



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900635289
Data Deposito	06/11/1997
Data Pubblicazione	06/05/1999

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

DERIVATI ESTEREI DELL'ACIDO IALURONICO AVENTI PROPRIETÀ VISCOELASTICHE E
LORO USO IN CAMPO BIOMEDICO-SANITARIO

PD 97 A 0 0 0 2 5 3

Fidia Advanced Biopolymers Srl
Via De' Carpentieri, 3 - BRINDISI
Partita IVA 01510440744

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo
"Derivati esterei dell'acido ialuronico aventi proprietà viscoelastiche e loro uso in
campo biomedico-sanitario", della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con sede in Via
De' Carpentieri 3, 72100 - Brindisi, Italia, nella persona del suo Presidente e Legale
Rappresentante, Dr. Lanfranco Callegaro.

Inventori: Davide RENIER; Alessandra PAVESIO; Lanfranco CALLEGARO

Depositata il 6-11-1997 con N.

**** *

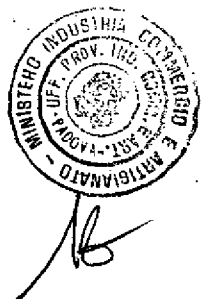
OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive particolari derivati esterei dell'acido ialuronico aventi la capacità di variare la loro viscosità al variare dello sforzo di taglio applicato e della temperatura. Tali derivati, eventualmente in associazione con farmaci e/o sostanze biologicamente attive, possono essere utilizzati vantaggiosamente per la preparazione di composizioni biomediche-sanitarie che, a seconda dell'andamento delle loro proprietà reologiche al variare dei suddetti parametri, risultano particolarmente adatte per distinti campi chirurgici o per il trasporto ed il rilascio di farmaci.

CAMPO DELL'INVENZIONE

Sono note preparazioni viscoelastiche in forma di gel (EP0466300) costituite da polimeri naturali e sintetici tra i quali l'acido ialuronico, i suoi sali, derivati reticolati dell'acido ialuronico per mezzo di agenti adatti, quali, ad esempio, il vinil sulfone, altri glicosamminoglicani e il loro uso in chirurgia viscolastica.

Le composizioni contenenti tali derivati sono in grado, infatti, di variare la loro viscosità al variare dello sforzo di taglio applicato.



I derivati esterei dell'acido ialuronico di cui alla presente invenzione (EP 0216453), oltre a variare la viscosità al variare dello sforzo di taglio applicato, mostrano sorprendentemente un andamento della viscosità crescente o decrescente all'aumentare della temperatura.

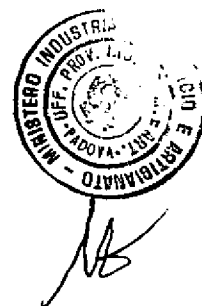
Ad esempio, l'estere propilico dell'acido ialuronico avente il 50% dei gruppi carbossilici esterificati presenta un andamento crescente della viscosità al variare della temperatura (Figura 1), mentre gli esteri butilico, benzilico, octilico aventi il 50% dei gruppi carbossilici esterificati presentano un andamento decrescente (Figure 2, 3, 4).

Tale risultato permette quindi di fornire composizioni biocompatibili che sono in grado di variare le loro proprietà reologiche quando vengono trasferite dall'ambiente esterno all'ambiente interno dell'organismo, a causa della variazione della temperatura.

A seconda degli usi, si possono preparare composizioni dei suddetti esteri, eventualmente in associazione con esteri autoreticolati dell'acido ialuronico (EP 0341745), con farmaci o con sostanze biologicamente attive, monitorando i valori della viscosità all'esterno e quella all'interno del corpo umano variando i seguenti parametri:

- il tipo di alcool legato ai carbossili dell'acido ialuronico;
- la percentuale di esterificazione;
- il tipo di sale usato per la salificazione dei gruppi carbossilici non esterificati;
- la concentrazione dei componenti.

Modulando tali parametri si possono ottenere composizioni che risultino facilmente iniettabili nell'organismo e che all'interno di quest'ultimo subiscano un aumento della



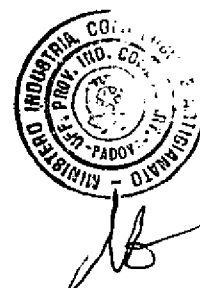
viscosità fino a raggiungere i valori adatti a svolgere la loro funzione . Questo comportamento può essere vantaggiosamente sfruttato nella prevenzione delle adesioni post-chirurgiche, nella viscosupplementazione, nel riempimento di organi artificiali.

I derivati, invece, che presentano una viscosità elevata rispetto a quella nel corpo umano possono essere vantaggiosamente impiegati nella preparazione di composizioni viscoelastiche, ad esempio oftalmiche, che in sito rilasciano lentamente il principio attivo in esse contenuto man mano che la viscosità diminuisce a causa dell'aumento della temperatura.

Tra i derivati di cui alla presente invenzione risultano particolarmente interessanti quelli in grado di subire una variazione delle proprietà reologiche in funzione della temperatura in tempi relativamente brevi (minori di due ore) da utilizzare in quei campi chirurgici per i quali sono importanti i tempi di transizione dei suddetti parametri, come ad esempio in oftalmologia.

Inoltre, tali derivati, inseriti all'interno dell'organismo, continuano ad avere proprietà viscoelastiche in funzione dello sforzo di taglio applicato.

Gli esteri viscoelastici dell'acido ialuronico secondo la presente invenzione possono essere vantaggiosamente impiegati in oftalmologia, ad esempio nella viscosupplementazione vitrea, in chirurgia artroscopica, ad esempio come lubrificanti e nella viscosupplementazione articolare, nella chirurgia maxillo-facciale, ad esempio come materiali ad uso iniettivo per il riempimento di rughe, nella sostituzione di tessuti soffici e per la crescita dei tessuti, in neurochirurgia e nella chirurgia in generale per la ricostruzione di organi o di loro parti e nel controllo delle adesioni



post chirurgiche, come materiali di riempimento di protesi artificiali, ad esempio come sostituti del gel di silicone nelle protesi mammarie e nei testicoli artificiali, in urologia, ad esempio per la preparazione di cateteri urologici e in oncologia.

Inoltre, tali composti possono essere vantaggiosamente impiegati per la preparazione di forme farmaceutiche che prevedono il rilascio controllato di farmaci e/o di sostanze biologicamente attive quali, ad esempio, peptidi, enzimi, proteine o loro frammenti e polinucleotidi da impiegare anche nel settore della vaccinazione.

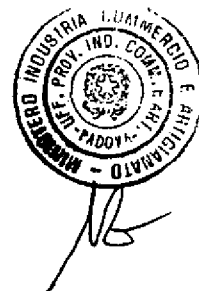
I derivati di cui alla presente invenzione possono essere utilizzati anche per il trasporto e il rilascio di sostanze biologicamente attive impiegate nel trattamento delle malattie associate a difetti genetici come, ad esempio, quelle che dipendono da una ipo- o iper-attività enzimatica dovuta a difetti del gene che codifica per un dato enzima, malattie malformanti di origine genetica e malattie ereditarie.

I derivati viscoelastici in forma di microsfele o nanosfele, in associazione con sostanze radioattive e non, usate nei sistemi di contrasto, possono essere utilizzati come traccianti nella diagnostica in vivo, per l'individuazione e la cura dei tessuti tumorali o che hanno subito lesioni.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive particolari derivati esterei dell'acido ialuronico, eventualmente in associazione con altri polimeri, quali ad esempio i derivati autoreticolati dell'acido ialuronico, e/o farmaci e/o sostanze biologicamente attive per la preparazione di composizioni biomediche-sanitarie aventi la capacità di variare la loro viscosità al variare dello sforzo di taglio applicato e della temperatura.

Tali composizioni, a seconda del derivato estereo dell'acido ialuronico utilizzato,



subiscono un aumento o una diminuzione della viscosità quando vengono immessi nell'organismo a causa dell'aumento della temperatura ed inoltre mantengono la loro viscoelasticità allo sforzo di taglio alla temperatura corporea.

Le composizioni secondo la presente invenzione possono essere utilizzate vantaggiosamente in chirurgia, per il trasporto ed il rilascio di farmaci e sostanze biologicamente attive.

Le proprietà reologiche dei derivati esterei dell'acido ialuronico sono state valutate utilizzando i reometri HAAKE RV 20 e RS 100 che possono lavorare con gradienti di sforzo di taglio, gradienti di frequenza e gradienti di temperatura.

Esempio 1

Preparazione del sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (peso molecolare 200 KDa) da ialuronato di sodio

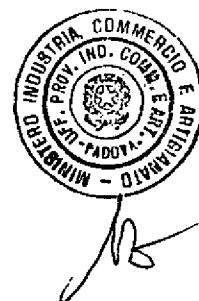
69 g di ialuronato di sodio vengono solubilizzati in 4 l di H₂O e vengono fatti passare attraverso una colonna riempita in precedenza con Resina Dowex M15 in "TBA-Form".

Dopo liofilizzazione si ottengono 100 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (200KDa) che vengono conservati in sacchetti di plastica da alimenti.

Esempio 2

Preparazione di HYAFF9 p50 (estere dell'acido ialuronico al 50% con 1-propilbromuro) dal sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (200 KDa)

16 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (200KDa) vengono solubilizzati in 800 ml di NMP (N-metilpirrolidone) in modo da ottenere una concentrazione di 20 mg/ml.



La quantità necessaria di alchilante (1,2 ml) viene calcolata in base al 50% di esterificazione desiderata, diluita con 10 ml di NMP e aggiunta lentamente alla soluzione di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico. La soluzione viene lasciata per almeno 60 ore a 37°C.

Infine, la soluzione viene scaricata dal reattore e dopo aver aggiunto 6 g di NaCl in soluzione satura viene sottoposta ad agitazione per mezza ora; si fa precipitare con 5 volumi di acetone, ed il precipitato viene filtrato e lavato con acetone/H₂O in rapporto 80/20 fino a saggio negativo con AgNO₃.

Dopo essiccamento a 30°C per almeno 48 ore si ottengono 10,1 g di prodotto.

Esempio 3

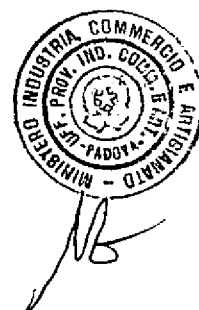
Preparazione di HYAFF10 p.50 (estere dell'acido ialuronico al 50% con 1-butylbromuro) dal sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (200 KDa)

15 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico vengono solubilizzati in 750 ml di NMP (N-metilpirrolidone) in modo da ottenere una concentrazione di 20 mg/ml.

La quantità necessaria di alchilante (1,35 ml), calcolata in base al 50% di esterificazione desiderata, viene diluita con 10 ml di NMP e aggiunta lentamente alla soluzione di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (lasciare avvenire la reazione per almeno 60 ore a 37°C).

La soluzione viene scaricata dal reattore e, dopo aver aggiunto 6 g di NaCl in soluzione satura, viene lasciata mezza ora sotto agitazione; viene fatta precipitare con 5 volumi di acetone, filtrata e lavata con acetone/H₂O in rapporto 80/20 fino a saggio negativo con AgNO₃.

Dopo essiccamento a 30°C per almeno 48 ore si ottengono 9,1 g di prodotto.



Esempio 4

Preparazione di HYAFF11p.50 (estere dell'acido ialuronico al 50% con benzilbromuro) dal sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (200 KDa) 15 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico vengono solubilizzati in 750 ml di NMP (N-metilpirrolidone) in modo da ottenere una concentrazione di 20 mg/ml.

La quantità necessaria di alchilante (1,47 ml), calcolata in base al 50% di esterificazione voluta, viene diluita con 10 ml di NMP e aggiunta lentamente alla soluzione di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (lasciare avvenire la reazione per almeno 60 ore a 37°C).

La soluzione viene scaricata dal reattore e, dopo aver aggiunto 6 g di NaCl in soluzione satura, viene lasciata sotto agitazione per mezza ora; viene fatta precipitare con 5 volumi di acetone, filtrata e lavata con acetone/H₂O in rapporto di 80/20 fino a saggio negativo con AgNO₃.

Dopo essiccamento a 30°C per almeno 48 ore si ottengono 9,1 g. di prodotto.

Esempio 5

Preparazione di HYAFF17p.50 (estere dell'acido ialuronico al 50% con octilbromuro) dal sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (200 KDa)

10 g di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico vengono solubilizzati in 500 ml di NMP (N-metilpirrolidone) in modo da ottenere una concentrazione di 20 mg/ml.

La quantità necessaria di alchilante (1,42 ml), calcolata in base al 50% di esterificazione desiderata, viene diluita con 10 ml di NMP e aggiunta lentamente alla soluzione di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (lasciare avvenire la reazione per almeno 60 ore a 37°C).



La soluzione viene scaricata dal reattore e, dopo aver aggiunto 4 g. di NaCl in soluzione satura, viene sottoposta ad agitazione per mezza ora; viene fatta precipitare con 5 volumi di acetone, filtrata e lavata con acetone/H₂O in rapporto 80/20 fino a saggio negativo con AgNO₃.

Dopo essiccamento a 30°C per almeno 48 ore si ottengono 4,7 g di prodotto.

Esempio 6

Preparazione di soluzioni acquose concentrate dei derivati esterei dell'acido ialuronico

I derivati esterei dell'acido ialuronico sono stati diluiti a concentrazioni diverse, a seconda del sostituyente, con acqua o.i. (ottenuta mediante osmosi inversa) in modo tale da ottenere soluzioni viscosi.

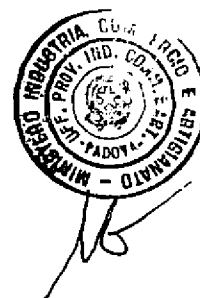
Sono stati preparati 20 ml di soluzione per ciascuno dei derivati riportati, ad esempio con le seguenti concentrazioni:

Estere	Concentrazione (mg./ml.)
HYAFF9 p.50	150
HYAFF10 p.50	120
HYAFF11 p.50	50
HYAFF17 p.50	20

La solubilizzazione viene eseguita versando in acqua lentamente e sotto agitazione lentamente i derivati esterei per evitare la formazione di grumi di soluto. I prodotti vengono conservati a +4°C fino all'utilizzo.

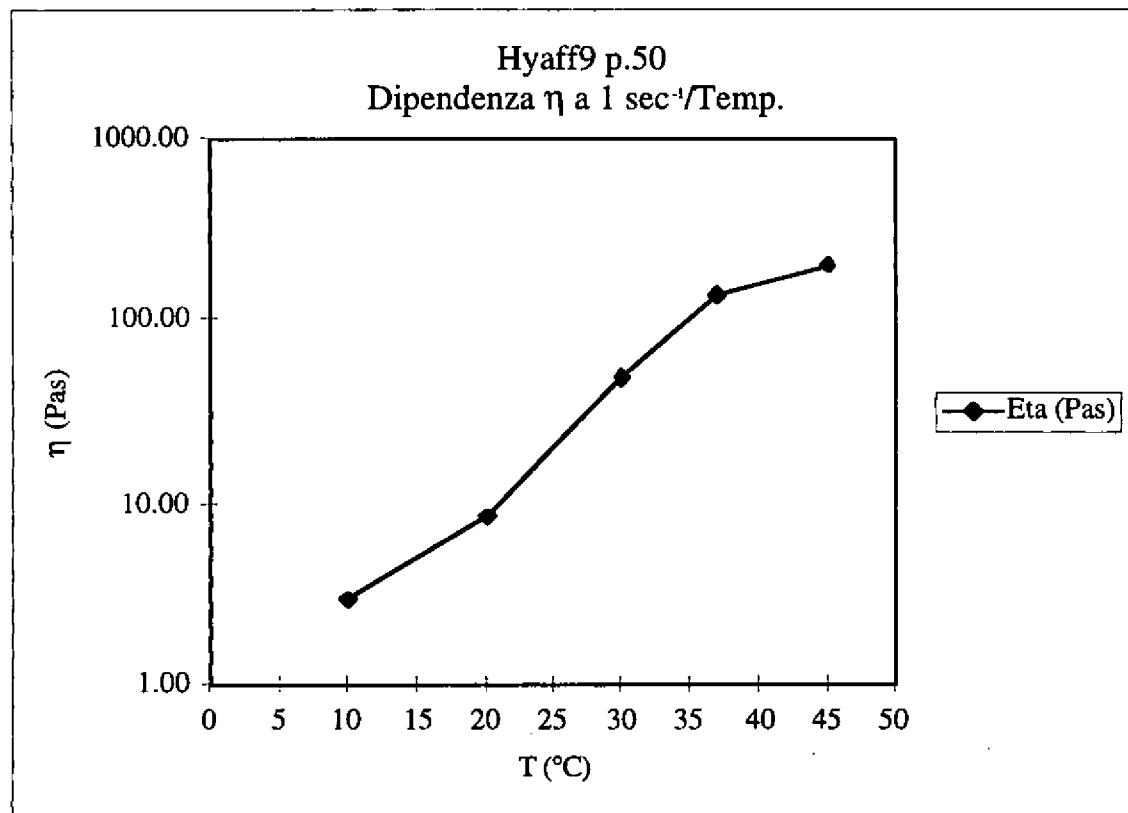
MISURE REOLOGICHE

-Misure in continuo: curve di flusso in moto continuo a diverse temperature per verificare per ogni prodotto l'andamento della viscosità in funzione della



temperatura:

Figura 1



T (°C.)	h (Pa s)
10	3.02
20	8.42
30	49.34
37	137.30
45	202.90

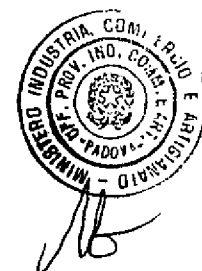
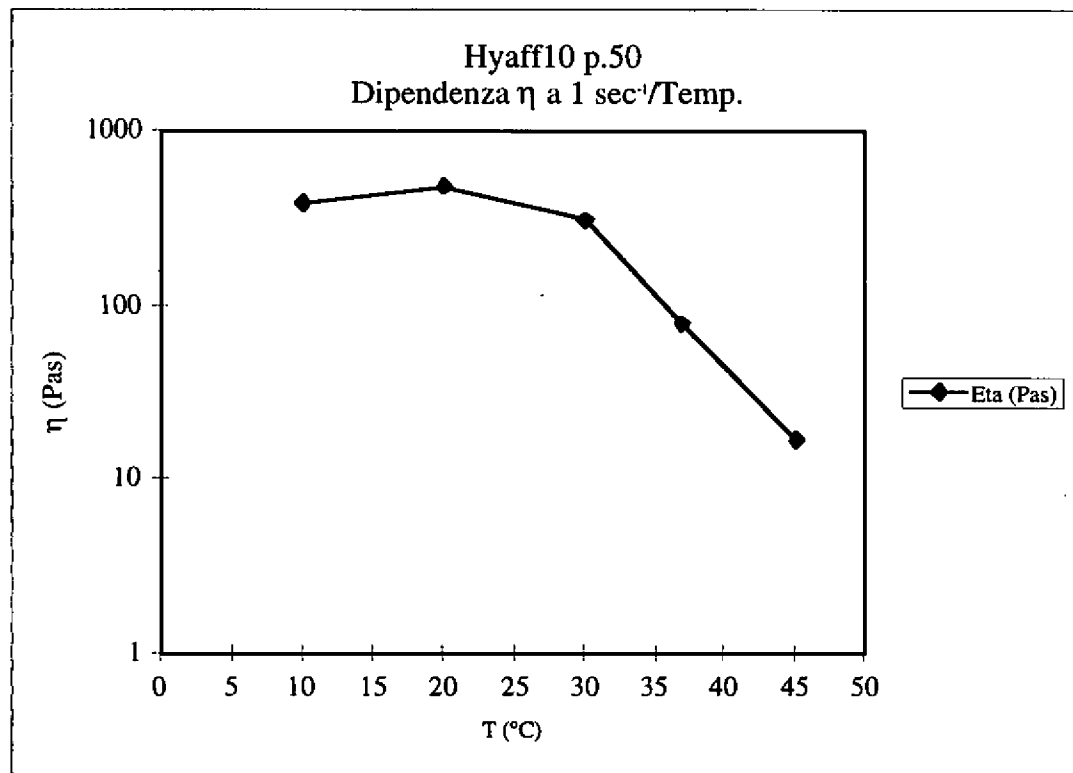


Figura 2



T (°C.)	η (Pa s)
10	393.10
20	479.73
30	309.97
37	79.97
45	17.42

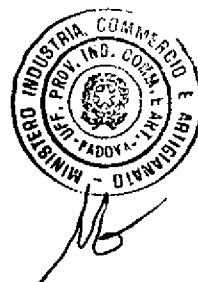
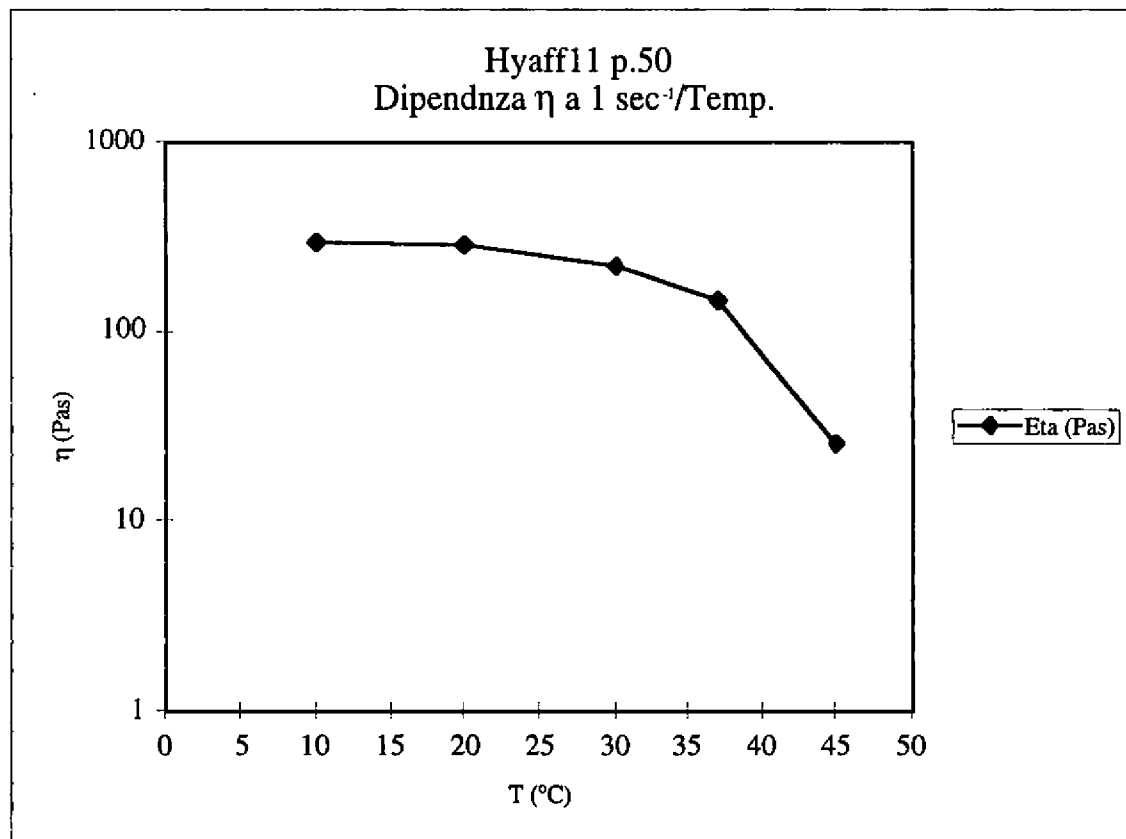


Figura 3



T (°C.)	η (Pa s)
10	295.20
20	280.43
30	224.20
37	143.27
45	26.27

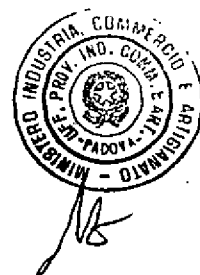
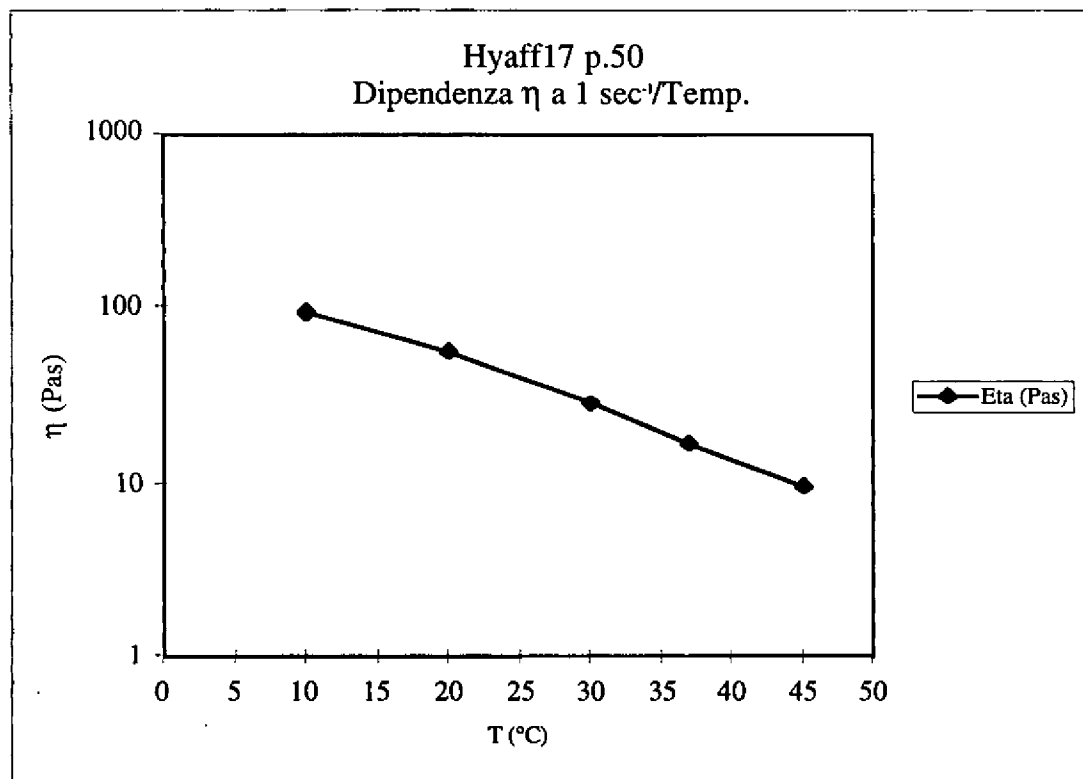


Figura 4



T (°C.)	η (Pa s)
10	295.20
20	280.43
30	224.20
37	143.27
45	26.27



-Misure in oscillatorio: Caratterizzazione dei moduli elastico e viscoso dei prodotti:

Figura 5

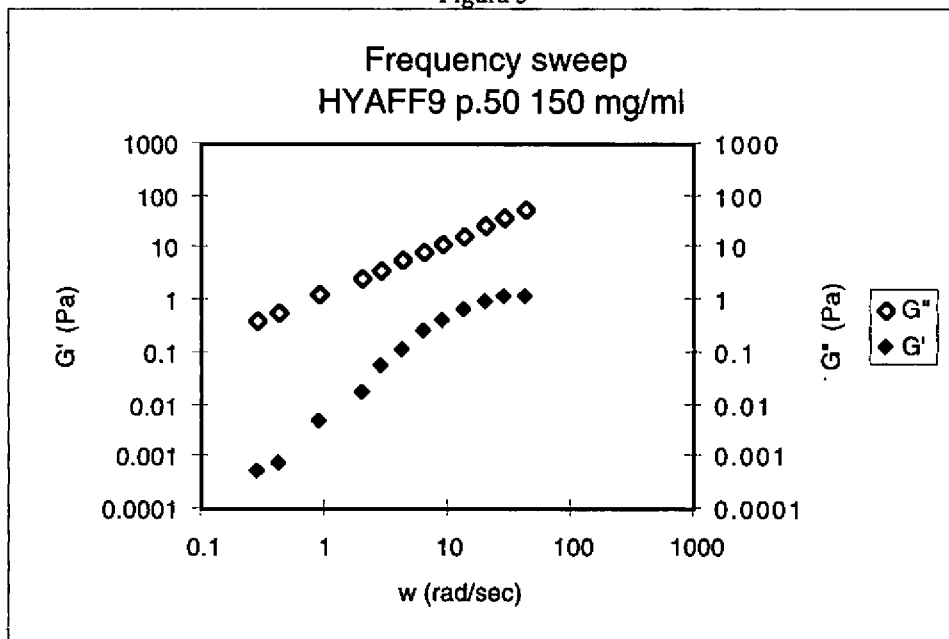


Figura 6

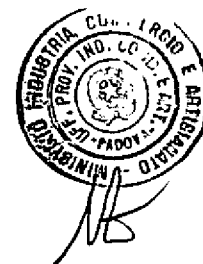
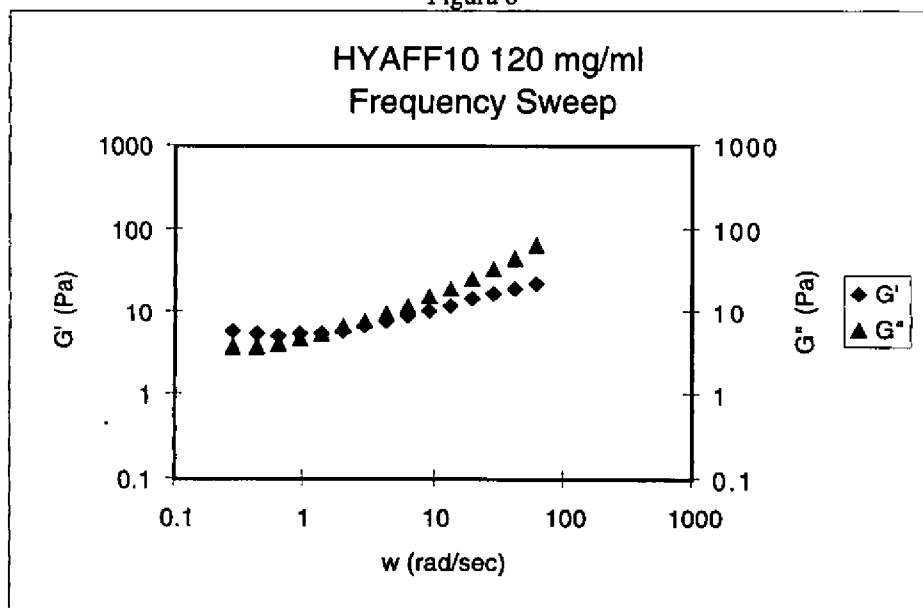


Figura 7

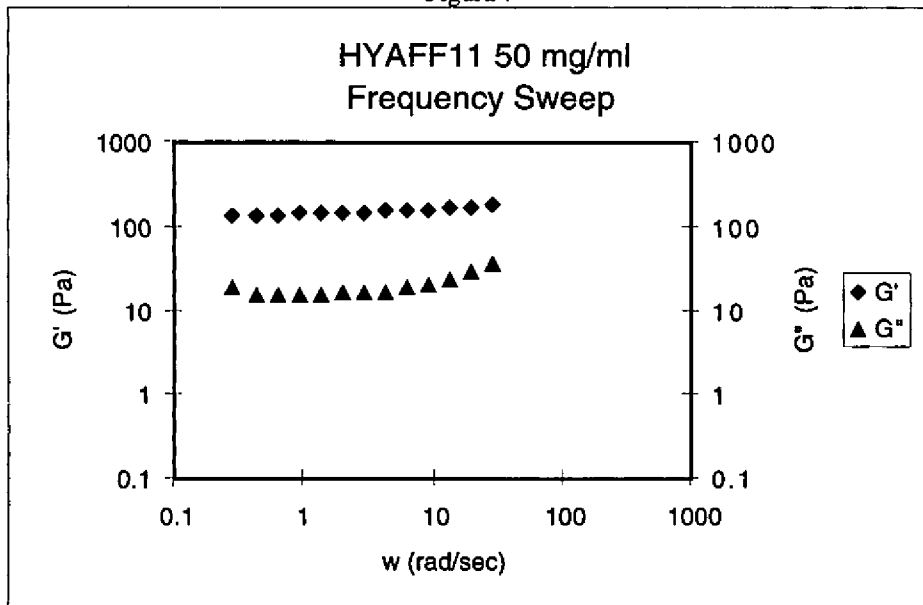
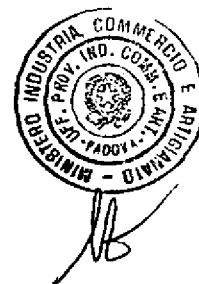
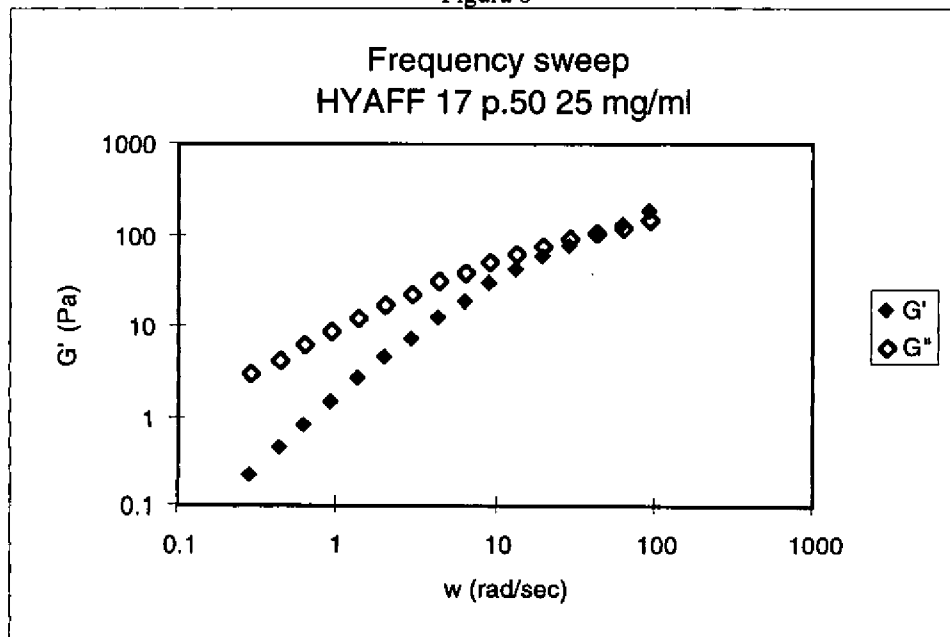


Figura 8



-Misure in oscillatorio: verifica degli andamenti della viscosità al variare della temperatura:

Figura 9

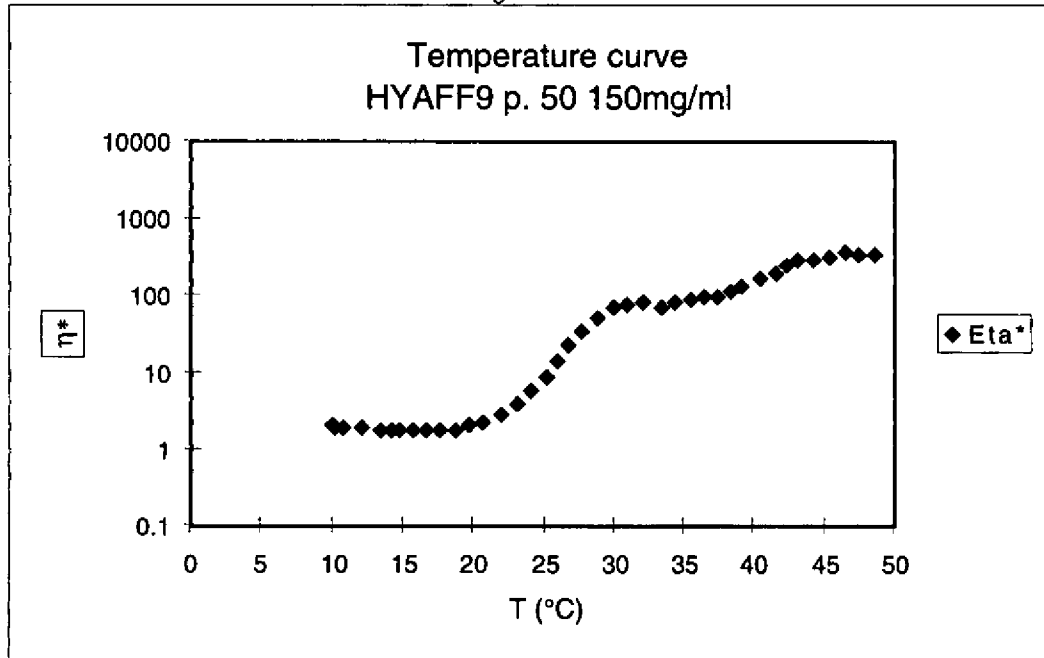


Figura 10

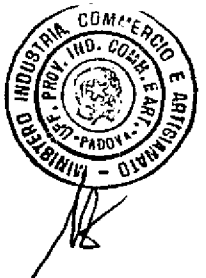
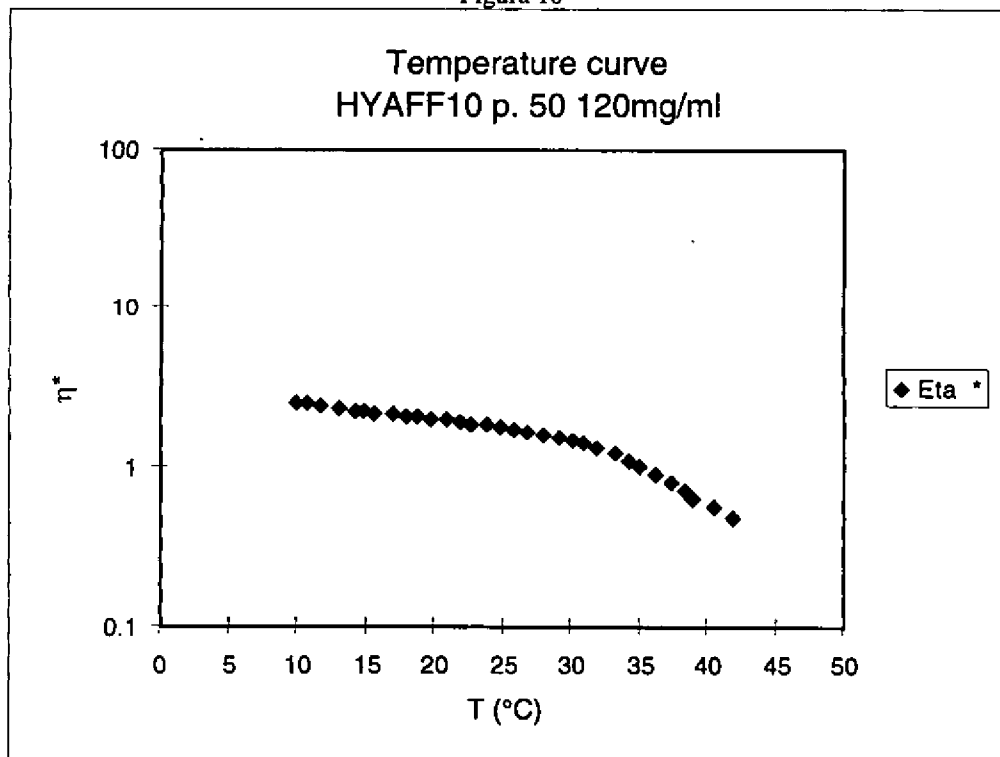


Figura 11

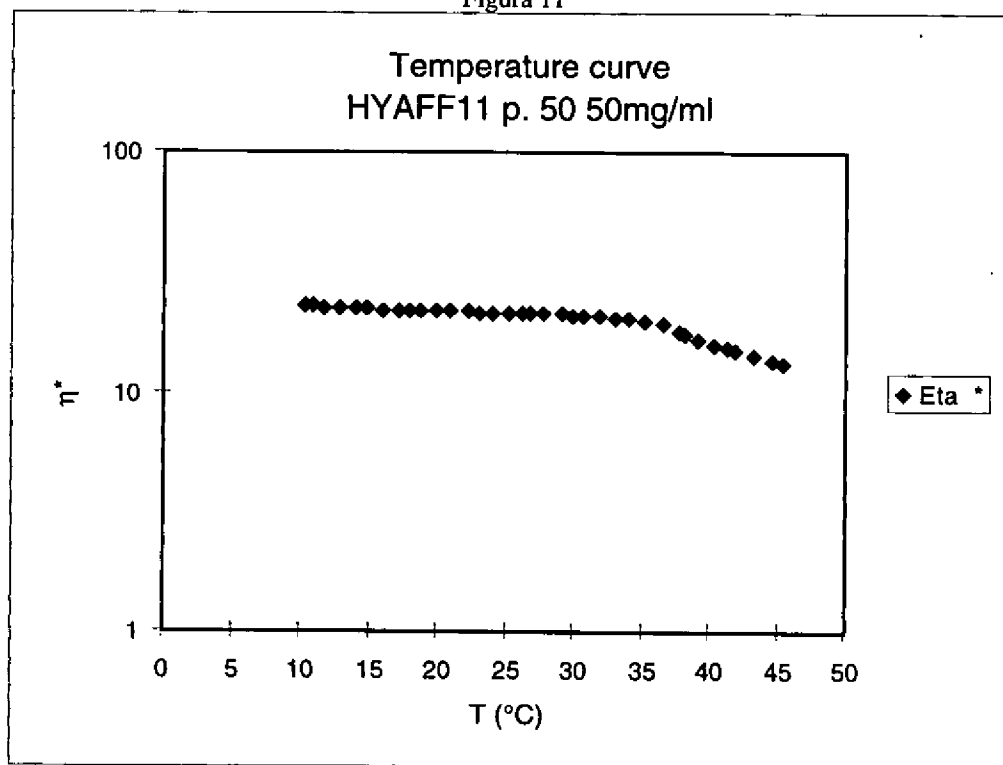
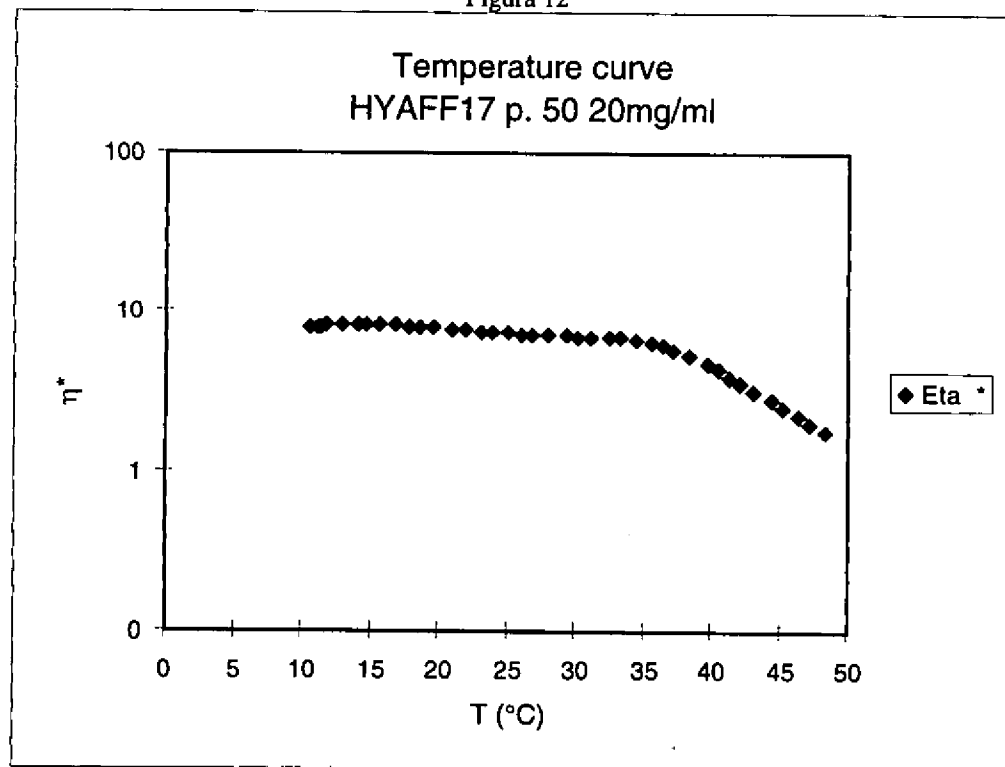


Figura 12



Andamento della viscosità in funzione dello sforzo di taglio a diverse temperature:

Figura 13

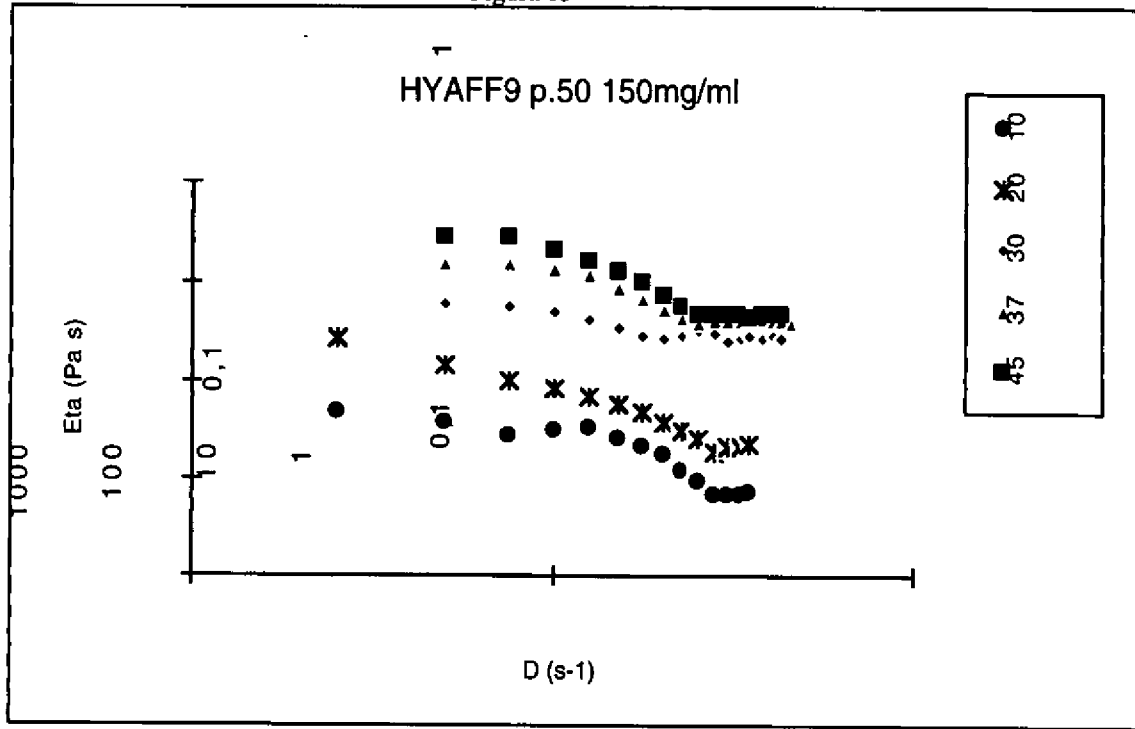
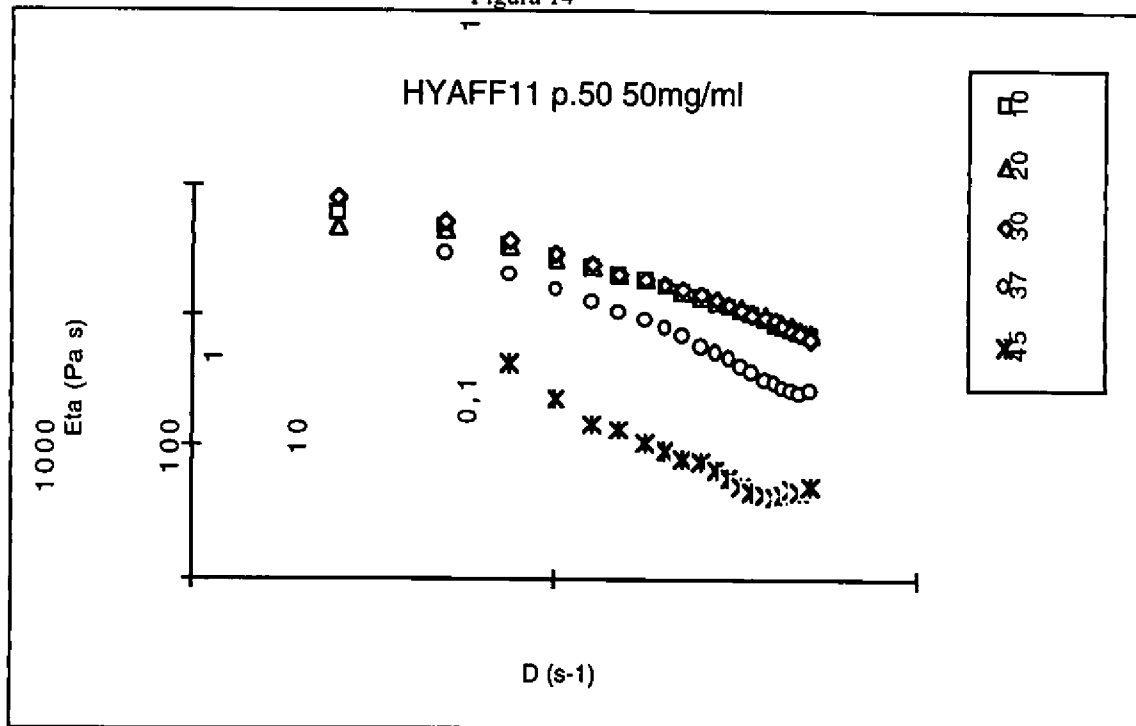


Figura 14

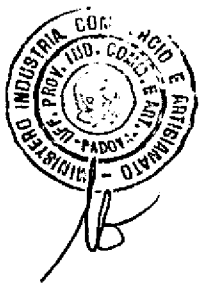


[Handwritten signature]

Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che queste composizioni possono essere modificate in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte quelle modificazioni che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

RIVENDICAZIONI

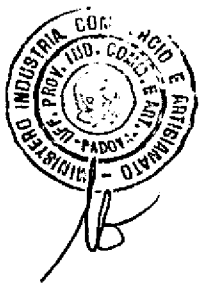
- 1) Composizioni viscoelastiche contenenti derivati esterei viscoelastici dell'acido ialuronico, eventualmente in associazione con altri polimeri e/o farmaci e/o sostanze biologicamente attive, aventi la capacità di modificare le loro proprietà reologiche al variare della temperatura e dello sforzo di taglio applicato.
- 2) Composizioni viscoelastiche di cui alla rivendicazione 1, in cui la viscosità aumenta o diminuisce all'aumentare della temperatura in seguito alla loro somministrazione nell'organismo.
- 3) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-2, in grado di mantenere nel sito di applicazione le proprietà viscoelastiche allo sforzo di taglio.
- 4) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-3, aventi la capacità di modificare le loro proprietà reologiche al variare della temperatura in tempi inferiori alle due ore.
- 5) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-4, in cui i polimeri eventualmente presenti sono derivati autoreticolati dell'acido ialuronico.
- 6) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-5, in cui le sostanze biologicamente attive sono peptidi, enzimi, proteine o loro frammenti,



Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che queste composizioni possono essere modificate in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte quelle modificazioni che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

RIVENDICAZIONI

- 1) Composizioni viscoelastiche contenenti derivati esterei viscoelastici dell'acido ialuronico, eventualmente in associazione con altri polimeri e/o farmaci e/o sostanze biologicamente attive, aventi la capacità di modificare le loro proprietà reologiche al variare della temperatura e dello sforzo di taglio applicato.
- 2) Composizioni viscoelastiche di cui alla rivendicazione 1, in cui la viscosità aumenta o diminuisce all'aumentare della temperatura in seguito alla loro somministrazione nell'organismo.
- 3) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-2, in grado di mantenere nel sito di applicazione le proprietà viscoelastiche allo sforzo di taglio.
- 4) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-3, aventi la capacità di modificare le loro proprietà reologiche al variare della temperatura in tempi inferiori alle due ore.
- 5) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-4, in cui i polimeri eventualmente presenti sono derivati autoreticolati dell'acido ialuronico.
- 6) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-5, in cui le sostanze biologicamente attive sono peptidi, enzimi, proteine o loro frammenti,



polinucleotidi, eventualmente utilizzabili nel campo della vaccinazione.

- 7) Composizioni viscoelastiche di cui alle rivendicazioni 1-6, in cui le sostanze biologicamente attive sono quelle impiegate nel trattamento di malattie dovute a difetti genetici.
- 8) Composizioni viscoelastiche di cui alla rivendicazione 7, in cui le malattie sono dovute a una ipo- o iper-attività enzimatica causata da un difetto del gene che codifica per un dato enzima.
- 9) Composizioni viscoelastiche di cui alla rivendicazione 7, in cui le malattie sono malattie malformanti di origine genetica e malattie ereditarie.
- 10) Composizioni viscoelastiche di cui alla rivendicazione 1, in cui i derivati esterei dell'acido ialuronico sono l'estere propilico, butilico, octilico, benzilico dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione 50%.
- 11) Uso dei derivati viscoelastici di cui alle rivendicazioni precedenti, in forma di microsfele o nanosfele da utilizzare come traccianti, eventualmente in associazione con sostanze radioattive e non, nei sistemi di contrasto, nella diagnostica in vivo, per l'individuazione e la cura dei tessuti tumorali o che hanno subito lesioni.
- 12) Uso dei derivati esterei viscoelastici dell'acido ialuronico di cui alle rivendicazioni precedenti per la preparazione di composizioni viscoelastiche biomediche-sanitarie.
- 13) Uso di composizioni viscoelastiche secondo le rivendicazioni 1-10, in chirurgia.
- 14) Uso di composizioni viscoelastiche secondo le rivendicazioni 1-11, per il trasporto e il rilascio di farmaci e sostanze biologicamente attive.
- 15) Uso di composizioni viscoelastiche secondo la rivendicazione 14, in cui le



sostanze biologicamente attive sono peptidi, enzimi, proteine o loro frammenti, polinucleotidi utilizzati anche nel campo della vaccinazione, sostanze per il trattamento di malattie dovute a difetti genetici o utilizzate in oncologia.

- 16) Uso di composizioni viscoelastiche secondo la rivendicazione 15, per il trattamento di malattie dovute ad una ipo- o iper-attività enzimatica causata da difetti del gene.
- 17) Uso di composizioni viscoelastiche secondo la rivendicazione 14, per il trattamento di malattie malformanti di origine genetica e malattie ereditarie.
- 18) Uso di composizioni viscoelastiche secondo le rivendicazioni 1-11, in oftalmologia, nella viscosupplementazione vitrea, in chirurgia artroscopica, in chirurgia maxillo-facciale, in chirurgia estetica, nella sostituzione di tessuti soffici e per la crescita dei tessuti, in neurochirurgia, nella ricostruzione di organi e loro parti, nella prevenzione delle adesioni post-chirurgiche, come materiale di riempimento di protesi artificiali, in urologia e in oncologia.



Fidia Advanced Biopolymers S.r.l.
Dott. Livio Callegaro
Presidente