



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 01 640 T2 2004.03.25**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 169 387 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 01 640.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/03081**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 931 057.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/61675**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **12.03.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.03.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C08L 5/08**

C08J 9/28, C08J 3/14, D01F 9/00

(30) Unionspriorität:

PD990071 08.04.1999 IT

(73) Patentinhaber:

**Fidia Farmaceutici S.p.A., Abano Terme,
Padua/Padova, IT**

(74) Vertreter:

**Gille Hrabal Struck Neidlein Prop Roos, 40593
Düsseldorf**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**PALLADO, Paolo, I-35132 Padova, IT; BAGGIO,
Marco, I-31029 Vittorio Veneto, IT; DALLE
CARBONARE, Maurizio, I-35100 Padova, IT;
CALLEGARO, Lanfranco, I-36016 Thiene, IT**

(54) Bezeichnung: **DREIDIMENSIONALE STRUKTUR ENTHALTEND HYALURONSÄUREDERIVAT, HERGESTELLT
DURCH DIE TECHNIK VON SUPERKRITISCHEN ANTLÖSUNGSMITTELN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft biokompatible und biologisch abbaubare dreidimensionale Strukturen, die Hyaluronsäure-Derivate enthalten, erhalten durch die Technik des Fällens, induziert durch ein superkritisches Anti-Lösungsmittel (SAS), und deren Verwendung auf dem Gebiet der Medizin und der Chirurgie.

[0002] Hyaluronsäure ist ein Heteropolysaccharid, das sich aus alternierenden Resten von D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glycosamin zusammensetzt. Es ist ein geradkettiges Polymer mit einem Molekulargewicht, das zwischen 50.000 und 13.000.000 Da variieren kann, je nach Quelle aus der es erhalten wird und je nach verwendeten Herstellungs- und Bestimmungsverfahren. Es ist natürlich vorhanden in den perizellulären Gelen, in der Fundamentalsubstanz von Bindegewebe von Wirbeltierorganismen, in der es eine der Haupt-Komponenten darstellt, in den Synovialflüssigkeiten von Gelenken, im Glaskörper, in menschlichen Nabelschnurgeweben und in Hahnenkämmen.

[0003] Hyaluronsäure spielt eine vitale Rolle in vielen biologischen Verfahren wie der Gewebshydratation, der Proteoglycan-Organisation, der Zelldifferenzierung, der Proliferation und Angiogenese (J. Aigner et al., L. Bio-med. Mater. Res. 1998, 42, 172-181).

[0004] Es ist bekannt, dass Hyaluronsäure-Fractionen verwendet werden können, um die Gewebsreparatur zu erleichtern, als Ersatzstoffe für die intraokkuläre Flüssigkeit, oder sie können verabreicht werden durch die intraartikuläre Route, um Gelenkerkrankungen zu behandeln, wie es in den europäischen Patenten 0 138 572 und 0 535 200 beschrieben ist.

[0005] Hyaluronsäure spielt eine fundamentale Rolle in Gewebsreparaturprozessen, insbesondere in den frühen Stadien der Granulation, der Stabilisierung der Koagulationsmatrix und der Steuerung ihres Abbaus, stimuliert die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen wie polymorphonukleären Leukozyten und Monozyten von Mesenchymal-Zellen wie Fibroblasten und Endothelialzellen und schließlich die Orientierung der erfolgreichen Migration von Epithelialzellen.

[0006] Es ist bekannt, dass die Anwendung von Hyaluronsäure-Lösungen fähig ist, die Heilung von Patienten zu beschleunigen, die unter Entzündungen, Wunden und Verbrennungen leiden. Die Rolle der Hyaluronsäure in den verschiedenen Stufen der Gewebsreparaturprozesse wurde beschrieben durch die Konstruktion eines theoretischen Modelles von Weigel, P. N. et al.; „A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing“, J. Theor. Biol., 119, 219, 1986.

[0007] Die Verwendung von Hyaluronsäure-Fractionen mit niederem Molekulargewicht für die Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen mit knocheninduzierenden Eigenschaften ist ebenfalls bekannt (US 5 646 1 29).

[0008] Hyaluronsäure-Derivate erhalten alle Eigenschaften des obigen Glycosaminglycans, mit dem Vorteil, dass sie in verschiedene Formen verarbeitet werden können und ihre Löslichkeit und Abbauprozesse entsprechend dem Prozentsatz ihrer Derivatisierung variieren können (EP 0 216 453 B1), Außerdem besitzen Hyaluronsäure-Derivate den Vorteil neuer Eigenschaften infolge der Insertion von spezifischen Molekülen in die Struktur der Hyaluronsäure. Z. B. zeigen die sulfatierten Derivate von Hyaluronsäure Anti-Koagulations-eigenschaften und sind beständig gegenüber Hyaluronidase (WO 95/25751).

[0009] Auch sind Gesamt- oder Partialester von Hyaluronsäure und autovernetzte Derivate von Hyaluronsäure, ihre Verwendung auf dem pharmazeutischen und kosmetischen Gebiet und in biologisch abbaubaren Materialien bekannt (US-Patente 4 851 521; 4 965 353; 5 676 964).

[0010] Wie vorher erwähnt, können Hyaluronsäure-Derivate in verschiedene Formen wie Folien, Fäden, Schwämme, Mikrosphären und Nanosphären verarbeitet werden.

[0011] Die bislang bekannten Verfahren für die Herstellung der genannten Formen beinhalten die Verwendung von Lösungsmitteln, die dann aus den Endprodukten, im Falle von Materialien, die auf pharmazeutischem Gebiet verwendet werden, entfernt werden müssen, die aber schwierig zu entfernen sind und wiederholte Waschschritte erfordern.

[0012] In der Tat, wie im europäischen Patent Nr. 0 21 6 453 durch den Anmelder beschrieben, werden Hyaluronsäure-Derivate in einem Lösungsmittel wie z. B. Dimethylsulfoxid gelöst und die Lösung die so erhalten wird, wird gleichmäßig über eine Glasplatte verteilt oder durch eine Spindüse gegeben, um einen Film oder Fäden zu erhalten.

[0013] Letztere können dann in einem Anti-Lösungsmittel wie z. B. Ethanol eingetaucht werden, um das Dimethylsulfoxid zu entfernen und wiederholt mit dem Anti-Lösungsmittel gewaschen werden.

[0014] Das Verfahren für die Herstellung von Schwämmen beinhaltet andererseits das Zugabe einer Mischung, die durch Salze aufgebaut ist, zu der Lösung von Hyaluronsäure-Derivaten. Solche Salze sind z. B. Natriumchlorid von gegebener Partikelgröße und bestimmte Verbindungen wie z. B. Bicarbonate von Soda und Zitronensäure, die fähig sind, Gas freizusetzen wie z. B. Kohlendioxid, wenn sie mit dem Lösungsmittel für die Hyaluronsäure-Derivate in Kontakt kommen.

[0015] Die Paste, die erhalten wird, wird durch Walzen gegeben, so dass eine Schicht des Produktes einer gegebenen Dicke erhalten wird, welche dann eingetaucht wird und wiederholt mit einem geeigneten Anti-Lö-

sungsmittel wie Wasser gewaschen wird.

[0016] Durch Verwendung einer innovativen Technik, die noch immer unter ihrer ursprünglichen Bezeichnung „superkritisch“ bekannt ist, ist es möglich, die Verwendung von organischen Lösungsmitteln einzuschränken, die Anzahl der Schritte, die erforderlich sind, um das fertige oder halbfertige Produkt zu erhalten, zu verringern und den organischen Lösungsmittelgehalt auf sehr geringe Niveaus zu reduzieren.

[0017] Bei der Verwendung der superkritischen Technologie ist es gut bekannt, dass die Anti-Lösungsmittelwirkung, die verwendet wird, um die Segregation des gelösten Stoffes aus der Lösung zu erhalten, ausgelöst werden kann durch Einblasen des Anti-Lösungsmittels, das unter Normalbedingungen in der Form eines Gases oder eines Dampfes vorliegt, aber keine Flüssigkeit ist.

[0018] Dieses Verfahren, das als SAS bekannt ist, beinhaltet das Einspeisen des Anti-Lösungsmittels unter Druck in die flüssige Lösung, die infolge der Wirkung der Solubilisierung des Anti-Lösungsmittels in die flüssige Phase expandiert. Die SAS-Technik kann durch verschiedene Methoden durchgeführt werden, worunter zwei bedeutende, das diskontinuierliche oder das Batch-Verfahren und das kontinuierliche Verfahren darstellen.

Diskontinuierliches SAS-Verfahren

[0019] Die diskontinuierliche SAS-Technik besteht darin, eine Lösung, die einen gelösten Stoff enthält, der ausgefällt werden soll, in Kontakt mit einer komprimierten Anti-Lösungsmittel-Flüssigkeit, -Dampf oder -Gas zu bringen. Die Lösung wird in einen druckfesten Behälter gegeben, und das Gas wird unter Druck eingeblasen, bis sich der gelöste Stoff aus der flüssigen Phase abtrennt. Ein Strom derselben Anti-Lösungsmittel-Flüssigkeit wird dann verwendet, um das Lösungsmittel zu eliminieren und das reine gefällte Produkt zu erhalten.

[0020] Die ersten berichteten Versuche, um das diskontinuierliche SAS-Verfahren anzuwenden wurden durch P. M. Gallagher et al. durchgeführt (Johnston, K. P., Penninger, J. M. L., Supercritical fluids science and technology, ACS Symp. Ser. 406, Chap. 22, 1989) für die Kristallisation von explosiven Substanzen wie Nitroguanidin.

[0021] Schließlich wurde die diskontinuierliche SAS-Technik angewendet bei der Herstellung von Nanosphären, die Hyaluronsäure-Derivate enthalten und einen Durchschnittsdurchmesser von weniger als 1 Mikron aufweisen (WO 96/29998).

Kontinuierliche SAS-Technik

[0022] Bei der kontinuierlichen SAS-Technik wird kontinuierlich in die Lösung das Anti-Lösungsmittel in den unter Druck stehenden Ausfällungsbehälter durch eine kalibrierte Öffnung und mit Hilfe einer volumetrischen Pumpe injiziert. Die kontinuierliche Technik besitzt interessante Vorteile gegenüber dem diskontinuierlichen Verfahren, sowohl hinsichtlich der besseren Arbeitsbedingungen als auch aufgrund des Umstandes, dass bestimmte Einschränkungen, die dem diskontinuierlichen Verfahren eigen sind, überwunden werden können.

[0023] Die erste Publikation über die SAS-Technik war die von Yeo et al. (Biotechnology and Bioengineering, 41, 341–346, 1993), der sie beim Ausfällen von Insulin durchführte.

[0024] Tom et al. (Application of Supercritical Fluids in the controlled release of drugs, chapter 19, 1993) verwendete das kontinuierliche SAS-System, um die Ausfällung von zwei verschiedenen Proteinen zu erzeugen.

[0025] Wie das diskontinuierliche SAS-Verfahren wurde auch die kontinuierliche Technik als mögliche Trenntechnik untersucht. Ein interessantes Dokument zu diesem Thema ist das von Foster et al. (The 4th International Symposium on Supercritical Fluids, Sendai, Japan, 27–29, 1997).

[0026] Der Anwender fand nun überraschend, dass durch die Anwendung der SAS-Technik, kontinuierlich oder diskontinuierlich, es möglich ist, Hyaluronsäure Derivate in verschiedene Formen wie Filme, Schwämme und Fäden zu verarbeiten, und das Problem der Eliminierung von Rückständen organischer Lösungsmittel, welches einen Nachteil der bis dahin verwendeten Verfahren darstellte, zu lösen.

[0027] Die Abwesenheit von Lösungsmitteln in den Endprodukten stellt einen beträchtlichen Vorteil für Biomaterialien dar, die auf dem Gebiet der Medizin und der Chirurgie verwendet werden, da es eine drastische Abnahme der Toxizität verglichen mit den gleichen Produkten, die durch konventionelle Techniken erhalten wurden, beinhaltet, ebenso wie eine deutliche Verbesserung beim Zellwachstum in Kulturen, die auf Gerüsten aus Biomaterialien gezüchtet werden.

[0028] Außerdem wurde überraschend gefunden, dass die Schwämme, die durch das diskontinuierliche SAS-Verfahren erhalten werden, eine morphologische Struktur darstellen, die sehr ähnlich der Knochenstruktur ist und die daher als solche oder in Assoziation mit geeigneten Zellkulturen für die Knochenregeneration oder in der Behandlung von Osteochondral-Defekten verwendet werden können.

[0029] Schließlich wurde überraschend gefunden, dass es möglich ist, durch die SAS-Technik Fäden zu erhalten, die Partialester von Hyaluronsäure enthalten, die wasserlöslich sind und die durch die konventionellen Verfahren nicht erhalten werden können, da die Löslichkeit der Derivate zu Strukturen führt, die erhalten werden, die nicht kontinuierlich sind, aggregiert sind, nicht reproduzierbar sind, weshalb die Arbeitsbedingungen

nicht in industriellem Maßstab verwendet werden können.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0030] Die vorliegende Erfindung beschreibt biokompatible und biologisch abbaubare dreidimensionale Strukturen in der Form von Schwämmen, Gelen, Fasern, Fäden, Röhren, Vliesstoffgeweben, Seilen, Netzen, enthaltend Hyaluronsäure-Derivate, erhältlich durch Fällung induziert durch ein superkritisches Anti-Lösungsmittel aus einer Lösung des Hyaluronsäure-Derivates in einem aprotischen Lösungsmittel bei einer Konzentration zwischen 2 Gew.-% und dem Sättigungswert bei einer Temperatur von 40°C, wobei die Konzentration so ausgewählt wird, dass sie die Konzentrationsschwelle, bei der das Polymer in Form einer Netzwerkstruktur vorliegt, übersteigt, wahlweise in Assoziierung mit pharmakologisch oder biologisch aktiven Substanzen und mit anderen natürlichen, halbsynthetischen und synthetischen Polymeren, und deren Verwendung auf medizinischem und chirurgischem Gebiet.

[0031] Bevorzugt sind die folgenden Hyaluronsäure-Derivate;

- Ester von Hyaluronsäure, worin ein Teil oder alle Carboxy-Funktionen mit Alkoholen verestert sind, die aus der Reihe der aliphatischen, aromatischen, arylaliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen Alkohole sind (EP 0 216 453);
- Ester von Hyaluronsäure, worin der erste Teil der Carboxy-Funktionen mit geradkettigen langkettigen araliphatischen Alkoholen mit zwischen 10 und 22 Kohlenstoffatomen verestert ist (WO 98/08876);
- auto-vernetzte Ester der Hyaluronsäure, worin ein Teil oder alle Carboxygruppen verestert sind mit alkoholischen Funktionen der gleichen Polysaccharidkette oder anderer Ketten (EP 0 341 745 B1);
- vernetzte Verbindungen der Hyaluronsäure, worin ein Teil oder alle der Carboxygruppen verestert sind mit Polyalkoholen aus der Reihe der aliphatischen, aromatischen, arylaliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen Alkohole, wobei eine Vernetzung mit Hilfe von Spacer-Ketten gebildet wird (EP 0 265 1 1 6 B1);
- Hemiester der Bernsteinsäure oder Schwermetallsalze der Bernsteinsäure mit Hyaluronsäure oder mit partiellen oder Gesamtestern von Hyaluronsäure (WO 96/357207);
- sulfatierte Derivate (WO 95/25751) oder N-sulfatierte Derivate (WO 98/45335);
- Amid-Derivate der Hyaluronsäure,

[0032] Die bevorzugten Partialester-Derivate der Hyaluronsäure sind diejenigen mit weniger als 90% Veresterung, insbesondere innerhalb eines Bereiches zwischen 45 und 75% Veresterung und noch bevorzugter zwischen 60 und 70 Veresterung.

[0033] Die Hyaluronsäure-Derivate, die mit Benzylalkohol verestert sind, sind ebenfalls bevorzugt.

[0034] Die oben erwähnten Hyaluronsäure-Derivate können allein in Assoziierung miteinander oder mit natürlichen, semisynthetischen oder synthetischen Polymeren verwendet werden.

[0035] Natürliche Polymere, die verwendet werden können, sind z. B. Collagen, Copräzipitate von Collagen und Glycosaminoglycanen, Cellulose, Polysaccharide in der Form von Gelen, wie Chitin, Chitosan, Pektin oder Pektinsäure, Agar, Agarose, Xanthan, Gellan, Algininsäure oder Alginate, Polymannane oder Polyglycane, Stärke oder natürliche Gume. Die halbsynthetischen Polymere können z. B. ausgewählt werden aus der Gruppe, die sich zusammensetzt aus Collagen, vernetzt mit Mitteln, wie Aldehyden oder Vorläufern derselben, Dicarbonsäuren oder Halogeniden davon, Diaminen, Derivaten von Cellulose, Hyaluronsäure, Chitin oder Chitosan, Gellan, Xanthan, Pektin oder Pektinsäure, Polyglycane, Polymanna, Agar, Agarose, natürliche Gume oder Glycosaminoglycane. Schließlich sind synthetische Polymere, die verwendet werden können, z. B. Polymilchsäure, Polyglykolsäure oder Copolymere derselben oder deren Derivate, Polydioxane, Polyphosphazene, Polysulfonharze und Polyurethanharze, PTFE.

[0036] Die dreidimensionalen Strukturen gemäß der vorliegenden Erfindung können pharmazeutisch oder biologisch wirksame Substanzen enthalten wie z. B. anti-inflammatorische Mittel, Antibiotika, Wachstumsfaktoren, wie z. B. das Knochenmorphogenese-Protein (BMP), der humane Nervenwachstumsfaktor (h-NGF), der ziliarneuronotrope Faktor (CNTF).

[0037] Die Hyaluronsäure-Derivate in der Form von Fasern oder Folien können weiter in die Form von Faserservliesen, Seilen, Netzen verarbeitet werden.

[0038] Die genannten Biomaterialien können vorteilhaft verwendet werden als Gerüste für Zellkulturen in der plastischen und ästhetischen Chirurgie, in der Orthopädie, in der Zahnheilkunde, in der Neurochirurgie, in der kardiovaskulären Chirurgie, in der Prävention von post-chirurgischen Anhaftungen, für die Regeneration von Geweben, wie Epidermal-, Dermal-, Knochen-, Knorpel-, Nerven-, Kardiovaskulär-, Adipose-, Leber-, Muskel-, Glandular-Geweben, und allgemein als Füller für Weichgewebe im Falle von Substanzverlust.

[0039] Insbesondere die Schwämme, die durch das diskontinuierliche SAS-Verfahren erhalten werden, stellen eine morphologische Struktur bereit, die sehr ähnlich der Knochenstruktur ist, und die daher als solche oder in Assoziierung mit geeigneten Zellkulturen für die Knochenregeneration oder in der Behandlung von Osteochondral-Defekten verwendet werden können.

[0040] Wir berichten hier im folgenden über einige Beispiele der Herstellung von Schwämmen und Fäden, die durch die diskontinuierliche und die kontinuierliche SAS-Technik hergestellt werden.

[0041] Das Verfahren zur Herstellung der Schwämme durch die diskontinuierliche SAS-Technik kann durch die folgenden Schritte zusammengefasst werden.

- a) Lösen eines Hyaluronsäure-Derivates in einem aprotischen Lösungsmittel bei einer Konzentration von zwischen 2 Gew.-% und dem Sättigungswert bei einer Temperatur von 40°C;
- b) Einfüllen der Lösung aus Schritt a) in einen druckbeständigen Behälter;
- c) Einfüllen des Anti-Lösungsmittels bis ein Druck, der größer als der der Fällung ist, erreicht wird (abhängig von dem verwendeten organischen Lösungsmittel und der Temperatur), bei einer Temperatur von zwischen 10 und 70°C;
- d) Entfernen des aprotischen Lösungsmittels mit einem Strom des Anti-Lösungsmittels;
- e) Ablassen des Druckes aus dem Behälter und Isolieren des Niederschlags;

[0042] Hinsichtlich des Verfahrens der Herstellung der Fäden wird die kontinuierliche SAS-Technik, die unten zusammengefasst ist, angewendet:

- a) Lösen eines Hyaluronsäure-Derivates in einem aprotischen Lösungsmittel bei einer Konzentration von zwischen 2 Gew.-% und dem Sättigungswert bei einer Temperatur von 40°C;
- b) Einfüllen der Lösung in eine Spritzenpumpe;
- c) Einfüllen des Anti-Lösungsmittels bis ein Druck erreicht wird, der größer ist als der Fällungsdruck (abhängig von dem organischen Lösungsmittel, das verwendet wird, und der Temperatur), bei einer Temperatur von zwischen 10 und 70°C und Stabilisierung des Stroms des Anti-Lösungsmittels;
- d) kontinuierliches Injizieren der Lösung des Hyaluronsäure-Derivates in den Fällungsreaktor durch eine kalibrierte Öffnung mit einem Durchmesser zwischen 40 und 400 Mikron;
- e) Unterbrechen der Injektion der Lösung;
- f) Entfernung beliebiger rückständiger Lösungsmittel mit dem Strom des Anti-Lösungsmittels;
- g) Ablassen des Druckes in dem Fällungsreaktor und Isolieren des Niederschlags.

Beispiel 1

Herstellung von Schwämmen, die aus Total-Benzylestern von Hyaluronsäure bestehen (HYAFF 11)

Vorbemerkungen

[0043] Die SAS-Technologie wurde angewendet auf konzentrierte Lösungen von Hyaff-11, und es wurde gefunden, dass die Morphologie des Niederschlags beeinflusst wird durch die Anfangskonzentration der Lösung und durch die Arbeitsbedingungen. Dieser Umstand ist in der Theorie nicht vorhersehbar. Die Optimierung solcher Parameter erlaubte es überraschend, ein Polymer in der Form eines porösen Schwammes zu erhalten, das eine Struktur aufweist, die der Knochenstruktur sehr ähnlich ist.

[0044] Die Varianten, die ausgearbeitet werden, um das Produkt zu diversifizieren, sind die Arbeitstemperatur und der Druck, die Anfangskonzentration der Lösung, der Typ des organischen Lösungsmittels und des gasförmigen Anti-Lösungsmittels, ebenso wie der Druckgradient, der während des Druckschrittes angewendet wird.

[0045] Gemäß der Erfindung kann das aprotische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid, N-Methylpyrrolidon oder Dimethylformamid sein. Das Anti-Lösungsmittel kann Kohlendioxid, ein Kohlenwasserstoff, ein Hydrogenfluorkohlenstoff oder Stickoxid sein.

[0046] Bevorzugt wird das Antilösungsmittel mit einer Geschwindigkeit oder einem Druckgradienten von 0,1 bis 20 bar/min. eingefüllt, bis ein Druck von 40 bis 150 bar erreicht wird.

[0047] **Abb. 1** zeigt ein Diagramm des verwendeten Aufbaus.

[0048] Der Fällungstank P ist verbunden mit der Ausrüstung, so dass CO₂ sowohl aufwärts als auch abwärts fließen kann durch Einstellung der Dreiwegventile VT1- und VT2.

[0049] An beiden Enden ist ein Filter/Verteiler, gebildet durch poröse Metallbaffles (Fritten) mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 5 µm angebracht, fixiert mittels zweier Stahlringe, die sie in Position auf zwei Teflonringe pressen. Der Strom von CO₂ wird somit gleichförmig durch das Volumen des Tanks und die darin vorhandene Masse verteilt.

[0050] Eine hochkonzentrierte Lösung eines total veresterten Hyaff-11 in DMSO wird hergestellt. Die hohe Konzentration der Ausgangslösung erfordert es, dass das Polymer sehr langsam zu dem Lösungsmittel gegeben wird, während es gerührt wird und erwärmt wird. Die so erhaltene Lösung ist sehr viskos. Es wird rühren gelassen, jedoch ohne weiteres Erwärmen für 1 2 Stunden.

[0051] Die Flüssigkeit wird dann in den Fällungsreaktor gegossen, der dann verschlossen wird. Die Temperatur wird mit Hilfe eines Temperatur-Reglermeßgerätes (TG) eingestellt.

[0052] Nachdem die erforderliche Temperatur erreicht wird, muss der Druck in dem Behälter eingestellt werden. Der Druck wird bei dem gewünschten Wert mit Hilfe eines millimetrischen Ventils (VM1) gehalten, Während des Beladens werden die Dreiwegventile eingestellt, um einen Aufwärtsstrom zu erlauben, so dass das CO₂ in die Lösung einblasen kann.

[0053] Das Einfüllen des Behälters endet bei einem Druckwert, der größer ist als der der Fällung, abhängig von dem Lösungsmittel und der Temperatur. An diesem Punkt wird der Strom umgekehrt durch Schalten der Dreiwegventile VT1 und VT2, und das millimetrische Ventil VM2 wird geöffnet, wobei das Lösungsmittel, das in dem Fällungsreaktor vorhanden ist, abgesaugt wird. Der Reinigungsschritt wird somit beschleunigt, wodurch das Volumen des DMSO, das aus dem Strom von CO₂ entfernt wird, reduziert wird.

[0054] Auf das Absaugen folgt ein zweiter Schritt des Unterdrucksetzens, um die Löslichkeit des organischen Lösungsmittels in der superkritischen Phase zu erhöhen.

[0055] Der Niederschlag wird dann gereinigt, wobei CO₂ entsprechend dem Fließventilwerten und für einen Zeitraum, der abhängig ist von dem Volumen des Systems und der Menge der verwendeten Lösung die verwendet wird, bereitgestellt wird.

[0056] Der zweite Schritt des Unterdrucksetzens und der Reinigung wird erneut mit einem Strom von CO₂ der aufwärts gerichtet ist, durchgeführt.

[0057] Nach der Zeit, die erforderlich ist, um das Lösungsmittel zu eliminieren, wird die Pumpe P abgestellt, und der Fällungsreaktor wird auf Atmosphärendruck eingestellt. An diesem Punkt kann er vom System abgetrennt werden, geöffnet werden und der Niederschlag kann isoliert werden.

Ergebnisse

[0058] Vorläufige Untersuchungen wurden durchgeführt, ausgehend von Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen, um die Bedingungen des Verlaufs von einer Lösung, in der das Polymer in der Form von Rollen vorhanden ist, bis zu einer, in der die Polymerketten in einer Netzwerkstruktur verstrickt sind (Fällungsgrenze) zu bestimmen.

[0059] Unsere Analyse führte dazu, zu schließen, dass um eine schwammförmige Struktur mit guten mechanischen Eigenschaften von Druckbeständigkeit und Zugkraft zu erhalten, es notwendig ist, bei Konzentrationen zu arbeiten, die höher ist als der Überlappungsschwellenwert.

[0060] Tabelle 1 zeigt die Arbeitsbedingungen, die im Verlaufe der vorläufigen Untersuchungen beobachtet wurden.

Tabelle 1: Arbeitsbedingungen in dem Verfahren der Herstellung von Schwämmen, ausgehend von Hyaluronsäure-Derivaten (HYAFF11 in DMSO) durch die SAS-Technik

Test	Temperatur (°C)	Druck (bar)	Ausgangskonzentration (Gew.-%)	Ergebnis
1	40	90	5	Pulver
2	40	90	8	nicht-kompaktes Netzwerk
3	40	90	10	Schwamm
4	40	90	12	Schwamm

[0061] Die **Abb. 2** und **3** zeigen SEM-Photographien der Proben der Schwämme, erhalten in Test 4.

[0062] **Fig. 2** ist nicht stark vergrößert und es ist möglich, die kompakte und homogene Struktur, die produziert wurde, zu beobachten,

[0063] Im Gegensatz dazu zeigt die Photographie in **Fig. 3** die Porosität des Schwammes, deren durchschnittliche Dimension in einem Bereich von gerade einigen wenigen Mikron liegt.

[0064] Es wurde demonstriert, dass es möglich ist, Netzwerkstrukturen von Hyaff-11 unter Verwendung der Batch-SAS-Technik herzustellen, ausgehend von konzentrierten Lösungen, gemäß den Löslichkeitsbeschränkungen des Systems,

Beispiel 2

Herstellung von Fäden, die aus dem Benzylester von Hyaluronsäure mit 50% Veresterung bestehen (HYAFF11 p50)

[0065] Das System ist illustriert in dem Diagramm von **Fig. 4** und es ist aufgebaut aus einem Einspeisungsbereich (F), einer Pumpe mit einem Tauchkolben (P) mit einem Glykol-gekühlten Kopf und einer Post-Expansion- und einem Abfall-Bereich (PE und W), der es erlaubt CO₂ aus dem Solubilisierungs-Lösungsmittel abzutrennen, um letzteres zu isolieren und für den Gasstrom, der mit einem Rotameter (R) gemessen wird, und der in die Atmosphäre entlassen wird.

[0066] Der Fällungsreaktor besitzt ein Fenster, durch den das Verfahren beobachtet werden kann.

[0067] Die Injektionsleitung der Flüssigkeit setzt sich zusammen aus einer Luftspritzenpumpe (PA), um die gleichförmige Anwendung von Kraft zu gewährleisten und um die Kontinuität der Fäden sicherzustellen.

[0068] Das System ist mit einem Manometer verbunden, mit dem es möglich ist, den Belastungs-Verlust durch die Düse einzustellen, mit dem Druckreduzierer (RP) zu arbeiten und die Druckablesung mit dem durch den Manometer, der mit dem Ausfällungsreaktor verbunden ist, angezeigten Druck, zu vergleichen.

[0069] Das millimetrische Ventil VM4 (Hoke, Modell 1316G4Y) verbindet die Leitung mit dem Isolierungstank (B) während der Druck abgelassen wird und dem Waschen des Systems. Die Temperatur des Reaktors wird reguliert durch Aufzeichnen des Auslasssignals.

Arbeitsverfahren

[0070] Ein Hyaluronsäure-Derivat wird in einem aprotischen Lösungsmittel, bevorzugt DMSO, gelöst bei einer Konzentration die zwischen 5 Gew.-% und der Sättigungskonzentration bei einer Temperatur von 40°C, bevorzugt 10 Gew.-%, liegt.

[0071] Die Lösung wird dann diskontinuierlich in die Luftspritzenpumpe eingeführt, wobei die Temperatur zwischen 15 und 40°C, bevorzugt bei 25°C gehalten wird. Die Röhrenleitung zwischen der Pumpe und dem Ausfällungsreaktor wird mit reinem DMSO gefüllt, so dass das Lösungsmittel allein am Beginn des Verfahrens injiziert wird, und um zu verhindern, dass das System durch den Anti-Lösungsmittelleffekt während der Druckphase blockiert wird.

[0072] Die Fällungskammer wird unter Druck gesetzt, indem man zunächst das millimetrische Ventil VM1 öffnet und anschließend die Tauchkolbenpumpe in Betrieb nimmt bis ein Enddruckwert zwischen 15 und 150 bar, bevorzugt 100 bar erreicht wird.

[0073] Nachdem dieser Wert einmal erreicht wurde, wird das Ventil VM2 geöffnet, und der CO₂-Strom wird stabilisiert.

[0074] Die Flüssigkeit wird dann mit der luftbetriebenen Pumpe unter Verwendung eines Druckreduzierers (RP) komprimiert, bis ein Druck, der größer ist als der des CO₂, der in dem Ausfällungsreaktor vorhanden ist, erreicht ist. Der Druck der Flüssigkeit muss auf einen genauen Wert abhängig von dem Durchmesser der Düse eingestellt werden. Die Injektion wird begonnen durch Umschalten des Ventils VM3, wodurch die Flüssigkeit in die Zelle durch die kalibrierte Öffnung eintreten kann, die zwischen 40 und 400 Mikron, bevorzugt 100 Mikron eingestellt ist,

[0075] Nachdem die Injektion der Lösung vollständig ist, wird der Flüssigkeitsvorrat isoliert mit Hilfe des Ventils VM3, nachdem der Strom von CO₂ fortgesetzt wurde, um beliebige Rückstandslösungsmittel zu eliminieren,

[0076] Das Verfahren wird vervollständigt mit dem Ablassen des Druckes aus dem Fällungsreaktor, nachdem es möglich ist, das Gefäß vom System zu trennen und den Niederschlag zu isolieren,

Patentansprüche

1. Biokompatible und biologisch abbaubare dreidimensionale Strukturen in der Form von Schwämmen, Gelen, Fasern, Fäden, Röhren, Vliesstoff-Geweben, Seilen, Netzen, enthaltend mindestens ein Hyaluronsäurederivat, erhältlich durch Fällung, induziert durch ein superkritisches Anti-Lösungsmittel, aus einer Lösung des Hyaluronsäurederivates in einem aprotischen Lösungsmittel bei einer Konzentration zwischen 2 Gew.-% und dem Sättigungswert bei einer Temperatur von 40°C, wobei die Konzentration so ausgewählt wird, dass sie die Konzentrationsschwelle, bei der das Polymer in Form einer Netzwerkstruktur vorliegt, übersteigt, wahlweise in Assoziation mit pharmakologisch oder biologisch aktiven Substanzen und/oder anderen natürlichen, halbsynthetischen und synthetischen Polymeren,

2. Dreidimensionale Struktur nach Anspruch 1, worin das Hyaluronsäurederivat ausgewählt wird aus der Gruppe, die besteht aus;

- Estern der Hyaluronsäure, worin ein Teil oder alle Carboxy-Funktionen mit Alkoholen verestert sind, die aus der Reihe der aliphatischen, aromatischen, arylaliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen Alkohole sind;
- Estern der Hyaluronsäure, worin der erste Teil der Carboxy-Funktionen mit araliphatischen Alkoholen verestert ist und der zweite Teil mit gradkettigen langkettigen aliphatischen Alkoholen mit zwischen 10 und 22 Kohlenstoffatomen verestert ist;
- auto-vernetzten Estern der Hyaluronsäure, worin ein Teil oder alle Carboxygruppen verestert sind mit alkoholischen
- Funktionen der gleichen Polysaccharidkette oder anderer Ketten;
- vernetzten Verbindungen der Hyaluronsäure, worin ein Teil oder alle der Carboxygruppen verestert sind mit Polyalkoholen aus der Reihe der aliphatischen, aromatischen, arylaliphatischen, cycloaliphatischen, heterocyclischen Alkohole, wobei eine Vernetzung mit Hilfe von Spacer-Ketten gebildet wird;
- Hemiestern der Bernsteinsäure oder Schwermetallsalzen der Bernsteinsäure mit Hyaluronsäure oder mit partiellen oder Gesamtestern von Hyaluronsäure;
- sulfatierten oder N-sulfatierten Derivaten;
- Amid-Derivaten der Hyaluronsäure.

3. Dreidimensionale Strukturen nach den Ansprüchen 1–2, worin die Partialesterderivate der Hyaluronsäure weniger als 90%, bevorzugt zwischen 45 und 75% und noch bevorzugter zwischen 60 und 70 Veresterung aufweisen.

4. Dreidimensionale Strukturen nach den Ansprüchen 1, 2 und 3, worin die Derivate der Hyaluronsäure mit Benzylalkohol verestert sind.

5. Dreidimensionale Strukturen nach Anspruch 1, worin die natürlichen Polymere ausgewählt werden aus der Gruppe, die besteht aus: Collagen, Copräzipitaten von Collagen und Glycosaminoglycanen, Cellulose, Polysaccharide in der Form eines Gels, wie Chitin, Chitosan, Pektin oder Pektinsäure, Agar, Agarose, Xanthan, Gellan, Algininsäure oder Alginaten, Polymannan oder Polyglycanen, Stärken, natürlichen Gumen.

6. Dreidimensionale Struktur nach Anspruch 1, worin die halbsynthetischen Polymere ausgewählt werden aus der Gruppe, die besteht aus: Collagen, vernetzt mit Mitteln, wie Aldehyden oder Vorläufern derselben, Dicarbonsäuren oder deren Halogenide, Diaminen, Derivaten der Cellulose, Hyaluronsäure, Chitin oder Chitosan, Gellan, Xanthan, Pektin oder Pektinsäure, Polyglycanen, Polymannan, Agar, Agarose, natürlichen Gumen, Glycosaminoglycanen.

7. Dreidimensionale Struktur nach Anspruch 1, worin die synthetischen Polymere ausgewählt werden aus der Gruppe, die besteht aus: Polymilchsäure, Polyglycolsäure oder Copolymeren derselben oder Derivaten davon, Polydioxan, Polyphosphazenen, Polysulphonsäureharzen, Polyurethanen, PTFE.

8. Dreidimensionale Struktur nach Anspruch 1, worin die pharmazeutischen oder biologisch aktiven Substanzen ausgewählt werden aus der Gruppe, die besteht aus anti-inflammatorischen Mitteln, Antibiotika, Wachstumsfaktoren, wie z. B. BMP, humaner Nervenwachstumsfaktor (hNGF), ziliarneuronotroper Faktor (CNTF).

9. Verwendung der dreidimensionalen Struktur nach einem der vorstehenden Patentansprüche als Träger von Zellkulturen in der plastischen und ästhetischen Chirurgie, in der Orthopädie, in der Neurochirurgie und in der kardiovaskulären Chirurgie, in der Prävention von post-chirurgischen Anhaftungen, für die Regeneration von Epidermal-, Dermal-, Knochen-, Knorpel-, Nerven-, Kardiovaskulär-, Fett-, Leber-, Muskel-, Glandular-Gewebe und als Füller für Weichgewebe im Falle von Substanzverlust.

10. Diskontinuierliches Verfahren für die Herstellung von Schwämmen, die mindestens ein Hyaluronsäurederivat enthalten, wobei das genannte Verfahren die folgenden Schritte einschließt;

- a) Lösen eines Hyaluronsäurederivates in einem aprotischen Lösungsmittel bei einer Konzentration von zwischen 2 Gew.-% und dem Sättigungswert bei einer Temperatur von 40°C, wobei die genannte Konzentration so ausgewählt wird, dass sie den Konzentrationsschwellenwert, bei dem das Polymer in Form von Netzwerkstrukturen vorliegt, übersteigt;
- b) Einfüllen der Lösung aus Schritt a) in einen druckbeständigen Behälter;
- c) Einfüllen des Anti-Lösungsmittels bis ein Druck, der größer als die Fällung ist, erreicht wird, bei einer Temperatur von zwischen 10 und 70°C;
- d) Entfernen des aprotischen Lösungsmittels mit einem Strom des Anti-Lösungsmittels;

e) Ablassen des Druckes aus dem Behälter und Isolieren des Niederschlags.

11. Kontinuierliches Verfahren für die Herstellung von Fäden, die mindestens ein Hyaluronsäurederivat enthalten, wobei das genannte Verfahren die folgenden Schritte einschließt;

- a) Lösen eines Hyaluronsäurederivates in einem aprotischen Lösungsmittel bei einer Konzentration von zwischen 2 Gew.-% und dem Sättigungswert bei einer Temperatur von 40°C, wobei die genannte Konzentration so ausgewählt wird, dass sie den Konzentrationsschwellenwert, bei dem das Polymer in Form einer Netzwerkstruktur vorliegt, übersteigt;
- b) Einfüllen der Lösung in einen druckbeständigen Thermostat-Behälter;
- c) Einfüllen des Anti-Lösungsmittels bis ein Druck erreicht wird, der größer als die Fällung ist (abhängig von dem verwendeten organischen Lösungsmittel und der Temperatur) bei einer Temperatur von zwischen 10 und 70°C und Stabilisierung des Stroms des Anti-Lösungsmittels;
- d) kontinuierliches Injizieren der Lösung des Hyaluronsäurederivates in den Fällungsreaktor durch eine kalibrierte Öffnung, die auf einen Durchmesser von zwischen 40 und 400 Micron eingestellt ist;
- e) Unterbrechen der Injektion des Lösung;
- f) Entfernung beliebiger rückständiger Lösungsmittel mit dem Strom des Anti-Lösungsmittels;
- g) Ablassen des Druckes in dem Fällungsreaktor und Isolieren des Niederschlags.

12. Verfahren nach Ansprüchen 10 und 11, worin das Anti-Lösungsmittel aus der Gruppe ausgewählt wird, die besteht aus: Kohlendioxid, Kohlenwasserstoffen, Hydrogenfluorkohlenstoffen, Stickoxiden.

13. Verfahren nach Ansprüchen 10 und 12, worin das Anti-Lösungsmittel mit einer Geschwindigkeit oder einem Druckgradienten von 0,1 bis 20 Bar/min. eingefüllt wird, bis ein Druck von 40 bis 150 Bar erreicht wird.

14. Verfahren nach Ansprüchen 10–13, worin das aprotische Lösungsmittel, das im Schritt a) verwendet wird, um das Hyaluronsäurederivat zu lösen, ausgewählt wird aus der Gruppe, die besteht aus: Dimethylsulfoxid, N-Methylpyrrolidon, Dimethylformamid.

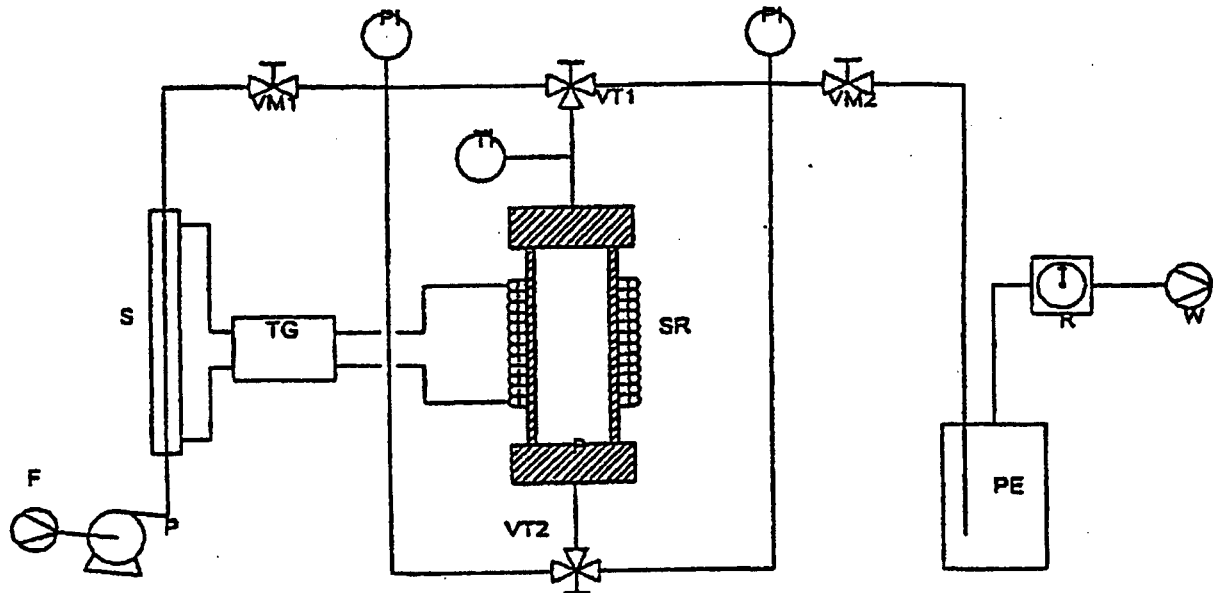
15. Verfahren nach Ansprüchen 10–14, worin das Hyaluronsäurederivat aus der Gruppe ausgewählt wird, die besteht aus: Estern der Hyaluronsäure, autovernetzten Derivaten der Hyaluronsäure oder Derivaten der Hyaluronsäure, die mit Hilfe von Spacer-Ketten vernetzt sind, Hemiestern der Bernsteinsäure oder Schwermetallsalzen der Hemiester der Bernsteinsäure mit Hyaluronsäure oder Partial- oder Total-Estern von Hyaluronsäure, sulfatierten oder N-sulfatierten Derivate, Amid-Derivaten der Hyaluronsäure.

16. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 10 und 12–15, zur Herstellung von Schwämmen, die pharmakologisch und biologisch aktive Verbindungen enthalten, worin diese Verbindungen während dem Schritt a) zugesetzt werden, nach dem Lösen des Hyaluronsäurederivates in dem aprotischen Lösungsmittel.

17. Verfahren nach Ansprüchen 11, 12, 14 und 15, zur Herstellung von Fäden, die pharmakologisch und biologisch aktive Substanzen enthalten, die im Schritt a) nach dem Lösen des Hyaluronsäurederivates in dem aprotischen Lösungsmittel zugesetzt werden.

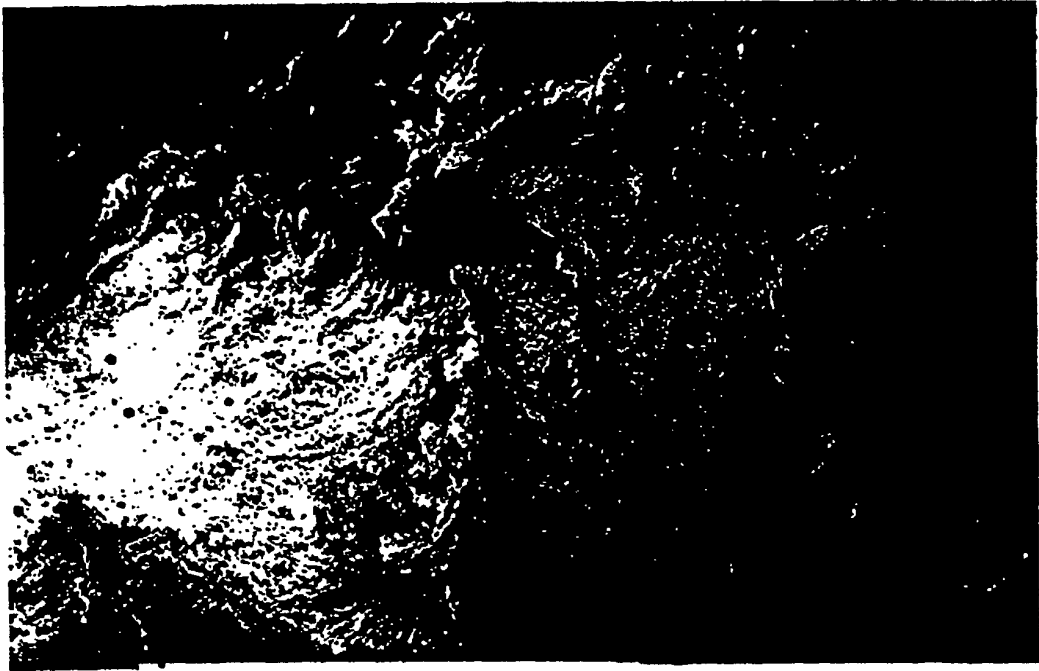
Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

FIG. 1



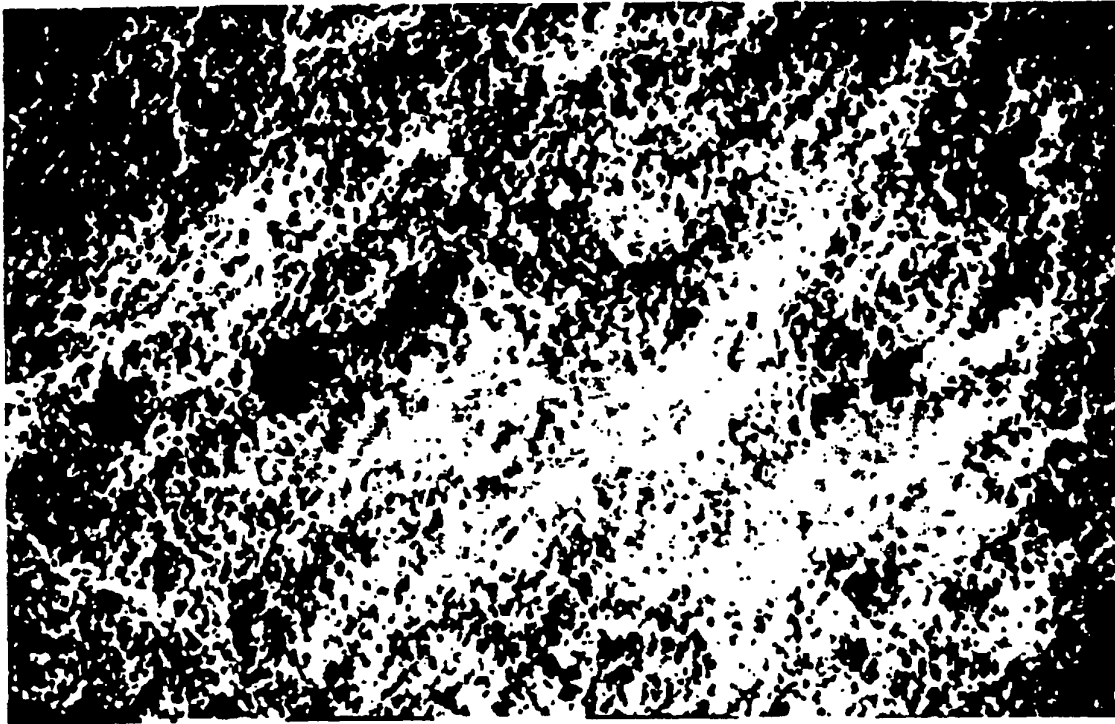
Figur 1: Diagramm des Verbindungsliniensystems für die SAS-Batch-Technik in den Tests für die Herstellung von Netzwerkstrukturen. F = CO₂-Bereitstellung; P = Tauchkolbenpumpe; S = Überhitzer; TG = Erwärmungsglykol-Thermostat; VM1, VM2 = millimetrische Einstellungsventile; VT1, VT2 = Dreiwegventile; P = Fällungsreaktor; SR = Heizspule; PE = Post-Expansionsgefäß; R = Rotameter; W = Abfall.

FIG. 2



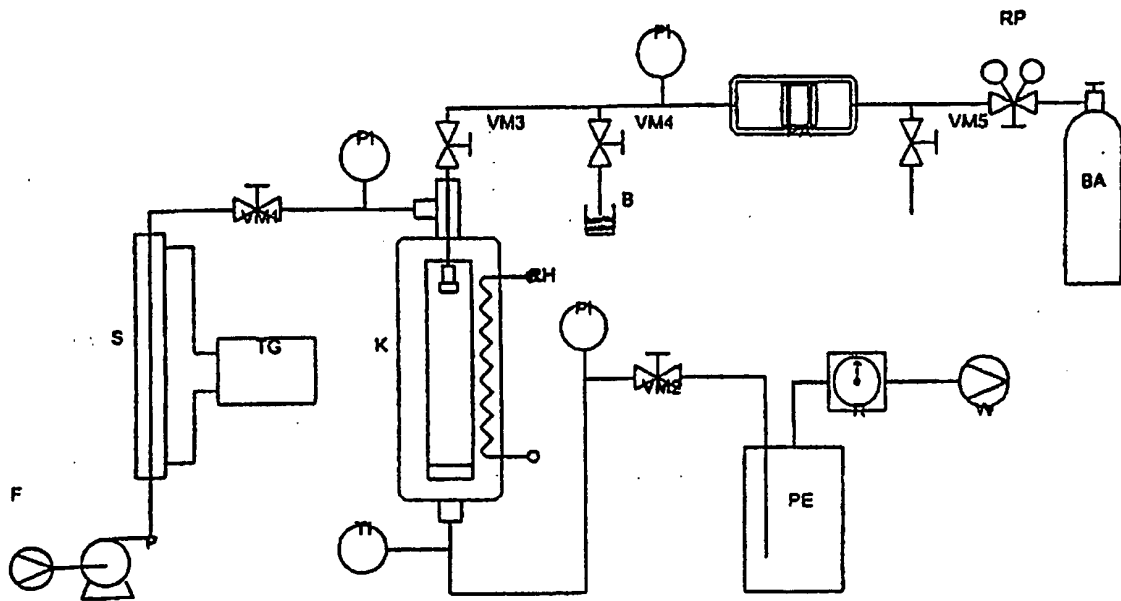
Figur 2: SEM-Photographie einer Probe von Hyaff-11 erhalten in Test 4 durch die SAS-Batch-Technik, durchgeführt bei 40°C ausgehend von einer 10 gewichtsprozentigen Lösung in DMSO (bar = 1 mm, x 55).

FIG. 3



Figur 3: SEM-Photographie einer Probe von Hyaff-11, erhalten in Test 4 durch die SAS-Batch-Technik, durchgeführt bei 40°C ausgehend von einer 10 gewichtsprozentigen Lösung von DMSO (bar = 100 μm , x 1490).

FIG. 4



Figur 4: Diagramm eines Systems zur Herstellung von Fäden von Hyaff durch die Verwendung einer kontinuierlichen SAS-Technik unter Verwendung einer Zelle mit einem Fenster (Lösung 2), F, Einspeisung; P Tauchkolbenpumpe; S Überhitzer; TG, Glykol-Thermostat-Heizung; VM1, VM2, VM3, VM4, VM5 millimetrische Einstellventile, K, Zelle mit Fenster; RH Heizspule; TI, Thermometer, PI, Manometer, BA Lufttrommel bei 200 bar; RP, Druckreduzierer; PA kontinuierliches wasserangetriebenes Injektionssystem; B, Behälter für die Isolierung der Lösung; PE, Post-Expansionsgefäß; R, Rotameter; W, Abfall.