos y polisacáridos.

La presente invención se basa en el descubrimiento de la invención de que hidroxilamina (NH_2OH) y sales de la misma, pueden usarse ventajosamente para la desacetilación de glucosaminoglucanos que contienen grupos N-acetilo en condiciones de reacción moderadas. Por lo tanto, de acuerdo con las realizaciones, el glucosaminoglucano comprende grupos N-acetilo y el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado formado en la etapa a2) es un glucosaminoglucano al menos parcialmente N-desacetilado.

Por el término "desacetilación al menos parcial" como se usa en la presente descripción con referencia al biopolímero, se entiende que al menos algunos de los grupos N-acetilo de un biopolímero que comprende grupos N-acetilo se escinden, dando como resultado la formación de grupos amina libres en el biopolímero. Por el término "desacetilación al menos parcial" como se usa en la presente descripción, se entiende que una porción significativa de los grupos N-acetilo del biopolímero, particularmente al menos 1 %, preferiblemente al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 5 %, de los grupos N-acetilo del biopolímero se convierten en grupos amina libres.

Por el término "al menos parcialmente desacetilado" como se usa en la presente descripción con referencia al biopolímero, se entiende un biopolímero que comprende grupos N-acetilo en el que al menos algunos de los grupos N-acetilo se han escindido, dando como resultado la formación de grupos amina libres en el biopolímero. Por "al menos parcialmente desacetilado" como se usa en la presente descripción, se entiende que una porción significativa de los grupos N-acetilo del biopolímero, particularmente al menos 1 %, preferiblemente al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 5 % de los grupos N-acetilo del biopolímero se han convertido en grupos amina libres.

Los biopolímeros desacetilados comprenden grupos amina libres y pueden ser útiles para diversas aplicaciones, por ejemplo, para reacciones de reticulación, conjugación o injerto, que requieren la presencia de grupos amina libres. En particular, los biopolímeros desacetilados, por ejemplo, los glucosaminoglucanos desacetilados, pueden ser útiles para preparar biopolímeros reticulados, como los glucosaminoglucanos reticulados sin el uso de reticulantes adicionales que podrían reducir las propiedades naturales de los glucosaminoglucanos. En otras palabras, los biopolímeros desacetilados pueden usarse para preparar biopolímeros reticulados basados enteramente en estructuras de biopolímeros, sin reticulantes adicionales no biopolímeros.

El método de desacetilación de la invención implica una reacción de hidroxilaminólisis. Se ha encontrado que el uso de hidroxilamina o una sal de la misma para la desacetilación permite la N-desacetilación en condiciones moderadas, lo que resulta en una degradación menor de la cadena principal polimérica de los polisacáridos sensibles tal como el HA. El uso de hidroxilamina o una sal de la misma para la desacetilación permite así la producción del HA desacetilado con alto peso molecular retenido. Esto contrasta con los métodos previamente conocidos, como la desacetilación usando hidracina o NaOH como el agente desacetilante, donde los altos grados de desacetilación han estado inevitablemente acompañados por una degradación severa de la cadena principal polimérica.

La etapa de recuperación del biopolímero al menos parcialmente desacetilado puede implicar simplemente mantener o usar el biopolímero desacetilado a medida que se obtiene. La etapa de recuperación del biopolímero al menos parcialmente desacetilado también puede implicar cualquier tratamiento adicional del biopolímero desacetilado, que incluye, pero no se limita a lavado y purificación.

El biopolímero puede ser un biopolímero modificado, por ejemplo, ramificado o reticulado. Según ciertas realizaciones, el biopolímero es un biopolímero reticulado. Según realizaciones específicas, el biopolímero es un gel de biopolímero. El biopolímero puede ser, por ejemplo, un gel de ácido hialurónico reticulado por 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE).

Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo usados como el material de partida en el método de desacetilación es un polisacárido. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo es un glucosaminoglucano. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo se selecciona del grupo que consiste en glucosaminoglucanos sulfatados o no sulfatados tales como hialuronano, condroitina, sulfato de condroitina, heparán sulfato, heparosano, heparina, dermatán sulfato y queratán sulfato, preferiblemente ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina y mezclas de los mismos. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo es ácido hialurónico.

El ácido hialurónico es uno de los polímeros biocompatibles más ampliamente usados para uso médico. El ácido hialurónico y los otros GAG son cadenas de heteropolisacáridos con carga negativa que tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua. El ácido hialurónico y los productos derivados del ácido hialurónico se usan ampliamente en los campos biomédico y cosmético, por ejemplo, durante la viscosirugía y como relleno dérmico.

Los geles absorbentes de agua, o hidrogeles, se usan ampliamente en el campo biomédico. Generalmente se preparan mediante reticulación química de polímeros hasta redes infinitas. Aunque el ácido hialurónico natural y ciertos productos de ácido hialurónico reticulado absorben agua hasta que se disuelven por completo, los geles de ácido hialurónico reticulado típicamente absorben una cierta cantidad de agua hasta que están saturados, es decir, tienen una capacidad de retención de líquido finita o un grado de hinchamiento.

Dado que el ácido hialurónico está presente con una estructura química idéntica, excepto por su masa molecular en la mayoría de los organismos vivos, produce un mínimo de reacciones de cuerpos extraños y permite usos médicos avanzados. La reticulación y/u otras modificaciones de la molécula de ácido hialurónico son típicamente necesarias para mejorar su duración *in vivo*. Además, tales modificaciones afectan la capacidad de retención de líquido de la molécula de ácido hialurónico. Como consecuencia de ello, el ácido hialurónico ha sido objeto de muchos intentos de modificación.

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

Los polisacáridos y particularmente los glucosaminoglucanos como el ácido hialurónico, la condroitina y el sulfato de condroitina, a menudo son propensos a la degradación de la cadena principal en condiciones de reacción severas (por ejemplo, pH muy alto o bajo, o altas temperaturas). Por lo tanto, el método de la invención es especialmente útil para la desacetilación de tales polisacáridos.

El método de desacetilación de la invención es útil para obtener biopolímeros al menos parcialmente desacetilados en los que se retiene una porción significativa del peso molecular del material de partida.

De acuerdo con algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso del biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado es al menos 10 %, preferiblemente al menos 20 %, más preferiblemente al menos 25 %, del peso molecular promedio en peso del biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1). El peso molecular promedio en peso del biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado también puede ser mayor, tal como al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % del peso molecular promedio en peso del biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1).

Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 10 kDa. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 100 kDa, de al menos 500 kDa, de al menos 750 kDa, o de al menos 1 MDa. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 1 a 5 MDa, preferiblemente en el intervalo de 2 a 4 MDa.

Según algunas realizaciones, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 10 kDa. Según algunas realizaciones, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 100 kDa, de al menos 500 kDa, de al menos 750 kDa o de al menos 1 MDa. Según algunas realizaciones, el biopolímero recuperado que comprende grupos acetilo tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 0,1 a 5 MDa, preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 5 MDa o 0,5 a 3 MDa.

El método de desacetilación de la presente descripción también es aplicable a biopolímeros o biooligómeros más cortos, tales como dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.

Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo es un oligobiopolímero que tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 0,3 a 10 kDa.

Según algunas realizaciones, el oligobiopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 0,3 a 10 kDa.

El biopolímero que comprende grupos acetilo usados como material de partida en el método de desacetilación está típicamente completamente, o casi completamente, acetilado. Por el término "completamente acetilado" como se usa en la presente descripción con referencia al biopolímero, se entiende un biopolímero en el que todos, o sustancialmente todos, los grupos amina libres se han convertido en grupos N-acetilo. En otras palabras, el biopolímero "completamente acetilado" no comprende, o sustancialmente no comprende, grupos amina libres. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo usados como el material de partida en la etapa a1) tiene un grado de acetilación en el intervalo de 98 a 100 %.

Según algunas realizaciones, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un grado de acetilación al menos 1 % menos, preferiblemente al menos 2 % menos, preferiblemente al menos 3 % menos, preferiblemente al menos 4 % menos, preferiblemente al menos 5 % menos, que el del biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1). En otras palabras, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado puede tener un grado de acetilación de menos de 99 %, preferiblemente menos de 98 %, menos de 97 %, menos de 97 %, menos de 96 %, menos de 95 %, menos de 94 % o menos de 93 %. El biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado también puede tener un grado de acetilación de al menos 10 % menos, al menos 15 % menos, al menos 20 % menos, al menos 30 % menos, al menos 40 % menos o al menos 50 %, menos que el del biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1). En una realización preferida, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado tiene un grado de acetilación de menos de 97 %.

La desacetilación puede lograrse usando hidroxilamina o una sal de la misma. La sal de hidroxilamina se refiere a una sal formada por hidroxilamina y un ácido. La sal de hidroxilamina puede ser, por ejemplo, una sal formada por hidroxilamina y un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácidos minerales y ácidos orgánicos o mezclas de los mismos.

Según las realizaciones, la sal de hidroxilamina es una sal formada por hidroxilamina y un ácido mineral. Según las realizaciones, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido yodhídrico, ácido bromhídrico y ácido fosfórico y combinaciones de los mismos. Los ácidos minerales preferidos incluyen ácido clorhídrico, ácido yodhídrico y ácido bromhídrico. Un ácido mineral particularmente preferido es el ácido yodhídrico.

Según las realizaciones, la sal de hidroxilamina es una sal formada por hidroxilamina y un ácido orgánico. Según las realizaciones, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido píválico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido láctico, ácido benzoico y ácidos carboxílicos halogenados, tales como ácido trifluoroacético (TFA) y ácido tricloroacético y combinaciones de los mismos.

Según las realizaciones, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido píválico y un ácido carboxílico halogenado, preferiblemente ácido trifluoroacético y combinaciones de los mismos. Según las realizaciones, el ácido es un ácido carboxílico halogenado, preferiblemente ácido trifluoroacético.

Según las realizaciones, la sal de hidroxilamina es una sal formada por hidroxilamina y un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido yodhídrico y ácido bromhídrico, ácido propiónico, ácido píválico y ácido trifluoroacético, preferiblemente ácido yodhídrico o ácido trifluoroacético.

La reacción en la etapa a2 se realiza preferiblemente en un disolvente capaz de disolver al menos parcialmente tanto el biopolímero que comprende grupos acetilo como la hidroxilamina o la sal de la misma. El disolvente puede ser, por ejemplo, agua o un disolvente orgánico o una mezcla de los mismos. Ejemplos no limitativos de disolventes preferidos incluyen agua o una mezcla de agua y un alcohol inferior, tal como etanol. Sin embargo, pueden ser útiles otros disolventes, dependiendo de la molécula particular que comprende el grupo amida a escindir y la selección de la hidroxilamina o sal de la misma. Un ejemplo de un disolvente orgánico útil es el tetrahidrofurano (THF).

Según las realizaciones, la reacción en la etapa a2) comprende hacer reaccionar la molécula que comprende un grupo amida con hidroxilamina en agua.

El proceso de desacetilación puede realizarse preferiblemente en agua o solución acuosa, que opcionalmente comprende además otro disolvente, tal como etanol. Por lo tanto, según algunas realizaciones, la etapa a1) comprende poner en contacto un biopolímero que comprende grupos acetilo con hidroxilamina en agua para que se forme una mezcla o solución acuosa del biopolímero y la hidroxilamina. En algunas realizaciones, la concentración de hidroxilamina es al menos 10 % en peso, preferiblemente al menos 20 % en peso, preferiblemente al menos 30 % en peso de la mezcla o solución acuosa. Una concentración más alta de hidroxilamina puede aumentar la velocidad de reacción.

La hidroxilamina a menudo se proporciona en forma de una solución acuosa, típicamente a una concentración de 50 % en peso. En algunas realizaciones, el biopolímero puede mezclarse y disolverse directamente en la solución acuosa de hidroxilamina o una sal de la misma, opcionalmente diluida. Alternativamente, una sal sólida de hidroxilamina, por ejemplo, clorhidrato de hidroxilamina o sulfato de hidroxilamina, puede disolverse en una solución acuosa del biopolímero. La adición de una sal de hidroxilamina y la conversión de la sal a hidroxilamina puede realizarse como una alternativa o como un complemento para disolver el biopolímero que comprende grupos acetilo en una solución acuosa de hidroxilamina.

La concentración molar de hidroxilamina en la mezcla de reacción está preferiblemente en el intervalo de 5 a 20 M. Por ejemplo, una concentración de hidroxilamina de 50 % en peso corresponde aproximadamente a una concentración molar de 16 M.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que cuando se usa una sal de hidroxilamina en lugar de la hidroxilamina en sí, puede lograrse la misma velocidad de reacción con una concentración molar significativamente menor. Por lo tanto, la concentración molar de sal de hidroxilamina en la mezcla de reacción está preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 10 M, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 5 M.

Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo se disuelve en una solución acuosa de hidroxilamina o una sal de la mismo en la etapa a1). Según algunas realizaciones, una sal de hidroxilamina se disuelve en una solución acuosa de un biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1). Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo se disuelve en una solución acuosa de hidroxilamina y una sal de hidroxilamina se disuelve en la solución acuosa de biopolímero que comprende grupos acetilo en hidroxilamina.

Según las realizaciones, la temperatura de reacción en la etapa a2) es de 100 °C o menos. La temperatura de reacción en la etapa a2) se selecciona preferiblemente para no causar una degradación excesiva del biopolímero. Según algunas realizaciones, la temperatura en la etapa a2) está en el intervalo de 10 a 90 °C, preferiblemente 20 a 80 °C, preferiblemente 30 a 70 °C, preferiblemente 30 a 50 °C. Según las realizaciones, la reacción en la etapa a2) comprende hacer reaccionar la molécula que comprende un grupo amida con la hidroxilamina o la sal de la misma a una temperatura en el intervalo de 10 a 100 °C, preferiblemente 20 a 90 °C, preferiblemente 30 a 70 °C, preferiblemente 30 a 50 °C. La temperatura puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 70 a 90 °C, tal como aproximadamente 80 °C, o en el intervalo de 30 a 50 °C, tal como aproximadamente 40 °C.

El tiempo de reacción en la etapa a2) depende del grado deseado de desacetilación. El tiempo de reacción se selecciona preferiblemente para no causar una degradación excesiva del biopolímero y también depende de la temperatura y el pH. El tiempo de reacción generalmente puede ser de 5 minutos a 200 horas o más. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) comprende hacer reaccionar la molécula que comprende un grupo amida con la hidroxilamina o la sal de la misma durante 2 a 200 horas. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) comprende hacer reaccionar la molécula que comprende un grupo amida con la hidroxilamina o la sal de la misma durante 2 a 150 horas, preferiblemente 5 a 150 horas, preferiblemente 5 a 100 horas. En otras realizaciones, por ejemplo, donde se usa una temperatura o pH más altos, el tiempo de reacción puede ser mucho más corto, como en el intervalo de 5 minutos a 2 horas, en el intervalo de 30 minutos a 2 horas, o en el intervalo de 1 a 2 horas.

El pH en la etapa a2) se selecciona preferiblemente para no causar una degradación excesiva del biopolímero. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) se realiza a un valor de pH en el intervalo de 4 a 12. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) se realiza a un valor de pH en el intervalo de 9 a 11. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) se realiza a un valor de pH en el intervalo de 4 a 9, preferiblemente en el intervalo de 6 a 9, preferiblemente en el intervalo de 6 a 8 o 7 a 8. Típicamente se prefiere un pH más bajo para evitar la degradación del biopolímero.

Los inventores han descubierto a través de una amplia experimentación que la adición de un agente reductor de pH puede aumentar significativamente la velocidad de reacción de la reacción en la etapa a2), particularmente cuando se usa hidroxilamina. Este efecto es sorprendente y altamente ventajoso. Se observa que una adición correspondiente de un agente reductor de pH a una reacción de desacetilación de hidracina no dio como resultado ningún aumento de la velocidad de reacción. También se prefiere un valor de pH más bajo durante la reacción para evitar la degradación excesiva del biopolímero. Por lo tanto, según algunas realizaciones, el pH de la reacción se reduce a un valor en el intervalo de 4 a 9, preferiblemente en el intervalo de 6 a 9, preferiblemente en el intervalo de 6 a 8 o 7 a 8, mediante la adición de un agente reductor de pH. El agente reductor de pH puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en ácidos minerales, ácidos orgánicos y sales reductoras de pH y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el agente reductor de pH comprende clorhidrato de hidroxilamina o sulfato de hidroxilamina, preferiblemente clorhidrato de hidroxilamina.

Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) se realiza en atmósfera inerte y/o en la oscuridad.

Los productos obtenidos por el método de desacetilación descrito anteriormente pueden tener propiedades que difieren significativamente de los productos correspondientes obtenidos por otros métodos de desacetilación conocidos. Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado obtenido por el método descrito anteriormente. El glucosaminoglucano parcialmente desacetilado obtenido por el método descrito anteriormente tiene una combinación de un grado reducido de acetilación y un peso molecular promedio en peso retenido alto. La combinación de un grado significativo de desacetilación y un peso molecular promedio en peso retenido alto no se pudo obtener por los métodos de la técnica anterior para la desacetilación química.

Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un glucosaminoglucano desacetilado que tiene un grado de acetilación de 99 % o menos, preferiblemente 98 % o menos, preferiblemente 97 % o menos, preferiblemente 96 % o menos y un peso molecular promedio en peso de 0,1 MDa o más, preferiblemente 0,3 MDa o más, preferiblemente 0,5 MDa o más.

La presente invención se basa en el descubrimiento de la invención de que la hidroxilamina (NH₂OH) o sales de la misma, pueden usarse ventajosamente para la desacetilación de glucosaminoglucanos que comprenden grupos N-acetilo en condiciones de reacción moderadas. Por lo tanto, según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona el uso de hidroxilamina o una sal de la misma para desacetilar al menos parcialmente un glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo. El uso puede caracterizarse adicionalmente como se describió anteriormente con referencia al método de desacetilación.

Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un método de preparación de un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglucano reticulado, dicho método comprende las etapas de:

- a) proporcionar una solución que comprende un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado y opcionalmente un segundo glucosaminoglucano;
- b) activar los grupos carboxilo en el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado y/o el segundo glucosaminoglucano opcional con un agente de acoplamiento, para formar glucosaminoglucanos activados;
- c) reticular los glucosaminoglucanos activados a través de sus grupos carboxilo activados usando los grupos amino de los glucosaminoglucanos al menos parcialmente desacetilados para proporcionar glucosaminoglucanos reticulados mediante enlaces amida.

Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es un glucosaminoglucano desacetilado que tiene un grado de acetilación de 99 % o menos, preferiblemente 98 % o menos, preferiblemente 97 % o menos, preferiblemente 96 % o menos y un peso molecular promedio en peso de 0,1 MDa o más, preferiblemente 0,3 MDa o más, preferiblemente 0,5 MDa o más. Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel se obtiene mediante los métodos de desacetilación descritos anteriormente.

Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es un glucosaminoglucano desacetilado seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico desacetilado, condroitina desacetilada y sulfato de condroitina desacetilada y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es ácido hialurónico desacetilado.

Según algunas realizaciones, el segundo glucosaminoglucano opcional empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es un glucosaminoglucano seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el segundo glucosaminoglucano opcional empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es ácido hialurónico.

El método de preparación de un producto de hidrogel implica la reticulación de moléculas de glucosaminoglucano mediante enlaces covalentes, preferiblemente enlaces amida, típicamente usando un agente activador para los grupos carboxilo en la cadena principal de la molécula de glucosaminoglucano y grupos amino de un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado. La reticulación según el método de la invención puede alcanzarse mediante rutas moderadas y eficientes que dan como resultado altos rendimientos con una degradación mínima de las moléculas de glucosaminoglucanos.

La reticulación de glucosaminoglucanos directamente mediante la formación de enlaces amida entre los grupos amino y carboxilo presentes en los glucosaminoglucanos proporciona un producto de hidrogel basado completamente en estructuras de tipo carbohidrato. Esto minimiza la alteración de la reticulación en las propiedades naturales de los glucosaminoglucanos.

En algunas realizaciones, la etapa de activación b) y la etapa de reticulación c) ocurren simultáneamente. En otras realizaciones, la etapa de activación b) ocurre antes y por separado de la etapa de reticulación c).

En una realización preferida, el método comprende además proporcionar partículas de los glucosaminoglucanos reticulados, que tienen un tamaño promedio en el intervalo de 0,01 a 5 mm, preferiblemente 0,1 a 0,8 mm.

En una realización preferida, el agente de acoplamiento de la etapa b) es un reactivo de acoplamiento peptídico. El reactivo de acoplamiento peptídico puede seleccionarse 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. Un reactivo de acoplamiento peptídico 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 peptídico preferido es un reactivo de acoplamiento de carbodiimida, preferiblemente N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) combinado con N-hidroxisuccinimida (NHS). Otro reactivo de acoplamiento peptídico preferido es el yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (CMPI).

Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un producto de hidrogel obtenido por el método de la invención.

5 Según aspectos relacionados, la presente descripción también proporciona el uso del producto de hidrogel como un medicamento, tal como en el tratamiento de trastornos de tejidos blandos. Se proporciona un método para tratar a un paciente que padece un trastorno de tejidos blandos mediante la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del producto de hidrogel. También 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.
10

Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un producto de hidrogel obtenido por el método de la invención para su uso como un medicamento.

15 Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un producto de hidrogel obtenido por el método de la invención para su uso en el tratamiento de trastornos de tejidos blandos.

Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona el uso de un producto de hidrogel obtenido por el método de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de tejidos blandos.
20

Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un método para tratar a un paciente que padece un trastorno de tejidos blandos mediante la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto de hidrogel obtenido por el método de la invención.
25

Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un método para proporcionar tratamiento correctivo o estético a un paciente mediante la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto de hidrogel obtenido por el método de la invención.

30 Según otros aspectos ilustrados en la presente descripción, se proporciona un método de tratamiento cosmético de la piel, que comprende administrar a la piel un producto de hidrogel obtenido por el método de la invención.

Otros aspectos y realizaciones preferidas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y las reivindicaciones adjuntas.
35

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 es un esquema de reacción que ilustra la formación de un ácido hialurónico reticulado que comprende 1) desacetilación de ácido hialurónico para formar ácido hialurónico parcialmente desacetilado, 2) reticulación del ácido hialurónico parcialmente desacetilado mediante formación de amida y 3) reacetilación de grupos amina libres e hidrólisis alcalina de enlaces éster formados durante la reticulación y reacetilación.

45 La Figura 2 es un esquema de reacción que ilustra la formación de un ácido hialurónico reticulado que comprende 1) desacetilación de ácido hialurónico para formar ácido hialurónico parcialmente desacetilado, 2) reticulación del ácido hialurónico parcialmente desacetilado a ácido hialurónico no desacetilado mediante formación de amida y 3) acetilación de grupos amina libres e hidrólisis alcalina de enlaces éster formados durante la reticulación y reacetilación.

50 Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona procesos ventajosos para preparar hidrogeles hechos de moléculas de glucosaminoglucano reticulado (GAG), los productos de hidrogel resultantes y sus usos. Los GAG son cadenas de heteropolisacáridos con carga negativa que tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua. En los productos de hidrogel de acuerdo con la descripción, la molécula de GAG reticulada es el polímero hinchable que proporciona las propiedades del gel. El proceso de preparación descrito en la presente descripción es moderado para las moléculas GAG, pero proporciona una reticulación eficiente.
55

El método de preparación de un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglucano reticulado de la invención, comprende las etapas de:
60

a) proporcionar una solución que comprende un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado y opcionalmente un segundo glucosaminoglucano;

65 b) activar los grupos carboxilo en el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado y/o el segundo glucosaminoglucano opcional con un agente de acoplamiento, para formar glucosaminoglucanos activados;

c) reticular los glucosaminoglucanos activados a través de sus grupos carboxilo activados usando los grupos amino de los glucosaminoglucanos al menos parcialmente desacetilados para proporcionar glucosaminoglucanos reticulados mediante enlaces amida; y opcionalmente las etapas de

5 d) acilar los grupos amina residuales de los glucosaminoglucanos reticulados proporcionados en la etapa c) para formar glucosaminoglucanos reticulados acilados; y/o

10 e) someter los glucosaminoglucanos reticulados proporcionados en la etapa c) o d) a un tratamiento alcalino para hidrolizar las reticulaciones de éster formadas como subproductos durante la reticulación de amida en la etapa c).

15 Los productos de hidrogel discutidos en la presente descripción se obtienen por acoplamiento amídico de moléculas de glucosaminoglucanos. El acoplamiento amídico usando un agente de reticulación funcional di- o multiamina junto con un agente de acoplamiento es una ruta atractiva para preparar moléculas de glucosaminoglucano reticulado útiles para productos de hidrogel. La reticulación puede lograrse usando un reticulante de di- o multinucleófilo no basado en carbohidratos, por ejemplo, hexametildiamina (HMDA), o un reticulante de di- o multinucleófilo basado en carbohidratos, por ejemplo, diaminotrehalosa (DATH) junto con un glucosaminoglucano. La reticulación también puede lograrse usando un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado, ya sea solo o en combinación con un segundo glucosaminoglucano, por lo que el glucosaminoglucano desacetilado en sí mismo actúa como el reticulante di- o multinucleófilo.

20 Por lo tanto, la presente descripción proporciona hidrogeles de moléculas de GAG mediante reticulación en medio acuoso usando un reticulante que comprende al menos dos grupos funcionales nucleófilos, por ejemplo, grupos amina, capaces de formar enlaces covalentes directamente con grupos de ácido carboxílico de moléculas de GAG mediante una reacción que implica el uso de un agente de acoplamiento.

25 El agente de reticulación que comprende al menos dos grupos funcionales nucleófilos puede ser, por ejemplo, un agente de reticulación de di- o multinucleófilos no basado en carbohidratos o un agente de reticulación de di- o multinucleófilos basado en carbohidratos.

30 Se prefieren los reticulantes di- o multinucleófilos basados en carbohidratos, ya que proporcionan un producto de hidrogel basado completamente en estructuras de tipo carbohidrato o derivados de las mismas, lo que minimiza la alteración de la reticulación en las propiedades naturales de los glucosaminoglucanos. El reticulante en sí mismo también 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 o cuando se reticula con una estructura con altas propiedades de retención de agua.

35 El reticulante di- o multinucleófilo basado en carbohidrato puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en di-, tri-, tetra-, oligosacáridos y polisacáridos di- o multinucleófilos funcionales.

40 En una realización preferida, el reticulante di- o multinucleófilo es un polisacárido al menos parcialmente desacetilado, es decir, un polisacárido acetilado que ha sido al menos parcialmente desacetilado para proporcionar un polisacárido que tiene grupos amina libres. Un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado puede reticularse solo o en combinación con un segundo glucosaminoglucano, por lo que el glucosaminoglucano desacetilado en sí mismo actúa como el reticulante di- o multinucleofílico.

En una realización preferida, el GAG reticulado se obtiene al:

50 1) reticular GAG al menos parcialmente desacetilado a GAG parcialmente desacetilado usando grupos amino y ácido carboxílico libres presentes en los GAG al menos parcialmente desacetilados, como se muestra en la Figura 1; o

55 2) reticular GAG al menos parcialmente desacetilado a un GAG no desacetilado usando grupos amina libres presentes en los grupos GAG al menos parcialmente desacetilados y ácido carboxílico presentes en el GAG, como se muestra en la Figura 2.

60 Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano se selecciona del grupo que consiste en glucosaminoglucanos sulfatados o no sulfatados tales como hialuronano, condroitina, sulfato de condroitina, heparán sulfato, heparosano, heparina, dermatán sulfato y queratán sulfato. Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina y mezclas de los mismos. Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano es ácido hialurónico. El ácido hialurónico (HA) es uno de los polímeros biocompatibles más ampliamente usado para uso médico y cosmético. El HA es un polisacárido de origen natural que pertenece al grupo de los glucosaminoglucanos (GAG). El ácido hialurónico consta de dos unidades de monosacáridos alternos, D-N-acetil glucosamina (GlcNAc) y ácido D-glucurónico (GlcA), unidas mediante enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$, respectivamente. El ácido hialurónico y los productos derivados del ácido hialurónico

se usan ampliamente en los campos biomédico y cosmético, por ejemplo, durante la viscoscirugía y como relleno dérmico.

5 A menos que se especifique lo contrario, el término "ácido hialurónico" abarca todas las variantes y combinaciones de variantes de ácido hialurónico, hialuronato o hialuronano, de varias longitudes de cadena y estados de carga, así como con varias modificaciones químicas. Es decir, el término también abarca las distintas sales de hialuronato de ácido hialurónico con varios contraiones, como el hialuronato de sodio. El ácido hialurónico puede obtenerse 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 a 10 MDa, pero son posibles otros pesos moleculares.

15 El término "condroitina" se refiere a los GAG que tienen una unidad repetitiva de disacáridos que consiste en restos 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.

20 El término "sulfato de condroitina" se refiere a los GAG que tienen una unidad repetitiva de disacárido que consiste en restos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-galactosamina alternos. El resto sulfato puede estar presente en varias posiciones diferentes. Las moléculas de sulfato de condroitina preferidas son condroitin-4-sulfato y condroitin-6-sulfato.

25 Las moléculas de condroitina pueden obtenerse 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 condroitina está típicamente en el intervalo de 1 a 500 kDa, pero son posibles otros pesos moleculares.

30 Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es un glucosaminoglucano desacetilado que tiene un grado de acetilación de 99 % o menos, preferiblemente 98 % o menos, preferiblemente 97 % o menos, preferiblemente 96 % o menos y un peso molecular promedio en peso de 0,1 MDa o más, preferiblemente 0,5 MDa o más. Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel se obtiene mediante los métodos de desacetilación descritos anteriormente.

35 Según algunas realizaciones, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es un glucosaminoglucano desacetilado seleccionado del grupo que consiste en glucosaminoglucanos desacetilados sulfatados o no sulfatados tales como hialuronano desacetilado, condroitina desacetilada, sulfato de condroitina desacetilada, heparán sulfato desacetilado, heparosano desacetilado, heparina desacetilada, dermatán sulfato desacetilado y queratán sulfato desacetilado. Preferiblemente, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico desacetilado, condroitina desacetilada y sulfato de condroitina desacetilada y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es ácido hialurónico desacetilado.

45 Según algunas realizaciones, el segundo glucosaminoglucano opcional empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es un glucosaminoglucano seleccionado del grupo que consiste en glucosaminoglucanos sulfatados o no sulfatados tales como hialuronano, condroitina, sulfato de condroitina, heparán sulfato, heparosano, heparina, dermatán sulfato y queratán sulfato. Preferiblemente, el segundo glucosaminoglucano opcional empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el segundo glucosaminoglucano opcional empleado en la etapa a) del método de preparación de un producto de hidrogel es ácido hialurónico.

55 La reticulación de glucosaminoglucanos directamente mediante la formación de enlaces amida entre los grupos amino y carboxilo presentes en los glucosaminoglucanos proporciona un producto de hidrogel basado completamente en estructuras de tipo carbohidrato. Esto minimiza la alteración de la reticulación en las propiedades naturales de los glucosaminoglucanos.

60 El método de preparación de un producto de hidrogel implica la reticulación de moléculas de glucosaminoglucano mediante enlaces covalentes, preferiblemente enlaces amida, típicamente usando un agente activador para los grupos carboxilo en la cadena principal de la molécula de glucosaminoglucano y grupos amino de un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado. La reticulación según el método de la invención puede alcanzarse mediante rutas moderadas y eficientes que dan como resultado altos rendimientos con una degradación mínima de las moléculas de glucosaminoglucanos.

65

Según algunas realizaciones, la etapa de activación b) y la etapa de reticulación c) ocurren simultáneamente.

Según algunas realizaciones, el agente de acoplamiento de la etapa b) es un reactivo de acoplamiento peptídico. La reticulación con el uso de un agente de acoplamiento peptídico es ventajosa sobre muchos otros métodos de reticulación comunes (por ejemplo, la reticulación BDDE) ya que permite que la reticulación se realice a pH neutro con una degradación mínima de las moléculas de glucosaminoglucano.

Según algunas realizaciones, el reactivo de acoplamiento peptídico 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.

Según algunas realizaciones, el reactivo de acoplamiento peptídico es un reactivo de acoplamiento basado en triazina. Según algunas realizaciones, el reactivo de acoplamiento basado en triazina se selecciona del 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). Según algunas realizaciones, el reactivo de acoplamiento basado en triazina es DMTMM.

Según algunas realizaciones, el reactivo de acoplamiento peptídico es un reactivo de acoplamiento de carbodiimida. Según algunas realizaciones, el reactivo de acoplamiento de carbodiimida es N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) combinado con N-hidroxisuccinimida (NHS).

En la presente descripción, el término "glucosaminoglucanos reticulados" o "moléculas de glucosaminoglucanos reticuladas" se refiere a glucosaminoglucanos que comprenden, típicamente reticulaciones covalentes, entre las cadenas de moléculas de glucosaminoglucanos, lo que crea una red continua de moléculas de glucosaminoglucanos unidas por los reticulantes.

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

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

La molécula de GAG reticulada está presente preferiblemente en forma de partículas de gel. Las partículas de gel tienen preferiblemente un tamaño promedio en el intervalo de 0,01 a 5 mm, preferiblemente 0,1 a 0,8 mm, tal como 0,2 a 0,5 mm o 0,5 a 0,8 mm. Según algunas realizaciones, la etapa c) comprende además proporcionar partículas de los glucosaminoglucanos reticulados, que tienen un tamaño promedio en el intervalo de 0,01 a 5 mm, preferiblemente 0,1 a 0,8 mm, tal como 0,2 a 0,5 mm o 0,5 a 0,8 mm.

El gel contiene principalmente líquido en peso y, por ejemplo, puede contener 90 a 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 soporte en la manipulación de tejidos y para el aumento de tejidos. También es útil para el tratamiento del trastorno de tejidos blandos y para el tratamiento correctivo o estético. Se usa preferiblemente como una formulación inyectable.

El producto de hidrogel también 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 reticuladas. Sin embargo, se prefiere que al menos 50 % en peso, preferiblemente al menos 60 % en peso, más preferiblemente al menos 70 % en peso y lo más preferiblemente al menos 80 % en peso, de las moléculas de GAG en una composición de gel formen parte de la red de moléculas de GAG reticuladas.

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

Según las realizaciones, el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado se obtiene mediante un método novedoso para la desacetilación al menos parcial de un biopolímero, en el que el biopolímero es un glucosaminoglucano, el método comprende:

- a1) proporcionar un biopolímero que comprende grupos acetilo;
- a2) hacer reaccionar el biopolímero que comprende grupos acetilo con hidroxilamina (NH₂OH) o una sal de la misma a una temperatura de 100 °C o menos durante 2 a 200 horas para formar un biopolímero al menos parcialmente desacetilado; y
- a3) recuperar el biopolímero al menos parcialmente desacetilado.

Se ha encontrado que la hidroxilamina (NH_2OH) y sus sales pueden usarse ventajosamente para la desacetilación de biopolímeros que comprenden grupos acetilo en condiciones de reacción moderadas. Los biopolímeros desacetilados pueden ser útiles para diversas aplicaciones, por ejemplo, para reticulación, conjugación o reacciones de injerto, que requieren la presencia de grupos amina libres.

5 El método de desacetilación de la invención implica una reacción de hidroxilaminólisis. Se ha encontrado que el uso de hidroxilamina o una sal de la misma para la desacetilación permite la N-desacetilación en condiciones moderadas, lo que resulta en una degradación menor de la cadena principal polimérica de los polisacáridos sensibles tal como el HA. El uso de hidroxilamina o una sal de la misma para la desacetilación permite así la
10 producción del HA desacetilado con alto peso molecular retenido. Esto contrasta con los métodos previamente conocidos, como la desacetilación usando hidracina o NaOH como el agente desacetilante, donde los altos grados de desacetilación han estado inevitablemente acompañados por una degradación severa de la cadena principal polimérica.

15 Según las realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo es un glucosaminoglucano, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina y mezclas de los mismos. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo es ácido hialurónico.

20 El ácido hialurónico puede obtenerse 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 a 10 MDa, pero son posibles otros pesos moleculares.

25 En ciertas realizaciones, la concentración de dicho ácido hialurónico está en el intervalo de 1 a 100 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de dicho ácido hialurónico está en el intervalo de 2 a 50 mg/ml. En realizaciones específicas, la concentración de dicho ácido hialurónico está en el intervalo de 5 a 30 mg/ml o en el intervalo de 10 a 30 mg/ml. En ciertas realizaciones, el ácido hialurónico está reticulado. El ácido hialurónico reticulado comprende reticulaciones entre las cadenas de ácido hialurónico, lo que crea una red continua de moléculas de ácido hialurónico que se mantienen unidas por las reticulaciones covalentes, el entrelazamiento físico de las cadenas de ácido hialurónico y diversas interacciones, tales como interacciones electrostáticas, enlaces de
30 hidrógeno y fuerzas de van der Waals.

35 La reticulación del ácido hialurónico puede lograrse mediante modificación con un agente de reticulación químico. El agente de reticulación químico puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en divinilsulfona, multiepóxidos y diepóxidos. Según una realización, el ácido hialurónico se reticula mediante un agente de reticulación bi- o polifuncional que comprende dos o más grupos funcionales de glicidil éter. Según las realizaciones, el agente de reticulación químico se selecciona del grupo que consiste en 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE), 1,2-etanodiol diglicidil éter (EDDE) y diepoxioctano. Según una realización preferida, el agente de reticulación químico es 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE).

40 Los polisacáridos y particularmente los glucosaminoglucanos como el ácido hialurónico, la condroitina y el sulfato de condroitina, a menudo son propensos a la degradación de la cadena principal en condiciones de reacción severas (por ejemplo, pH muy alto o bajo, o altas temperaturas). Por lo tanto, el método de la invención es especialmente útil para la desacetilación de tales polisacáridos.

45 El método de desacetilación de la invención es útil para obtener biopolímeros al menos parcialmente desacetilados en los que se retiene una porción significativa del peso molecular del material de partida.

50 De acuerdo con algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso del biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado es al menos 10 %, preferiblemente al menos 20 %, más preferiblemente al menos 25 %, del peso molecular promedio en peso del biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1). El peso molecular promedio en peso del biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado también puede ser mayor, tal como al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % del peso molecular promedio en peso del biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1).

55 Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 10 kDa. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 100 kDa, de al menos 500 kDa, de al menos 750 kDa, o de al menos 1 MDa. Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 1 a 5 MDa, preferiblemente en el intervalo de 2 a 4 MDa.

60 Según algunas realizaciones, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 10 kDa. Según algunas realizaciones, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un peso molecular promedio en peso de al menos 100 kDa, de al menos 500 kDa, de al menos 750 kDa, o de al menos 1 MDa. Según algunas realizaciones, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 0,1 a 5 MDa, preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 5 MDa o 0,5 a 3 MDa.
65

El método de desacetilación de la presente descripción también es aplicable a biopolímeros o biooligómeros más cortos, tales como dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.

5 Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo es un oligobiopolímero que tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 0,3 a 10 kDa.

Según algunas realizaciones, el oligobiopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 0,3 a 10 kDa.

10 El biopolímero que comprende grupos acetilo usados como material de partida en el método de desacetilación está típicamente completamente, o casi completamente, acetilado. Por el término "completamente acetilado" como se usa en la presente descripción con referencia al biopolímero, se entiende un biopolímero en el que todos, o sustancialmente todos, los grupos amina libres se han convertido en grupos N-acetilo. En otras palabras, el biopolímero "completamente acetilado" no comprende, o sustancialmente no comprende, grupos amina libres.
15 Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo usados como el material de partida en la etapa a1) tiene un grado de acetilación en el intervalo de 98 a 100 %.

Según algunas realizaciones, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un grado de acetilación al menos 1 % menos, preferiblemente al menos 2 % menos, preferiblemente al menos 3 % menos, preferiblemente al menos 4 % menos, preferiblemente al menos 5 % menos, que el del biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1). En otras palabras, el biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado puede tener un grado de acetilación de menos de 99 %, preferiblemente menos de 98 %, menos de 97 %, menos de 97 %, menos de 96 %, menos de 95 %, menos de 94 % o menos de 93 %. El biopolímero al menos parcialmente desacetilado recuperado también puede tener un grado de acetilación de al menos 10 % menos, al menos 15 %
20 menos, al menos 20 % menos, al menos 30 % menos, al menos 40 % menos o al menos 50 %, menos que el del biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1).

La desacetilación puede lograrse usando hidroxilamina o una sal de la misma. La sal de hidroxilamina se refiere a una sal formada por hidroxilamina y un ácido. La sal de hidroxilamina puede ser, por ejemplo, una sal formada por hidroxilamina y un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácidos minerales y ácidos orgánicos o mezclas de los mismos.
30

Según las realizaciones, la sal de hidroxilamina es una sal formada por hidroxilamina y un ácido mineral. Según las realizaciones, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido yodhídrico, ácido bromhídrico y ácido fosfórico y combinaciones de los mismos. Los ácidos minerales preferidos incluyen ácido clorhídrico, ácido yodhídrico y ácido bromhídrico. Un ácido mineral particularmente preferido es el ácido yodhídrico.
35

Según las realizaciones, la sal de hidroxilamina es una sal formada por hidroxilamina y un ácido orgánico. Según las realizaciones, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido láctico, ácido benzoico y ácidos carboxílicos halogenados, tales como ácido trifluoroacético (TFA) y ácido tricloroacético y combinaciones de los mismos.
40

Según las realizaciones, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido pivalico y un ácido carboxílico halogenado, preferiblemente ácido trifluoroacético y combinaciones de los mismos. Según las realizaciones, el ácido es un ácido carboxílico halogenado, preferiblemente ácido trifluoroacético.
45

Según las realizaciones, la sal de hidroxilamina es una sal formada por hidroxilamina y un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido yodhídrico y ácido bromhídrico, ácido propiónico, ácido pivalico y ácido trifluoroacético.
50

La reacción en la etapa a2 se realiza preferiblemente en un disolvente capaz de disolver al menos parcialmente tanto el biopolímero que comprende grupos acetilo como la hidroxilamina o la sal de la misma. El disolvente puede ser, por ejemplo, agua o un disolvente orgánico o una mezcla de los mismos. Ejemplos no limitativos de disolventes preferidos incluyen agua o una mezcla de agua y un alcohol inferior, tal como etanol. Sin embargo, pueden ser útiles otros disolventes, dependiendo del biopolímero particular y la selección de hidroxilamina o sal de la misma. Un ejemplo de un disolvente orgánico útil es el tetrahidrofurano (THF).
55

Según las realizaciones, la reacción en la etapa a2) comprende hacer reaccionar la molécula que comprende un grupo amida con hidroxilamina en agua.
60

El proceso de desacetilación puede realizarse preferiblemente en agua o solución acuosa, que opcionalmente comprende además otro disolvente, tal como etanol. Por lo tanto, según algunas realizaciones, la etapa a1) comprende poner en contacto un biopolímero que comprende grupos acetilo con hidroxilamina en agua para que se forme una mezcla o solución acuosa del biopolímero y la hidroxilamina. En algunas realizaciones, la concentración de hidroxilamina es al menos 10 % en peso, preferiblemente al menos 20 % en peso, preferiblemente al menos 30
65

% en peso de la mezcla o solución acuosa. Una concentración más alta de hidroxilamina puede aumentar la velocidad de reacción.

La hidroxilamina a menudo se proporciona en forma de una solución acuosa, típicamente a una concentración de 50 % en peso. En algunas realizaciones, el biopolímero puede mezclarse y disolverse directamente en la solución acuosa de hidroxilamina, opcionalmente diluida. Alternativamente, una sal sólida de hidroxilamina, por ejemplo, clorhidrato de hidroxilamina o sulfato de hidroxilamina, puede disolverse en una solución acuosa del biopolímero. La adición de una sal de hidroxilamina y la conversión de la sal a hidroxilamina puede realizarse como una alternativa o como un complemento para disolver el biopolímero que comprende grupos acetilo en una solución acuosa de hidroxilamina.

La concentración molar de hidroxilamina en la mezcla de reacción está preferiblemente en el intervalo de 5 a 20 M. Por ejemplo, una concentración de hidroxilamina de 50 % en peso corresponde aproximadamente a una concentración molar de 16 M.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que cuando se usa una sal de hidroxilamina en lugar de la hidroxilamina en sí, puede lograrse la misma velocidad de reacción con una concentración molar significativamente menor. Por lo tanto, la concentración molar de sal de hidroxilamina en la mezcla de reacción está preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 10 M, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 5 M.

Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo se disuelve en una solución acuosa de hidroxilamina o una sal de la mismo en la etapa a1). Según algunas realizaciones, una sal de hidroxilamina se disuelve en una solución acuosa de un biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1). Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo se disuelve en una solución acuosa de hidroxilamina y una sal de hidroxilamina se disuelve en la solución acuosa de biopolímero que comprende grupos acetilo en hidroxilamina.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que cuando se usa una sal de hidroxilamina en lugar de la hidroxilamina en sí, puede lograrse la misma velocidad de reacción con una concentración molar significativamente menor. Por lo tanto, la concentración molar de sal de hidroxilamina en la mezcla de reacción está preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 10 M, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 5 M.

Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo se disuelve en una solución acuosa de hidroxilamina o una sal de la mismo en la etapa a1). Según algunas realizaciones, una sal de hidroxilamina se disuelve en una solución acuosa de un biopolímero que comprende grupos acetilo en la etapa a1). Según algunas realizaciones, el biopolímero que comprende grupos acetilo se disuelve en una solución acuosa de hidroxilamina y una sal de hidroxilamina se disuelve en la solución acuosa de biopolímero que comprende grupos acetilo en hidroxilamina.

La temperatura de reacción en la etapa a2) es preferiblemente de 100 °C o menos. La temperatura de reacción en la etapa a2) se selecciona para no causar una degradación excesiva del biopolímero. Según algunas realizaciones, la temperatura en la etapa a2) está en el intervalo de 10 a 90 °C, preferiblemente 20 a 80 °C, preferiblemente 30 a 70 °C, preferiblemente 30 a 50 °C. Según las realizaciones, la reacción en la etapa a2) comprende hacer reaccionar la molécula que comprende un grupo amida con la hidroxilamina o la sal de la misma a una temperatura en el intervalo de 10 a 100 °C, preferiblemente 20 a 90 °C, preferiblemente 30 a 70 °C, preferiblemente 30 a 50 °C. La temperatura puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 70 a 90 °C, tal como aproximadamente 80 °C, o en el intervalo de 30 a 50 °C, tal como aproximadamente 40 °C.

El tiempo de reacción en la etapa a2) depende del grado deseado de desacetilación. El tiempo de reacción se selecciona preferiblemente para no causar una degradación excesiva del biopolímero y también depende de la temperatura y el pH. El tiempo de reacción generalmente puede ser de 5 minutos a 200 horas o más. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) comprende hacer reaccionar la molécula que comprende un grupo amida con la hidroxilamina o la sal de la misma durante 2 a 200 horas. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) comprende hacer reaccionar la molécula que comprende un grupo amida con la hidroxilamina o la sal de la misma durante 2 a 150 horas, preferiblemente 5 a 150 horas, preferiblemente 5 a 100 horas. En otras realizaciones, por ejemplo, donde se usa una temperatura o pH más altos, el tiempo de reacción puede ser mucho más corto, como en el intervalo de 5 minutos a 2 horas, en el intervalo de 30 minutos a 2 horas, o en el intervalo de 1 a 2 horas.

El pH en la etapa a2) se selecciona preferiblemente para no causar una degradación excesiva del biopolímero. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) se realiza a un valor de pH en el intervalo de 4 a 12. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) se realiza a un valor de pH en el intervalo de 9 a 11. Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) se realiza a un valor de pH en el intervalo de 4 a 9, preferiblemente en el intervalo de 6 a 9, preferiblemente en el intervalo de 6 a 8 o 7 a 8. Normalmente se prefiere un pH más bajo (por ejemplo, aproximadamente pH neutro), como en el intervalo de 6 a 8 o 7 a 8, para evitar la degradación del biopolímero.

Los inventores han descubierto a través de una amplia experimentación que la adición de un agente reductor del pH también puede aumentar significativamente la velocidad de reacción de la reacción en la etapa a2), particularmente cuando se usa hidroxilamina. Este efecto es sorprendente y altamente ventajoso. Se observa que una adición correspondiente de un agente reductor de pH a una reacción de desacetilación de hidracina no dio como resultado ningún aumento de la velocidad de reacción. También se prefiere un valor de pH más bajo durante la reacción para evitar la degradación excesiva del biopolímero. Por lo tanto, según algunas realizaciones, el pH de la reacción se reduce a un valor en el intervalo de 4 a 9, preferiblemente en el intervalo de 6 a 9, preferiblemente en el intervalo de 6 a 8 o 7 a 8, mediante la adición de un agente reductor de pH. El agente reductor de pH puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en ácidos minerales, ácidos orgánicos y sales reductoras de pH y mezclas o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de ácidos minerales útiles incluyen, pero no se limitan a, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido yodhídrico, ácido bromhídrico y ácido fosfórico. Los ejemplos de ácidos orgánicos útiles incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido láctico, ácido benzoico y ácidos carboxílicos halogenados, tales como ácido trifluoroacético y ácido tricloroacético. Los ejemplos de sales útiles para reducir el pH incluyen, pero no se limitan a, cloruro de amonio, bromuro de amonio, yoduro de amonio, clorhidrato de hidroxilamina y sulfato de hidroxilamina. En una realización preferida, el agente reductor del pH comprende clorhidrato de hidroxilamina o sulfato de hidroxilamina, lo más preferiblemente clorhidrato de hidroxilamina. En algunas realizaciones, el agente reductor de pH es el ácido yodhídrico (HI). En algunas realizaciones, el agente reductor de pH es ácido trifluoroacético (TFA). Según algunas realizaciones, la reacción en la etapa a2) se realiza en atmósfera inerte y/o en la oscuridad.

Los productos obtenidos por el método de desacetilación descrito anteriormente pueden tener propiedades que difieren significativamente de los productos correspondientes obtenidos por otros métodos de desacetilación conocidos.

El producto de hidrogel obtenido por el método de la invención puede someterse opcionalmente a la etapa d) de acilación de grupos amino residuales de los glucosaminoglucanos reticulados proporcionados en la etapa c) para formar glucosaminoglucanos acilados reticulados. En la presente descripción este proceso también se denomina reacilación, o reacetilación.

Se ha encontrado que la acilación, por ejemplo, la acetilación de grupos amina libres residuales en un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglucano reticuladas con amida puede usarse para modificar las propiedades mecánicas del producto de hidrogel. Sin desear limitarse a ninguna explicación científica específica, se contempla que la acilación de los grupos amina libres puede reducir la formación de complejos zwitteriónicos que actúan como reticulaciones adicionales en el producto de hidrogel, dando como resultado la formación de un gel más blando.

Según algunas realizaciones, la etapa d) comprende acetilar grupos amina residuales de los glucosaminoglucanos reticulados proporcionados en la etapa c) para formar glucosaminoglucanos reticulados acetilados. Los glucosaminoglucanos en su forma natural están N-acetilados. Por lo tanto, se puede esperar que la acetilación de los grupos amina libres en un producto de hidrogel produzca un producto de hidrogel más similar a los glucosaminoglucanos naturales.

Según algunas realizaciones, la etapa d) comprende permitir que los glucosaminoglucanos reticulados proporcionados en la etapa c) reaccionen con un agente acetilante en condiciones de reacción adecuadas para formar glucosaminoglucanos reticulados acetilados.

Según algunas realizaciones, el agente acetilante se selecciona del grupo que consiste en anhídrido acético, acetato de isopropenilo y éster preactivado de ácido acético.

La reacetilación puede realizarse de acuerdo con el protocolo estándar usando, por ejemplo, anhídrido acético, acetato de isopropenilo o éster preactivado de ácido acético, típicamente en solución acuosa o alcohólica, o mezclas de los mismos, o en condiciones puras. Preferiblemente, el proceso de reacetilación puede realizarse en una reacción en estado sólido usando alcohol, preferiblemente metanol o etanol, un agente acetilante y, si se desea, una base orgánica o inorgánica.

El problema potencial de la sobreacetilación, la O-acetilación, la formación de éster y/o la formación de anhídrido puede abordarse incluyendo una etapa de tratamiento alcalino posterior a la reticulación. La etapa de reacetilación podría excluirse del proceso, para administrar hidrogeles zwitteriónicos, si se desea.

El producto de hidrogel obtenido por el método de la invención se somete opcionalmente a la etapa e) de someter los glucosaminoglucanos reticulados proporcionados en la etapa c) o d) a tratamiento alcalino para hidrolizar las reticulaciones de éster formadas como subproductos durante la reticulación de amida en la etapa c).

El acoplamiento amídico usando un agente de reticulación funcional di- o multiamina junto con un agente de acoplamiento es una ruta atractiva para preparar moléculas de glucosaminoglucano reticulado útiles para productos

de hidrogel. La reticulación puede lograrse usando un reticulante de di- o multinucleófilo no basado en carbohidratos, por ejemplo, hexametildiamina (HMDA), o un reticulante de di- o multinucleófilos basado en carbohidratos, por ejemplo, diaminotrehalosa (DATH) junto con un glucosaminoglucano. La reticulación también puede lograrse usando un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado, ya sea solo o en combinación con un segundo glucosaminoglucano, por lo que el glucosaminoglucano desacetilado en sí mismo actúa como el reticulante di- o multinucleófilo.

Se ha encontrado que las reacciones de acoplamiento o reticulación de glucosaminoglucanos usando agentes de acoplamiento para formar enlaces amida a menudo se asocian con la formación concurrente de una fracción de enlaces éster. El tamaño de la fracción de enlace éster puede variar dependiendo de las condiciones de reacción, las concentraciones y el agente de acoplamiento usado. Los enlaces éster son más susceptibles a la degradación durante la manipulación y el almacenamiento de los productos de hidrogel, por ejemplo, la esterilización a alta temperatura (autoclave), en comparación con los enlaces amida. Esto significa que las propiedades de los productos de hidrogel que comprenden enlaces éster, o una combinación de enlaces éster y amida, tenderán a cambiar con el tiempo a medida que los enlaces éster se degraden. Para obtener hidrogeles que mantengan sus propiedades originales durante un período de tiempo más largo, es preferible que los glucosaminoglucanos estén reticulados mediante enlaces amida.

Los presentes inventores han descubierto ahora que someter los glucosaminoglucanos reticulados que tienen reticulaciones amida y éster a un tratamiento alcalino puede hidrolizar las reticulaciones de éster formadas como subproductos durante la reticulación de amida sin degradar simultáneamente los enlaces amida. Se ha encontrado además que, tras la selección de condiciones de reacción adecuadas, la hidrólisis de los enlaces éster puede lograrse sin una degradación indebida de la cadena principal de glucosaminoglucanos.

El método de preparación de un producto de hidrogel opcionalmente comprende la etapa d) de acilar grupos amino residuales de los glucosaminoglucanos reticulados proporcionados en la etapa c) para formar glucosaminoglucanos reticulados acilados.

La acilación, por ejemplo, la acetilación de grupos amina libres residuales en un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglucano reticulado con amida puede usarse para modificar las propiedades mecánicas del producto de hidrogel. Sin desear limitarse a ninguna explicación científica específica, se contempla que la acilación de los grupos amina libres puede reducir la formación de complejos zwitteriónicos que actúan como reticulaciones adicionales en el producto de hidrogel, dando como resultado la formación de un gel más blando.

Según algunas realizaciones, la etapa d) comprende acetilar grupos amina residuales de los glucosaminoglucanos reticulados proporcionados en la etapa c) para formar glucosaminoglucanos reticulados acetilados. Los glucosaminoglucanos en su forma natural están N-acetilados. Por lo tanto, se puede esperar que la acetilación de los grupos amina libres en un producto de hidrogel produzca un producto de hidrogel más similar a los glucosaminoglucanos naturales.

La acilación de glucosaminoglucanos usando un agente de acilación para formar enlaces amida a menudo se asocia con la formación concurrente de una fracción de enlaces éster. El tamaño de la fracción de enlace éster puede variar dependiendo de las condiciones de reacción, las concentraciones y el agente de acilación usado. Los enlaces éster son más susceptibles a la degradación durante la manipulación y el almacenamiento de los productos de hidrogel, por ejemplo, la esterilización a alta temperatura (autoclave), en comparación con los enlaces amida. Esto significa que las propiedades de los productos de hidrogel que comprenden enlaces éster, o una combinación de enlaces éster y amida, tenderán a cambiar con el tiempo a medida que los enlaces éster se degraden. Para obtener hidrogeles que mantengan sus propiedades originales durante un período de tiempo más largo, es preferible que los glucosaminoglucanos estén acilados mediante enlaces amida.

Los presentes inventores ahora han descubierto que someter los glucosaminoglucanos reticulados acilados que tienen reticulaciones amida y éster al tratamiento alcalino puede hidrolizar los enlaces éster formados durante la acilación sin degradar simultáneamente los enlaces amida. Se ha encontrado además que, tras la selección de condiciones de reacción adecuadas, la hidrólisis de los enlaces éster puede lograrse sin una degradación indebida de la cadena principal de glucosaminoglucanos.

El tratamiento alcalino hidroliza selectivamente los enlaces éster menos estables del proceso de reticulación, o la formación de O-acetilación y anhídrido del proceso de reacetilación y da como resultado una relación de enlace amida/éster incrementada en el material.

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.

El término "peso molecular" como se usa en la presente descripción en relación con varios polímeros, por ejemplo, polisacáridos, se refiere al peso molecular promedio en peso, M_w , de los polímeros, que está bien definido en la literatura científica. El peso molecular promedio en peso puede determinarse, por ejemplo, por dispersión de luz

estática, dispersión de neutrones de ángulo pequeño, dispersión de rayos X y velocidad de sedimentación. La unidad del peso molecular es Da o g/mol.

5 El experto en la técnica se da cuenta de que la presente invención de ninguna manera está limitada a las realizaciones preferidas descritas en la presente descripción. Por el contrario, son posibles muchas modificaciones y variaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, las variaciones de las realizaciones descritas pueden entenderse y efectuarse por la persona experta en llevar a cabo la invención reivindicada, a partir de un estudio de los dibujos, la descripción y las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, la palabra "que comprende" no excluye otros elementos o etapas y el artículo indefinido "un" o "una" no excluye una pluralidad. El mero hecho de que ciertas medidas se mencionen en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que una combinación de estas medidas no se pueda usar con ventaja.

Ejemplos

15 Sin desear limitarse a ello, la presente invención se ilustrará a continuación a modo de ejemplos.

Definiciones y análisis

20 **Mw** - Masa molecular promedio en masa

SwF - Análisis del factor de hinchamiento en solución salina, volumen para un gel de 1 g que se ha hinchado al máximo (ml/g)

25 **SwC** - Capacidad de hinchamiento en solución salina, absorción total de líquido por gramo de PS (ml/g).

SwCC_{PS} - Grado de hinchamiento corregido, absorción total de líquido de un gramo de PS, corregido para GelP (ml/g).

30
$$SwCC_{PS} = \frac{SwF}{GelP * [HA]}$$

[PS] - Concentración de polisacárido (mg/g).

35 **GelP** - Parte de gel es una descripción del porcentaje de PS que forma parte de la red de gel. Un número de 90 % significa que 10 % del polisacárido no forma parte de la red de gel.

CrD_{amida} - Grado de reticulación de amida (%) se analizó con SEC-MS y se define como:

40
$$CrD_{amida} = \frac{n_{reticulaciones\ de\ amida}}{n_{disacáridos\ de\ HA}}$$

45
$$CrD_{amida} = \frac{\Sigma(\text{Área de fragmentos de HA reticulados con amida})}{\Sigma(\text{Área de fragmentos de HA reticulados con amida} + \text{Área de fragmentos de amina HA}) * (100 - DoA)}$$

50 **DoA** - Grado de acetilación. El grado de acetilación (DoA) es la relación molar de los grupos acetilo en comparación con los disacáridos de ácido hialurónico. El DoA puede calcularse a partir de espectros de RMN comparando la integral de la señal de acetilo de los residuos de disacárido de hialuronano con la integral de la señal de C2-H de los residuos de glucosamina desacetilada de acuerdo con la ecuación.

55
$$DoA (\%) = \left(\frac{\frac{Integral\ grupo\ acetilo}{3}}{\frac{Integral\ grupo\ acetilo}{3} + Integral\ C2 - H} \right) * 100$$

60 **RMN** - Los espectros de ¹H RMN se registraron en un espectrómetro Bruker 400 Biospin AVANCE. Los cambios químicos se informan como valores δ a campo bajo del TMS interno en soluciones orgánicas apropiadas. La pureza y las estructuras de los productos se confirmaron por LCMS (254 nm) en un sistema detector de matriz de fotiodo Waters 2690 usando las siguientes condiciones: Columna, Symmetry C-18; Disolvente A, agua ácido fórmico al 0,1 %; Disolvente B, CH₃CN; caudal, 2,5 ml/min; tiempo de ejecución, 4,5 min; gradiente, de 0 a 100 % de disolvente B; detector de masa, micro masa ZMD. Las purificaciones se llevaron a cabo directamente

65

mediante una columna preparativa LCMS Waters X-Terra de fase inversa activada por masa (C-18, sílice 5 micras, 19 mm de diámetro, 100 mm de longitud, caudal de 40 ml/minuto) y mezclas de agua decrecientemente polares (que contiene ácido fórmico al 0,1 %) y acetonitrilo como eluyente. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar los compuestos finales, generalmente como sólidos.

Ejemplo 1 - Desacetilación de ácido hialurónico por hidroxilaminólisis

Se solubilizaron 0,2 g o 20 g de HA (Mw 2 500 kDa, DoA 100 %) en hidroxilamina (solución Sigma-Aldrich 50 % vol), o una mezcla de hidroxilamina/agua como se indica en la Tabla 1. La solución se incubó en la oscuridad y bajo argón a 30 - 70 °C durante 5 a 353 horas. Después de la incubación, la mezcla se precipitó con etanol. El precipitado obtenido se filtró, se lavó con etanol y luego se redisolvió en agua. La solución se purificó por ultrafiltración y posteriormente se liofilizó para obtener el HA desacetilado (HA de-Ac) como un sólido blanco. Los Ejemplos 1-1 a 1-14 se realizaron usando aproximadamente 0,2 g de HA y los Ejemplos 1-15 a 1-16 se realizaron usando 20 g de HA. La desacetilación por hidroxilaminólisis es más eficiente y conserva mejor el Mw de la cadena principal de HA en comparación con la hidracinólisis (Ejemplo 2) y los métodos alcalinos (Ejemplo 3 y 4).

Tabla 1.

Ejemplo	Temp. (°C)	Tiempo (h)	pH	Condiciones	Mw inicial (kDa)	RMN DoA (%)	Mw (kDa)
1-1	30	24	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	99	970 ^a
1-2	30	72	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	98	1060 ^a
1-3	30	196	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	95	1060 ^a
1-4	40	24	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	98	1050 ^a
1-5	40	72	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	95	980 ^a
1-6	40	353	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	80	490 ^a
1-7	40	24	10	NH ₂ OH (35 % en peso en agua)	2500	99	1090 ^a
1-8	40	24	10	NH ₂ OH (20 % en peso en agua)	2500	100	1130 ^a
1-9	40	24	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	1000	98	670 ^b
1-10	55	5	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	99	1010 ^a
1-11	55	72	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	86	740 ^a
1-12	55	120	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	78	400 ^b
1-13	60	24	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	92	930 ^b
1-14	70	24	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	86	720 ^b
1-15	40	72	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	95	1870 ^b
1-16	55	72	10	NH ₂ OH (50 % en peso en agua)	2500	89	1050 ^b

a: SEC-UV b: SEC-MALS

Se solubilizaron 0,2 g de HA (Mw 2 500 kDa, DoA 100 %) en 10 ml de una solución al 1 % de sulfato de hidracina en monohidrato de hidracina como se expone en la Tabla 2. La reacción tuvo lugar en la oscuridad y bajo argón a 30 a 55 °C durante 24 a 120 horas. La mezcla se precipitó con etanol. El precipitado obtenido se filtró, se lavó con etanol y luego se volvió a disolver en agua. El producto HA desacetilado final se obtuvo después de la ultrafiltración y se liofilizó. La desacetilación por hidracinólisis produce una mayor degradación de la cadena principal de HA, es decir, un Mw más bajo del producto desacetilado en comparación con la hidroxilaminólisis (Ejemplo 1).

Tabla 2.

Ejemplo	Temp (°C)	Tiempo (h)	pH	Condiciones	DoA (%)	Mw (SEC MALS) (kDa)
2-1	30	24	13	NH ₂ NH ₂ + NH ₂ NH ₂ H ₂ SO ₄	100	220
2-4	30	120	13	NH ₂ NH ₂ + NH ₂ NH ₂ H ₂ SO ₄	96	320
2-6	40	48	13	NH ₂ NH ₂ + NH ₂ NH ₂ H ₂ SO ₄	96	260
2-8	40	120	13	NH ₂ NH ₂ + NH ₂ NH ₂ H ₂ SO ₄	92	170
2-9	55	24	13	NH ₂ NH ₂ + NH ₂ NH ₂ H ₂ SO ₄	93	60
2-10	55	48	13	NH ₂ NH ₂ + NH ₂ NH ₂ H ₂ SO ₄	89	70
2-11	55	72	13	NH ₂ NH ₂ + NH ₂ NH ₂ H ₂ SO ₄	83	40
2-12	55	120	13	NH ₂ NH ₂ + NH ₂ NH ₂ H ₂ SO ₄	77	50

Ejemplo 3 - Desacetilación de ácido hialurónico por hidrólisis alcalina homogénea - Ejemplo comparativo

Se pesó HA (1000 kDa) en un recipiente de reacción, se añadió solución de NaOH y la reacción se mezcló hasta que se obtuvo una solución homogénea. La mezcla se incubó como se expone en la Tabla 3 sin agitar y posteriormente se diluyó con agua y EtOH. La mezcla se neutralizó añadiendo HCl 1,2 M, se precipitó añadiendo EtOH. El precipitado se lavó con etanol (70 % p/p) seguido de etanol y se secó al vacío durante la noche para obtener un sólido. La desacetilación por hidrólisis alcalina homogénea produce una mayor degradación de la cadena principal del HA, es decir, un Mw más bajo del producto desacetilado en comparación con la hidroxilaminólisis (Ejemplo 1).

Tabla 3.

Ejemplo	Temp (°C)	Tiempo (h)	pH	Condiciones	DoA (%)	Mw (SEC UV) (kDa)
3-1	65	4	13	1 M NaOH (ac.)	99	10

Ejemplo 4 - Desacetilación de ácido hialurónico por hidrólisis alcalina heterogénea - Ejemplo comparativo

Se pesó HA (1000 kDa) en un recipiente de reacción y se añadió NaOH en EtOH (70 % p/p) como se expone en la Tabla 4. La mezcla heterogénea se incubó y posteriormente se neutralizó mediante la adición de HCl 1,2 M. El precipitado se lavó con etanol (75 % p/p) seguido de etanol y se secó al vacío durante la noche para obtener un sólido.

La desacetilación por hidrólisis alcalina heterogénea produce una mayor degradación de la cadena principal de HA, es decir, un Mw más bajo del producto desacetilado en comparación con la hidroxilaminólisis (Ejemplo 1).

Tabla 4.

Ejemplo	Temp (°C)	Tiempo (h)	Condiciones	DoA (%)	Mw (SEC UV) (kDa)
4-1	35	24	NaOH 1,0 M (EtOH al 70 %)	99	60

Ejemplo 5: Reticulación de HA desacetilado

El agente de acoplamiento DMTMM se disolvió en tampón de fosfato de Na (pH 7,4) y de ser necesario, el pH se ajustó en la mezcla de DMTMM y la solución se añadió posteriormente a HA desacetilado. La mezcla de reacción se homogeneizó mediante agitación durante 3,5 minutos y mezclando con una espátula o presionando la mezcla a

través de un filtro. La mezcla de reacción se colocó en un baño de agua a 35 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante la eliminación del baño de agua y el gel se cortó en trozos pequeños con una espátula o se presionó a través de un filtro. La mezcla de reacción se ajustó a pH > 13 con NaOH 0,25 M, se agitó durante aproximadamente 60 minutos y posteriormente se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, los geles se precipitaron en etanol y se lavaron con etanol (70 % p/p) y se secaron al vacío durante la noche. Los geles secos se hincharon en tampón de fosfato en NaCl al 0,7 % durante al menos dos horas. El pH se controló y se ajustó de ser necesario a 7,4. Las partículas de gel se redujeron de tamaño con un filtro fino. El gel se llenó con jeringas y las jeringas se esterilizaron en autoclave. Los resultados presentados en la Tabla 5 muestran la formación de hidrogeles mediante reticulación de HA desacetilado con diferentes Mw y DoA, usando DMTMM.

Tabla 5.

Ejemplo	Mw inicial (kDa)	DoA inicial (%)	DMTMM (% mol)	SwCC _{PS} (ml/g)	GelP (%)	CrD _{amida}
5-1	110	82	2,3	256	54	0,5
5-2	110	82	2,6	127	67	0,5
5-3	160	89	0,9	150	68	0,2
5-4	160	89	1,2	95	74	0,2
5-5	240	93	1,25	137	71	0,4
5-6	240	93	1,5	89	80	NA
5-7	670	87	4,0	95	83	1,0
5-8	670	87	5,0	54	93	1,2
5-9	390	85	4,5	402	54	0,6
5-10	390	85	5,0	367	58	0,6
5-11	550	85	2,9	223	61	0,6
5-12	550	85	3,2	148	66	0,7
5-14	570	86	3,0	747	15	0,5
5-15	570	86	3,3	542	32	0,6
5-16	920	89	2,0	209	48	0,3

Ejemplo 6: Reticulación de una mezcla de HA desacetilado y HA

El HA y el HA desacetilado se disolvieron en 40 ml de agua (Milli-Q) en un tubo Falcon de 50 ml con agitación vertical durante 24 horas. Después de la disolución completa, las muestras se liofilizaron. El agente de acoplamiento DMTMM se disolvió en tampón de fosfato de Na (pH 7,4), se midió el pH en la mezcla DMTMM y se añadió posteriormente a la mezcla liofilizada. La mezcla de reacción se homogeneizó y se colocó en un baño de agua a 35 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante la eliminación del baño de agua y el gel se cortó en trozos pequeños con una espátula. La mezcla de reacción se ajustó a pH > 13 con NaOH 0,25 M durante aproximadamente 60 minutos. Los geles se neutralizaron con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, los geles se precipitaron con etanol y se lavaron con etanol (70 %) y se secaron al vacío durante la noche. Los geles secos se hincharon en tampón de fosfato en NaCl al 0,7 % durante al menos dos horas. El pH se controló y se ajustó de ser necesario a 7,4. Las partículas de gel se redujeron de tamaño con un filtro fino. El gel se llenó con jeringas y las jeringas se esterilizaron en autoclave. Los resultados presentados en la Tabla 5 muestran la formación de hidrogeles por reticulación de HA desacetilado con HA usando DMTMM.

Tabla 6.

Ej	Mw del HA DeAc inicial (kDa)	DoA del HA DeAc inicial (%)	Mw del HA inicial (kDa)	HA/HAdAc (%)	DMTMM (% mol)	SwCC _{PS} (ml/g)	GelP (%)	CrD _{amida}
6-1	110	82	1000	50/50	1	385	39	0,4
6-2	110	82	1000	25/75	0,74	145	35	0,5

Ejemplo 7: Reticulación de una mezcla de HA desacetilado HMW y HA desacetilado LMW

El HA desacetilado de dos Mw diferentes se mezclaron entre sí. El agente de acoplamiento DMTMM se disolvió en tampón de fosfato de Na (pH 7,4) y de ser necesario, el pH se ajustó en la mezcla DMTMM y la solución se añadió posteriormente al HA desacetilado. La mezcla de reacción se homogeneizó mezclando con una espátula o presionando la mezcla a través de un filtro. La mezcla de reacción se colocó en una incubadora a 23 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo por eliminación de la incubadora y el gel se cortó en trozos pequeños con una espátula o se presionó a través de un filtro. La mezcla de reacción se ajustó a pH > 13 con NaOH 0,25 M, se agitó durante aproximadamente 60 minutos y posteriormente se neutralizó a pH 7,4 con HCl 1,2 M.

Tabla 7.

Ej	MwLMW de HA DeAc inicial (kDa)	DoA del HA DeAc LMW inicial (%)	Mw HMW HA inicial (kDa)	DoA del HA DeAc HMW inicial (%)	LMW/HMW (%)	DMTMM (% mol)	SwF (ml/g)	G' (0,1 Hz; Pa)
7-1	110	95	920	89	25/75	3	3	80

Ejemplo 8 - Reacetilación heterogénea de un hidrogel

El agente de acoplamiento DMTMM se disolvió en tampón de fosfato de Na (pH 7,4) y de ser necesario, el pH se ajustó en la mezcla de DMTMM y la solución se añadió posteriormente a HA desacetilado. La mezcla de reacción se homogeneizó mediante agitación durante 3,5 minutos y mezclando con una espátula o presionando la mezcla a través de un filtro. La mezcla de reacción se colocó en un baño de agua a 35 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante la eliminación del baño de agua y el gel se cortó en trozos pequeños con una espátula o se presionó a través de un filtro. La mezcla de reacción se ajustó a pH > 13 con NaOH 0,25 M, se agitó durante 60 minutos y posteriormente se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, los geles se precipitaron en etanol y se lavaron con etanol (70 % p/p) y se secaron al vacío durante la noche.

El gel precipitado se suspendió en MeOH y se añadió Ac₂O (20 equiv./HA disacárido). La suspensión se incubó a 40 °C durante 24 horas seguido de filtración, el sólido obtenido se lavó con EtOH al 70 % p/p, se lavó con EtOH y posteriormente se secó al vacío durante la noche. El gel acetilado se disolvió en NaOH 0,25 M, se agitó durante 60 minutos y posteriormente se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, los geles se precipitaron en etanol y se lavaron con etanol (70 % p/p) y se secaron al vacío durante la noche. Los geles secos se hincharon en tampón de fosfato en NaCl al 0,7 % durante al menos dos horas.

Como un experimento de control (Ejemplo 8-3), se suspendió HA (310 kDa) en MeOH y se añadió Ac₂O (20 equiv./HA disacárido). La suspensión se incubó a 40 °C durante 24 horas seguido de filtración, el sólido obtenido se lavó con EtOH al 70 % p/p, con EtOH y posteriormente se secó al vacío durante la noche. El producto se disolvió en NaOH 0,25 M, se agitó durante 60 minutos y posteriormente se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, los geles se precipitaron en etanol y se lavaron con etanol (70 % p/p) y se secaron al vacío durante la noche. Se analizó el Mw del producto obtenido. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8.

Ej	Mw inicial (kDa)	DoA inicial (%)	DMTMM (% mol)	DoA (%) Gel en polvo	[PS] (mg/ml)	GelP (%)	SwCC _{PS} (ml/g)	DoA (%) después de la acetilación	Mw SEC-UV (kDa)
	Reacción de reticulación			Gel precipitado antes de la acetilación	Gel después de la acetilación				
8-1	240	93	1,3	94	29	79	126	98	NA
8-2	110	82	2,7	84	29	91	60	95	NA
8-3	310	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	220

El agente de acoplamiento DMTMM se disolvió en tampón de fosfato de Na (pH 7,4) y el pH se controló y ajustó de ser necesario. La solución DMTMM se añadió posteriormente al HA desacetilado. La suspensión se homogeneizó mediante agitación durante 3,5 minutos y mezclando con una espátula o presionando la mezcla a través de un filtro. La mezcla de reacción se colocó en una incubadora a 23 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante la eliminación de la incubadora y el gel se mezcló con una espátula o se presionó a través de una malla de acero de 1

mm dos veces. Siguió la adición de NaOH 0,25 M al material resultante (pH > 13) y mezclado durante 60 minutos y posteriormente se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, el tamaño de partícula de los geles se redujo a través de un filtro fino. Luego, los geles se precipitaron en EtOH y se lavaron con 70 % p/p de EtOH y EtOH. El material resultante se secó al vacío durante la noche.

5 El polvo de gel precipitado se añadió a agua desionizada y se dejó mezclar durante 60 minutos. Se añadieron trietanolamina (1,5 equiv./HA disacárido) y Ac₂O (1 equiv./HA disacárido) a la suspensión de gel. La mezcla de reacción se mezcló a 23 °C durante 60 minutos. Seguido de la adición de NaOH 0,25 M al gel acetilado (pH > 13), se mezcló durante 45 minutos y posteriormente se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, el gel se precipitó en EtOH y se lavó con 70 % p/p de EtOH + NaCl 100 mM, 70 % p/p de EtOH seguido de EtOH y se secó al vacío durante la noche. El gel seco se hinchó en tampón de fosfato de Na a temperatura ambiente durante al menos dos horas y luego se redujo el tamaño de partícula a través de un filtro fino.

15 Como experimento de control (Ejemplo 9-3), se añadió HA desacetilado (1700 kDa) al agua desionizada y se dejó mezclar durante 60 minutos. Trietanolamina (1,2 equiv./HA disacárido) y Ac₂O (1 equiv./HA disacárido) se añadieron a la mezcla de HA. La mezcla de reacción se mezcló a 23 °C durante 60 minutos seguido de la adición de NaOH 0,25 M (pH > 13), se mezcló durante 40 minutos y posteriormente se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, la mezcla se precipitó en EtOH y se lavó con 70 % p/p de EtOH + NaCl 100 mM, 70 % p/p de EtOH seguido de EtOH y se secó al vacío durante la noche. Se analizó el Mw y DoA del producto obtenido. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9.

Ej	Mw inicial (kDa)	DoA inicial (%)	DMTMM (% mol)	DoA (%) Gel en polvo	[PS] (mg/ml)	GelP (%)	SwCC _{PS} (ml/g)	DoA (%) después de la acetilación	Mw SEC-UV (kDa)
	Reacción de reticulación			Gel precipitado antes de la acetilación	Gel después de la acetilación				
9-1	1700	95	2,4	95	22	70	115	100	NA
9-2	1700	95	2,7	95	21	59	165	100	NA
9-3	1700	95	NA	NA	NA	NA	NA	99	1500

Ejemplo 10 - Hidrólisis alcalina del gel de HA reticulado

40 El agente de acoplamiento DMTMM se disolvió en tampón de fosfato de Na (pH 7,4) y de ser necesario, el pH se ajustó en la mezcla DMTMM y la solución se añadió posteriormente a HA desacetilado. La mezcla de reacción se homogeneizó mediante agitación durante 3,5 minutos y mezclando con una espátula o presionando la mezcla a través de un filtro. La mezcla de reacción se colocó en un baño de agua a 35 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante la eliminación del baño de agua y el gel se cortó en trozos pequeños con una espátula o se presionó a través de un filtro.

50 El gel se dividió en dos partes, para una parte del gel se ajustó el pH a pH > 13 con NaOH 0,25 M y se agitó durante aproximadamente 60 minutos y posteriormente se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, los geles se precipitaron en etanol y se lavaron con etanol (70 % p/p) seguido de etanol y se secaron al vacío durante la noche. Si se decide, el gel seco se hinchó en tampón fosfato en NaCl al 0,7 % a temperatura ambiente durante al menos dos horas y luego se redujo el tamaño de partícula a través de un filtro fino. De ser necesario el pH del gel se controló y se ajustó a 7,2 a 7,5.

55 La segunda parte del gel se diluyó con agua y el pH se ajustó a 6,5 a 7,5. Después de la neutralización, los geles se precipitaron con etanol y se lavaron con etanol (70 % p/p) seguido de etanol y se secaron al vacío durante la noche. Si se decide, el gel seco se hinchó en tampón fosfato en NaCl al 0,7 % a temperatura ambiente durante al menos dos horas y luego se redujo el tamaño de partícula a través de un filtro fino. De ser necesario el pH del gel se controló y se ajustó a 7,2 a 7,5.

60 El tratamiento alcalino se realiza para hidrolizar enlaces éster intermoleculares e intramoleculares formados entre cadenas de HA durante la etapa de reticulación y potenciales O-acetatos y anhídridos formados durante la etapa de reacetilación, así como los ésteres activos residuales formados por el reactivo de acoplamiento. La hidrólisis alcalina produce exclusivamente enlaces amida en el material.

65 Como un experimento de control (Ejemplo 10-13 a 10-15, Tabla 10.3), se añadió HA al tampón de fosfato de Na (pH 7,4). La mezcla de reacción se homogeneizó mediante agitación durante 3,5 minutos y presionando la mezcla a

través de un filtro. La mezcla de reacción se colocó en un baño de agua a 5, 35 o 50 °C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante la eliminación del baño de agua y la mezcla se presionó a través de un filtro. La mezcla se ajustó a pH > 13 con NaOH 0,25 M durante 60-100 minutos. La mezcla se neutralizó con HCl 1,2 M. Después de la neutralización, se precipitó HA con etanol y se lavó con etanol (70 %), se lavó con etanol y se secó al vacío durante la noche. Se analizó el Mw del producto obtenido. Los resultados resumidos en las Tablas 10.1-10.3 muestran que el tratamiento alcalino posterior a la reticulación proporciona al gel mayores propiedades de hinchamiento y menor CrD.

Tabla 10.1

Ej.	Mw inicial (kDa)	DoA inicial (%)	DMTMM (% mol)	Tiempo (min)	SwC (ml/g)	SwCC _{PS}	GeIP (%)	[PS] (mg/ml)
10-1	240	95	25	0	14	NA	NA	NA
10-2	240	95	25	60	18	NA	NA	NA
10-3	100	82	2,6	0	NA	55	91	50
10-4	100	82	2,6	60	NA	79	82	46
10-5	670	87	6,0	0	23	NA	NA	NA
10-6	670	87	6,0	60	35	NA	NA	NA
10-7	670	87	7,9	0	19	NA	NA	NA
10-8	670	87	7,9	60	27	NA	NA	NA

Tabla 10.2

Ej.	Mw inicial (kDa)	DoA inicial (%)	DMTMM (% mol)	Tiempo (min)	CrD*
10-9	1700	95	2,4	0	0,34
10-10	1700	95	2,4	60	0,30
10-11	950	89	4,0	0	0,88
10-12	950	89	4,0	60	0,73

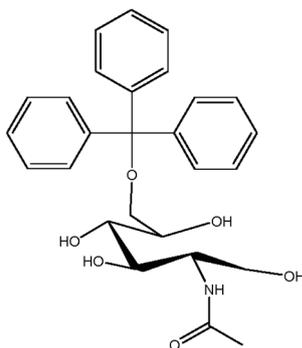
*CrD para geles no alcalinos tratados en la Tabla 10.2 también incluye reticulaciones de éster.

Tabla 10.3

Ej.	Mw inicial (kDa)	Temp (°C)	Tiempo (min)	Mw final (kDa)
10-13	1360	5	100	1340 ^b
10-14	920	35	60	860 ^a
10-15	1360	50	70	1230 ^b

a: SEC-UV b: SEC-MALS

Ejemplo 11 - Preparación de N-((2R,3R,4S)-1,3,4,5-tetrahidroxi-6-(triloxi)hexan-2-il)acetamida



5

10

15

20

Una solución de *N*-((2*R*,3*S*,5*S*)-2,4,5-trihidroxi-6-tritiloximetil-tetrahidropiran-3-il)-acetamida (556 mg, 1,20 mol, 1,00 eq.) en una mezcla de THF-H₂O (20 ml, 4:1) a temperatura ambiente, se trató con borohidruro de sodio sólido (49,92 mg, 1,32 mol, 1,10 eq.) [desprendimiento de gas]. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, se concentró a sequedad para proporcionar *N*-((2*R*,3*R*,4*S*)-1,3,4,5-tetrahidroxi-6-(tritiloxi)hexan-2-il)acetamida (500 mg, 89,54 %) como un sólido blanco que se usó sin purificación adicional. LCMS: $t_R = 1,01$ min., pureza = 100 %; ES+, 464,26 (M-H).

Ejemplo 12 - Desacetilación de *N*-((2*R*,3*R*,4*S*)-1,3,4,5-tetrahidroxi-6-(tritiloxi)hexan-2-il)acetamida

25

Una suspensión de *N*-((2*R*,3*R*,4*S*)-1,3,4,5-tetrahidroxi-6-(tritiloxi)hexan-2-il)acetamida (1 eq) en hidroxilamina (10 volúmenes) ya sea tratado con aditivos ácidos para reducir el pH a 7 o no como se expone en la Tabla 11, Ejemplos 12-1 a 12-9. La mezcla se calentó a 80 °C hasta que se alcanzó la conversión completa de la desacetilación. La desacetilación de *N*-((2*R*,3*R*,4*S*)-1,3,4,5-tetrahidroxi-6-(tritiloxi)hexan-2-il)acetamida con hidracina (pH 13) en las mismas condiciones que en el Ejemplo 2 también se incluye como Ejemplo 13-10.

30

Los resultados se muestran en la Tabla 11. Los resultados muestran que el procedimiento de desacetilación avanza considerablemente más rápido con hidroxilamina que con hidracina y es significativamente mediante la adición de un agente reductor de pH.

35

Tabla 11.

Ejemplo	Disolvente (50 vols)*	Aditivo	pH	Tiempo para alcanzar 100 % de conversión
12-1	50 % NH ₂ OH (ac)	Ninguno	10,2	72 h
12-2	50 % NH ₂ OH (ac)	HCl	7	12 h
12-3	50 % NH ₂ OH (ac)	HBr	7	9 horas
12-4	50 % NH ₂ OH (ac)	HI	7	5 h
12-5	50 % NH ₂ OH (ac)	H ₂ SO ₄	7	29 h
12-6	50 % NH ₂ OH (ac)	CH ₃ COOH	7	6 h
12-7	50 % NH ₂ OH (ac)	TFA	7	4 h
12-8	50 % NH ₂ OH (ac)	(CH ₃) ₃ COOH	7	5 h
12-9	50 % NH ₂ OH (ac)	CH ₃ CH ₂ COOH	7	8 h
12-10	NH ₂ NH ₂ .H ₂ O	Ninguno	13	120 h

55

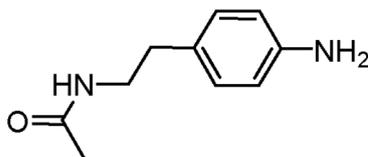
Las mezclas de reacción se purificaron directamente por LCMS preparativa para proporcionar (2*R*,3*R*,4*S*)-2-amino-6-(tritiloxi)hexano-1,3,4,5-tetraol como un sólido blanco. LCMS: $t_R = 0,88$ min., pureza = 99 %; ES+, 422,11 (M-H).

60

¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 7,47 – 7,37 (m, 6H), 7,30 (dd, *J* = 8,3, 6,7 Hz, 6H), 7,26 – 7,15 (m, 3H), 3,92 (m, 1 H), 3,83 – 3,74 (m, 1 H), 3,62 – 3,53 (m, 1 H), 3,52 – 3,41 (m, 1 H), 3,34 – 3,27 (m, 1 H), 3,22 – 3,16 (m, 1 H), 3,13 – 3,04 (m, 1H), 3,01 – 2,91 (m, 1H)

Ejemplo 13 - Preparación de *N*-(4-aminofeniletil)acetamida

5



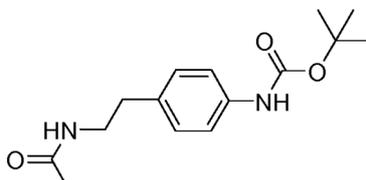
10 Se añadió una 4-(2-aminoetil)anilina (1,50 g; 11,01 mmol; 1,00 eq.) a acetato de *p*-cresilo puro (1,65 g, 11,0 mmol, 1,00 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 h. La solución naranja resultante se absorbió directamente sobre gel de sílice y se purificó por cromatografía instantánea (gel de sílice, DCM/MeOH 0 a 5 %) para proporcionar *N*-(4-aminofeniletil)acetamida (1,76 g, rendimiento del 89,7 %)

LCMS: $t_R = 0,58$ min., pureza = 99,5 %; ES+, 179,5 (M+H)⁺.

15 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,78 (s, 3H), 2,50 (m, 2H oculto por la señal DMSO) 3,14 (m, 2H), 4,83 (s, 2H), 6,49 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 6,84 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,82 (s, 1H).

Ejemplo 14 - Preparación de *tert*-butil(4-(2-acetamidoetil)fenil)carbamato

20



25

30 A una solución agitada de *N*-[2-(4-Amino-fenil)-etil]-acetamida (500 mg, 2,81 mmol, 1,00 eq.) en DCM (20 ml) a temperatura ambiente, se añadió trietilamina (0,51 ml, 3,65 mmol, 1,30 eq.) seguido de dicarbonato de di-*tert*-butilo (673,48 mg, 3,09 mmol, 1,10 eq.). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h, se lava con agua (5 ml), una solución saturada de NaHSO₄ (ac) (5 ml) y agua (3 x 5 ml), se seca sobre MgSO₄ y se concentra a sequedad hasta proporcionar *tert*-butil (4-(2-acetamidoetil)fenil)carbamato (496 mg, 63 % de rendimiento) como un sólido naranja pálido.

35 LCMS: $t_R = 1,11$ min, pureza = 100 %; ES +, 279,5 (M+H).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 1H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,57 (s, 9H), 1,87 (s, 3H), 2,75 – 2,64 (m, 2H), 3,36 – 3,20 (m, 2H), 7,27 – 7,07 (m, 2H), 7,45 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,94 (t, *J* = 5,6 Hz, 1 H), 9,31 (s, 1H).

Ejemplo 15 - Preparación de NH₂OH.HI

40

A una solución agitada de NH₂OH 50 % (ac) (9,28 ml, 0,15 mol, 1,00 eq) a 0 °C se añadió gota a gota cuidadosamente HI 57 % (ac) durante un período de 5 minutos hasta que se alcanzó un pH de 7. Se formó un sólido cristalino blanco denso que se recogió por filtración, se lavó cuidadosamente con agua helada para proporcionar yoduro de hidrógeno e hidroxilamina (6,80 g, 28 %).

45

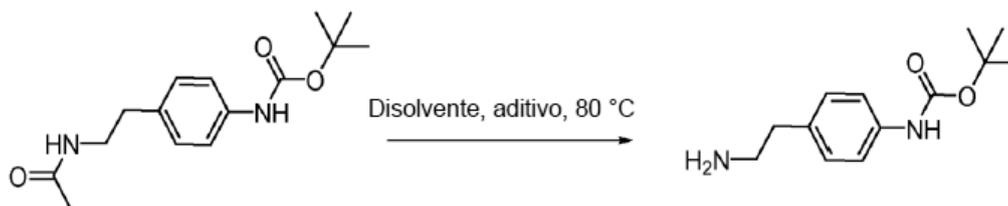
Ejemplo 16 - Preparación de NH₂OH.TFA

50 A una solución agitada de NH₂OH 50 % (ac) (9,28 ml, 0,15 mol, 1,00 eq) a 0 °C se añadió cuidadosamente gota a gota TFA durante un período de 5 minutos hasta que se alcanzó un pH de 7. La mezcla de reacción se concentró bajo un rociado de nitrógeno para proporcionar hidroxilamina.trifluoroacetato (11,0 g, 98 %) como un aceite incoloro claro.

Ejemplo 17 - Estudios comparativos de NH₂OH y sales de la misma frente a los agentes de transamidación comúnmente usados como NH₂NH₂.H₂O y NaOH

55

60



ES 2 812 223 T3

A una solución / suspensión agitada de *terc*-butil (4-(2-acetamidoetil)fenil)-carbamato (50 mg, 0,18 mmol) en el disolvente elegido (5 volúmenes) se añadió la sal (5 eq) y la mezcla resultante se calentó a 80 °C durante el tiempo necesario para completar la reacción. Los resultados se resumen en la Tabla 12.

- 5 LCMS: $t_R = 0,81$ min., pureza = 100 %; ES+, 237,51 (M+H)⁺.
¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 1H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,26 (s, 1 H), 8,40 (s, 1H), 7,38 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,11 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 2,89 (m, 2H), 2,80 – 2,63 (m, 2H), 1,47 (s, 9H) (aislado como sal de formiato).

Tabla 12.

Ejemplo	Disolvente (5 vols)*	Aditivo	pH	1 h (% conv.)	2 h (% conv.)	4 h (% conv.)
17-1	50 % NH ₂ OH (ac)	Ninguno	10,2	34,8	64,7	83,0
17-2	50 % NH ₂ OH (ac)	5 eq NH ₂ OH.HI	9	48,6	83,5	97,0
17-3	EtOH / H ₂ O (4:1)	5 eq NH ₂ OH.HI	7	63,8	85,8	98,9
17-4	NH ₂ NH ₂ .H ₂ O	Ninguno	13	13,6	34,9	35,2
17-5	NH ₂ NH ₂ .H ₂ O	5 eq NH ₂ OH.HI	13	57,9	86,9	97,4
17-6	EtOH (4 vols)	NaOH 4N (ac) (1 vol)	14	3,7	11,63	14,5
17-7	EtOH / H ₂ O (4:1)	5 eq NH ₂ OH.HCl	7	3,4	5,8	17,2
17-8	EtOH / H ₂ O (4:1)	5 eq NH ₂ OH.H ₂ SO ₄	7	0	0,2	0,7
17-9	EtOH / H ₂ O (4:1)	5 eq NH ₂ OH.TFA	7	34,2	72,4	91,3
17-10	EtOH / H ₂ O 4:1	5 eq NH ₄ I	7	0	0	0

*Volumen = 1 g = 1 ml = 1 volumen

REIVINDICACIONES

1. Un método para la desacetilación al menos parcial de un glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo, que comprende:
 - a1) proporcionar un glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo;
 - a2) hacer reaccionar el glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo con hidroxilamina (NH₂OH) o una sal de la misma a una temperatura de 100 °C o menos durante 2 a 200 horas para formar un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado; y
 - a3) recuperar el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el glucosaminoglucano se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina y mezclas de los mismos.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el peso molecular promedio en peso del glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado recuperado es al menos 10 %, del peso molecular promedio en peso del glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo en la etapa a1).
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo en la etapa a1) tiene un grado de acetilación en el intervalo de 98 a 100 %.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado recuperado tiene un grado de acetilación al menos 1 % menor que el del glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo en la etapa a1).
6. El método según la reivindicación 5, en el que la etapa a2) comprende hacer reaccionar el biopolímero que comprende grupos acetilo con la hidroxilamina o sal de la misma a una temperatura en el intervalo de 10 a 90 °C.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa a2) comprende hacer reaccionar el biopolímero que comprende grupos acetilo con la hidroxilamina o sal de la misma durante 2 a 150 horas.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa a2) comprende hacer reaccionar el glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo con hidroxilamina en agua.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración molar de hidroxilamina en la etapa a2) está en el intervalo de 5 a 20 M.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa a2) comprende hacer reaccionar el glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo con una sal de hidroxilamina.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de la sal de hidroxilamina en la etapa a2) está en el intervalo de 0,1 a 5 M.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reacción en la etapa a2) se realiza a un valor de pH en el intervalo de 4 a 12.
13. Un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado obtenido por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que tiene un grado de acetilación de 99 % o menos y un peso molecular promedio en peso de 0,5 MDa o más.
14. Un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado que tiene un grado de acetilación de 99 % o menos y un peso molecular promedio en peso de 0,5 MDa o más.
15. Uso de hidroxilamina o una sal de la misma para desacetilar al menos parcialmente un glucosaminoglucano que comprende grupos acetilo.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que el glucosaminoglucano se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina y mezclas de los mismos.
17. Un método de preparación de un producto de hidrogel que comprende moléculas de glucosaminoglucano reticulado, dicho método comprende las etapas de:
 - a) proporcionar una solución que comprende un glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado según la reivindicación 13 o 14 y opcionalmente un segundo glucosaminoglucano;

b) activar los grupos carboxilo en el glucosaminoglucano al menos parcialmente desacetilado y/o el segundo glucosaminoglucano opcional con un agente de acoplamiento, para formar glucosaminoglucanos activados;

5 c) reticular los glucosaminoglucanos activados a través de sus grupos carboxilo activados usando los grupos amino de los glucosaminoglucanos al menos parcialmente desacetilados para proporcionar glucosaminoglucanos reticulados mediante enlaces amida.

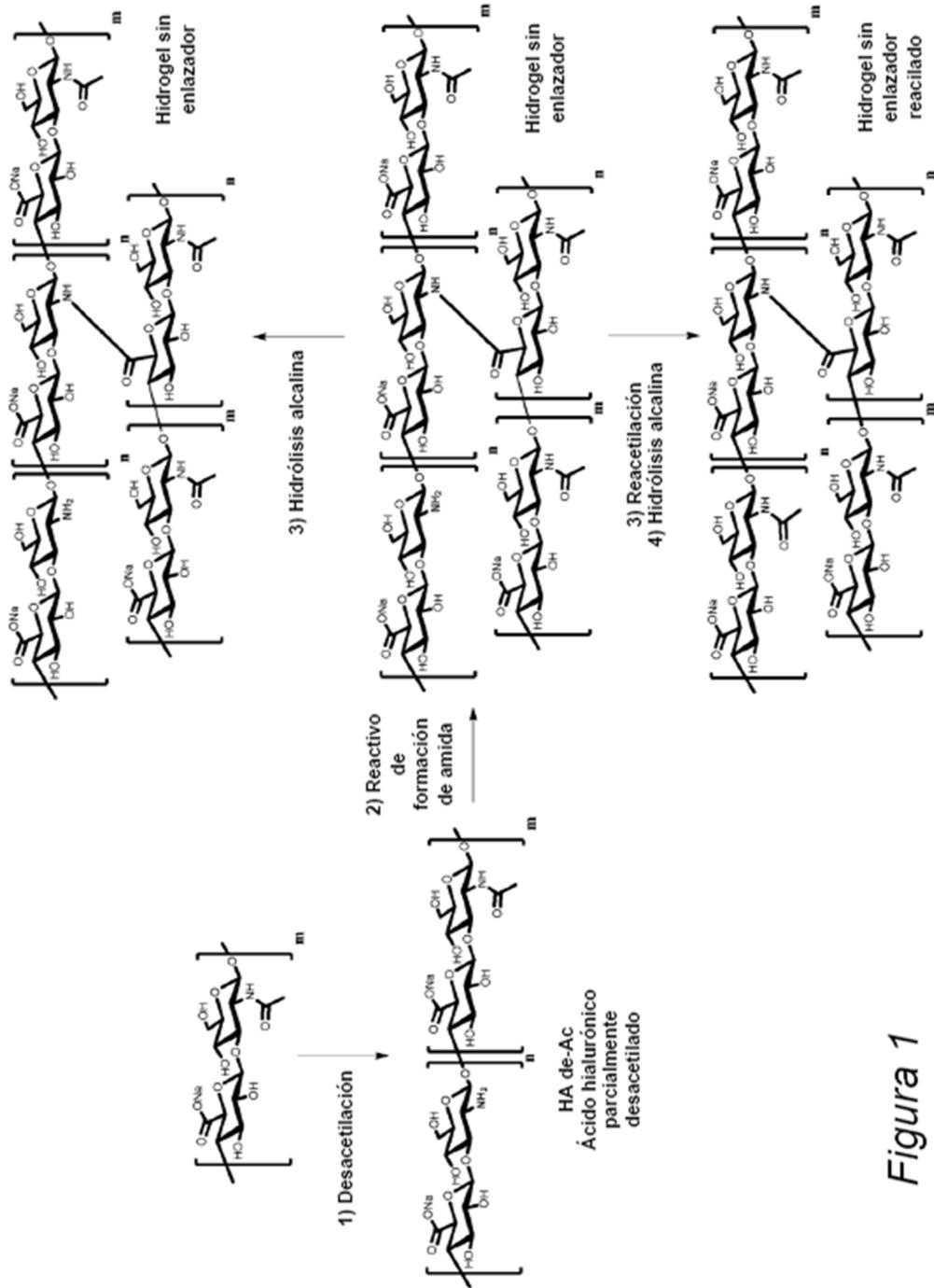


Figura 1

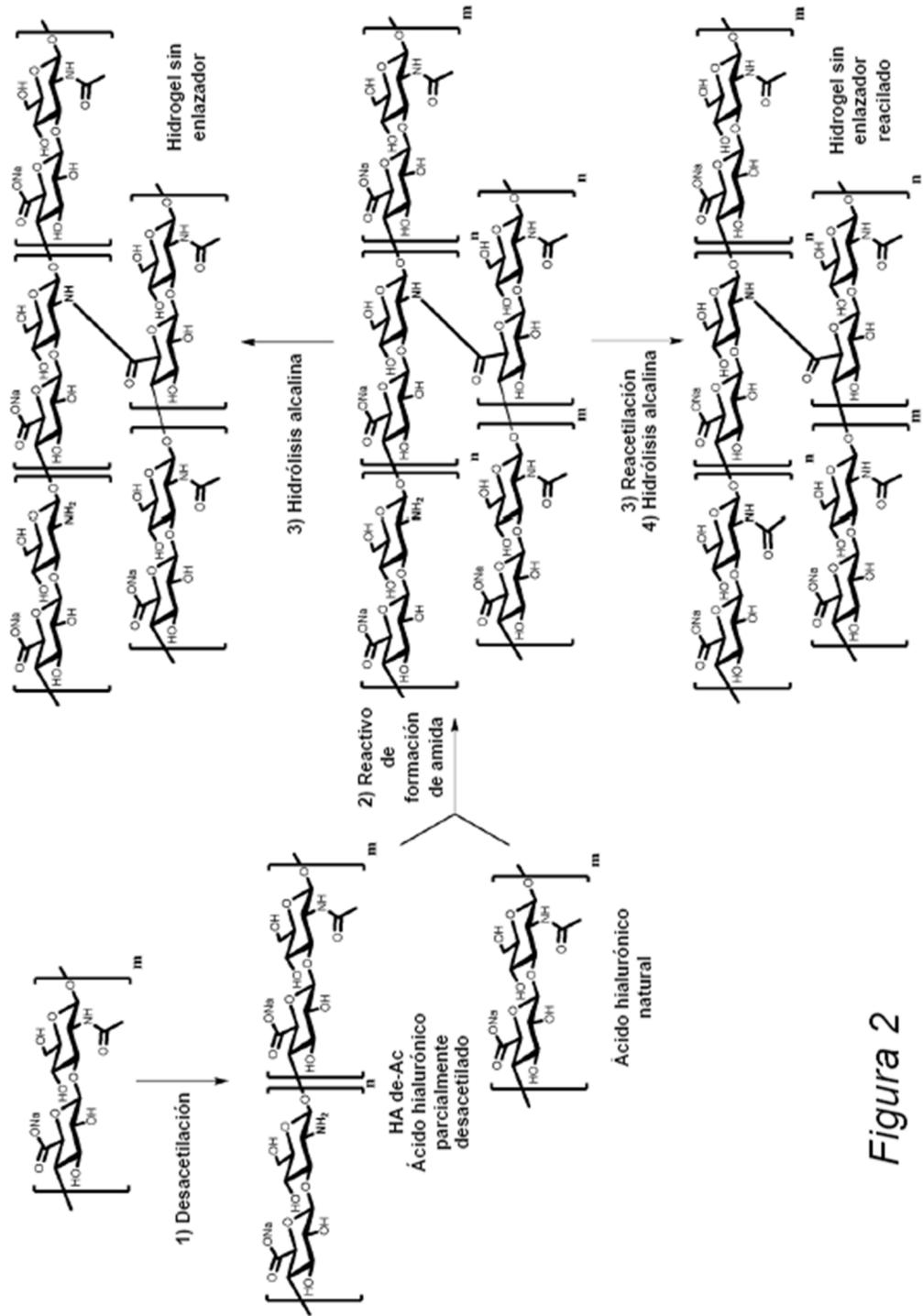


Figura 2