República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0722061-8 B1

(22) Data do Depósito: 21/12/2007

(45) Data de Concessão: 15/05/2018

(54) Título: USO DE UM POLÍMERO CONTENDO GRUPO TIOL E IMPLANTE

(51) Int.Cl.: A61L 27/20; A61L 27/50

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2006 AT A 2136/2006, 22/12/2006 US 60/871,534
(73) Titular(es): CROMA-PHARMA GESELLSCHAFT M.B.H.

(72) Inventor(es): MARGIT HORNOF

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE UM POLÍMERO CONTENDO GRUPO TIOL E IMPLANTE".**

A presente invenção se refere ao uso de polímeros para aumento de tecido para razões médicas e cosméticas.

Para o aumento de tecidos, polímeros tipo, por exemplo, ácido hialurônico reticulado com compostos de éter e éster (reticulados com sulfona de divinila: WO 2006/056204; reticulação com aldeídos: US 4.713.448; reticulados com compostos de epóxi multifuncionais: EP 0 161 887) são geralmente usados. Depois de implantação no corpo humano, estes compostos podem resultar em reações inflamatórias, reações alérgicas e reações de corpo estranho (Parade e outro, Skinmed. 4 (2005) : 345-349; Lemperle e outro, Plast. Reconstr. Surg. 118 (2006): 92S-107S). Tais processos inflamatórios podem resultar no desenvolvimento de compostos de oxigênio reativo.

A ativação de compostos de oxigênio para compostos de oxigênio reativo (radicais livres e espécies de oxigênio de não radical) é parte dos processos metabólicos normais dentro da estrutura de processos celulares, reações de auto-oxidação e reações enzimáticas. Causas adicionais para a formação de compostos de oxigênio reativo são, por exemplo, processos inflamatórios, lesões de articulação e tecido, assim como fatores ambientais exogênicos, tais como radiação de UV, fumaça de cigarro, exposição à radiação e ozônio. Normalmente, nesse sentido, existe um equilíbrio entre processos oxidativos e redutivos. Se, no entanto, as reações oxidativas prevalecem, um estresse oxidativo (condição oxidativa) se desenvolverá. Pelo ataque dos radicais livres, lipídeos, proteínas e DNA ficam danificados. Este dano é, entre outras coisas, provavelmente a causa de mudanças e doenças relacionadas à idade, por exemplo, do envelhecimento de pele, diabetes, doenças vasculares e doenças neurodegenerativas.

Radicais livres, tais como radicais de hidroxila, em muitos casos são corresponsáveis por doenças inflamatórias, por exemplo, pelo desenvolvimento e perpetuação de doenças inflamatórias das articulações, tais como artrite reumatóide. Dentro do estabelecimento de uma artrose, radicais livres

causarão a degradação de ácido hialurônico no fluido sinovial, resultando em uma diminuição na viscosidade e no efeito lubrificante do fluido sinovial (Lepperdinger e outro, in Chemistry and Biology of Hyaluronan (2004): 71-82).

Normalmente, também o líquido lacrimal contém eliminadores de radical, tais como, por exemplo, cisteína, ácido ascórbico e glutationa reduzida, e enzimas antioxidantes, tais como, por exemplo, lactoferrina e lisozima, a fim de proteger a superfície ocular contra dano oxidativo por radicais livres (radicais de hidroxila, por exemplo) (Rose e outros, Proc. Soc . Exp. Biol. Med. 217 (1998): 397-407).

Pela remoção de radicais livres por meio de eliminadores de radical, processos inflamatórios podem ser inibidos. Funções protetoras endógenas contra compostos de oxigênio reativo são realizadas por enzimas, tais como catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx), assim como glutationa reduzida (GSH) e proteínas de formação de ferro e cobre (por exemplo, ferritina, albumina, lactoferrina). Antioxidantes exógenos importantes são ácido ascórbico e derivados, tocoferol e retinóides. A maior parte dos medicamentos moleculares pequenos anti-inflamatórios, tais como, por exemplo, Diclofenaco e Piroxicam, também possuem propriedades de eliminação de radical (Aruoma and Halliwell, Xenobiotica 18 (1988): 459-470).

Ácido hialurônico, o qual é usado frequentemente para aumento de tecido, exibe, ele próprio, um efeito anti-inflamatório menor e é um eliminador fraco de radicais de hidróxi. A fim de aumentar o efeito antioxidativo de ácido hialurônico e reduzir reações inflamatórias depois da injeção de ácido hialurônico, a aplicação combinada de ácido hialurônico com manitol foi proposta (WO 2004/073759). No entanto, este tipo de aplicação é desvantajosa porque manitol pode difundir-se através do depósito de ácido hialurônico. Em um método adicional, a enzima superóxido dimutase foi conjugada ao ácido hialurônico, o que resultou em uma diminuição de atividade de enzima de 30% (Sakurai e outro, Glycoconj J. 14 (1997): 723-728). Ainda que ambas as propostas aumentem o efeito antioxidativo de ácido hialurôni-

co, o efeito desejado permanece durante um curto período de tempo porque a reabsorção do ácido hialurônico não é reduzida. Ácido hialurônico não modificado, isto é, ácido hialurônico não reticulado, é reabsorvido dentro de uma dupla de horas ou dias depois de sua implantação dentro do corpo humano.

Por esse motivo, é um objetivo da presente invenção fornecer compostos para aumento de tecido que, por causa de suas propriedades de eliminação de radical e de complexação de íon de metal multivalente, possuem um efeito antioxidante e, simultaneamente, são caracterizados por um tempo de permanência mais longo no sítio de aplicação.

Por esse motivo, a presente invenção refere-se ao uso de um polímero contendo grupo tiol para produção de um implante para o aumento e estabilização de tecido, em que o polímero é um polissacarídeo, que é de preferência biodegradável. A aplicação ocorre, de preferência, por meio de injeção subdérmica, intradérmica, subcutânea ou intramuscular.

Foi constatado que polímeros contendo grupo tiol, isto é, compostos de polímero fisiologicamente tolerável contendo grupo tiol, são particularmente bem adequados para aumento de tecido, em que estes polímeros exibem ao mesmo tempo um efeito protetor anti-inflamatório/antioxidativo.

Processos oxidativos desempenham um papel decisivo em um grande número de doenças, desde que tais processos resultem em um dano de DNA, proteínas e lipídeos. Os processos oxidativos podem ser induzidos por causas extrínsecas (por exemplo, por influências ambientais, tais como radiação (radiação de UV, radiação ionizante), agentes oxidantes etc.), e causas intrínsecas (por exemplo, por inflamações), respectivamente.

Acoplamento direto de antioxidantes de tiol ao polímero possui a vantagem de que o efeito protetor antioxidativo é mantido durante o tempo de permanência total do polímero e que a reticulação, devido às funções de ligações de dissulfeto, contribui para a estabilidade do polímero. A melhora do eliminador de hidróxi e propriedades antioxidativas de ácido hialurônico alcançada por tiolação é exemplificada na Figura 2, Figura 3 e Figura 4.

De acordo com a presente invenção, o termo "implante" refere-se a uma preparação tipo gel ou semissólida fluida preferível estéril injetável, que essencialmente permanece durante pelo menos diversas semanas, meses ou até durante anos em ou no arredor do sítio de aplicação até que o implante seja degradado pelo menos parcialmente, de preferência substancial e completamente.

De acordo com uma modalidade preferida, o polímero contendo grupo tiol possui uma massa molecular de pelo menos 10000 g/mol, de preferência de pelo menos 25000 g/mol, em particular pelo menos 50000 g/mol.

A massa molecular do polímero contendo grupo tiol inventivo é de particular relevância se for importante que, quando usando o polímero, o último permaneça diretamente no sítio ativo ou no arredor imediato deste durante um período mais longo de tempo do que antioxidantes conhecidos até aqui que possuem uma massa molecular substancialmente inferior. Isto é particularmente vantajoso se é importante controlar processos de oxidação local ou pará-los, respectivamente, ou reduzi-los. Por esse motivo, é preferido para o polímero contendo grupo tiol possuir pelo menos uma massa molecular de 10000 g/mol.

O grupos de tiol dentro do polímero de preferência formam ligações de dissulfeto inter- e/ou intra-moleculares.

A capacidade do polímero contendo grupo tiol inventivo de formar ligações de dissulfeto é necessária se é importante exercer as propriedades antioxidantes no sítio ativo ou no arredor deste. Tal como ilustrado na Figura 1, o polímero contendo grupo tiol reduzido pode ser usado para redução de dissulfeto de glutationa que desempenha um papel decisivo na desintoxicação de peróxido de hidrogênio. Devido a suas propriedades antioxidantes, polímeros contendo grupo tiol, além disso, inibem o estresse oxidativo diretamente causado pelos radicais de hidroxila e, desta forma, eles podem prevenir dano do DNA, lipídeos e proteínas. Além disso, polímeros contendo grupo tiol inibem a formação de radicais de hidroxila por complexação de íons de ferro divalentes. Deste modo, a reação de Fenton de peróxido de hidrogênio para radicais de hidroxila pode ser parada ou largamente reduzi-

da, respectivamente.

Depois da síntese do polímero de acordo com a presente invenção, todos os seus grupos de tiol são de preferência disponíveis como grupos de tiol livres, a fim de que o polímero seja reticulado em um baixo grau ou até não reticulado na totalidade. Isto permite produzir soluções aquosas de fase única de polímeros que podem facilmente ser também processados e permite introduzir, nos referidos polímeros, excipientes farmacêuticos ou compostos farmaceuticamente ativos. A reticulação ocorre posteriormente sob condições controladas por mudança do pH a valores de pH fisiológicos entre pH 6 a 10,5 na presença de oxigênio. A adição de um agente de reticulação não é necessária. Para a aplicação em aumento de tecido para razões medicinais e cosméticas, a reticulação parcial dos polímeros por meio de pontes de dissulfeto é preferida.

Poderia ser mostrado também que polímeros compreendendo grupos de tiol reticulados por meio de pontes de dissulfeto para aumento de tecido exibem uma estabilidade muito mais elevada comparada a polímeros convencionais conhecidos na técnica.

O polímero, de acordo com a presente invenção, pode ser usado cosmeticamente ou terapeuticamente por meio do tecido macio, em particular tecido dérmico, tecido muscular e tecido conjuntivo, é de preferência aumentado. O aumento dérmico cosmético é de preferência usado para tratar rugas cosmeticamente profundas na região da face, em particular em dobras nasolabiais, dobras de lábios superiores e dobras de testa, dobras finas no olho e região da bochecha, pequenas irregularidades da pele e estabelecimento de bochechas contraídas.

A porção de grupo tiol do polímero de preferência é maior do que 20 µmol/g de polímero, de preferência maior do que 50 µmol/g de polímero, em particular maior do que 100 µmol/g de polímero.

As propriedades antioxidantes dos polímeros contendo grupo tiol inventivos são particularmente vantajosas se o polímero compreende, pelo menos, 50 µmol de grupos tiol por grama de polímero.

De acordo com a invenção, polímeros que são fisiologicamente

toleráveis e que podem ser modificados por grupos de tiol são adequados. Polímeros de base são selecionados do grupo de polissacarídeos. Polímeros contendo grupo tiol são de preferência selecionados do grupo, consistindo em ácido hialurônico contendo grupo tiol, quitosana contendo grupo tiol e combinações destes polímeros contendo grupo tiol provaram ser particularmente vantajosos para o uso de acordo com a invenção.

Alguns destes polímeros, tais como, por exemplo, ácido hialurônico tiolado, já estão sendo usados como excipientes em medicamentos, por exemplo, a fim de introduzir substâncias ativas mais facilmente e eficientemente em camadas de muco (cf., por exemplo, WO 00/25823). Atualmente, no entanto, foi surpreendentemente constatado que tais compostos de polímero exibem eles próprios um efeito farmacológico e podem ser usados como antioxidantes. Os grupos de tiol dos polímeros são capazes de aumentar significantemente as propriedades antioxidantes possivelmente presentes em polímeros não tiolados, ou conferir propriedades antioxidantes aos polímeros.

O tempo de permanência pode ser influenciado pela escolha do polímero. Os biopolímeros ácido hialurônico e quitosana são degradados por hialuronidase e lisozima, respectivamente, naturalmente presentes em um mamífero, em particular em um ser humano. Para a degradação de polímeros sintéticos como ácido poliacrílico ou poliacrilamida, nenhuma enzima está presente em um corpo de mamífero, o que tem a consequência de que os referidos polímeros têm de ser removidos do corpo por cirurgia, por meio do que polímeros biodegradáveis durante um período de tempo de pelo menos 6, 12, 24 ou até 60 meses são degradados por enzimas e consequentemente removidos do corpo.

Pelo menos um grupo tiol do polímero inventivamente usado de preferência é derivado de um composto de tiol fisiologicamente tolerável, por exemplo, cisteína, cisteamina e N-acetilcisteína, o que significa que estes compostos de tiol ou seus derivados podem ser usados para polímeros tiolados.

De acordo com a invenção, a tiolação pode ser efetuada por to-

dos os tipos de reações químicas pelas quais compostos de tiol são ligados a polímeros, em particular a polímeros solúveis em água. Por diversas razões, o uso de cisteína e derivados de cisteína é aconselhável para a tiolação, uma vez que o formador é fisiologicamente tolerável, por um lado, e econômico e fácil de obter, por outro lado. Cisteína e derivados de cisteína de preferência podem ser ligados ao polímero por meio de uma ligação de amida. Por outro lado, o polímero inventivo pode também ser preparado pelo fato de que no decorrer da produção do polímero, pelo menos um monômero é (co-) polimerizado com grupos de tiol, os quais possuem grupos de tiol livres no polímero, o que significa que os grupos de tiol não são diretamente reagidos na reação de polimerização. Um tal polímero que contém pelo menos um monômero que possui grupos de tiol livres no polímero é também preferido de acordo com a invenção (cf., por exemplo, Bernkop-Schnürch, Adv. Drug Deliv. Rev. 57 (2005) : 1569-1582).

Dependendo do sítio de aplicação ou sítio ativo, o implante da invenção é fornecido em uma formulação correspondente. As substâncias auxiliares requeridas aqui cada uma dependerá da formulação e são suficientemente conhecidas à pessoa versada na técnica (cf., por exemplo, Sarfaraz Niazi, "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", CRC Press (2004)).

Os polímeros contendo grupo tiol de acordo com a invenção podem também ser usados subcutaneamente e intradermicamente para aumento dérmico. Em produtos cosméticos, polímeros tais como, por exemplo, ácido hialurônico, são conhecidos e agentes auxiliares frequentemente usados para alívio de sinais de envelhecimento de pele (rugas, secura, perda de elasticidade) os quais, i.a., são associados a uma redução de ácido hialurônico por radicais livres no tecido (Agren e outros, Free Radic. Biol. Med. 23 (1997): 996-1001). Devido às propriedades antioxidantes dos polímeros contendo grupo tiol inventivos, de preferência ácido hialurônico contendo grupo tiol, a degradação mediada por radical de ácido hialurônico contendo grupo tiol reduz depois de uma aplicação subcutânea ou intradérmica.

Nas formulações para aplicação subcutânea ou intradérmica, o

polímero contendo grupo tiol pode estar presente em uma concentração de 0,001 a 20% (m/v), de preferência de 0,01 a 10% (m/v). As formulações podem, além do mais, conter excipientes adicionais que são normalmente usados para preparações para aplicação subcutânea ou intradérmica, por exemplo, sais de tampão, estabilizantes, excipientes para ajuste da osmolaridade desejada, excipientes para ajuste da viscosidade desejada, e excipientes para realce da tolerância da formulação. A osmolaridade e o pH da formulação acabada de preferência estão na faixa fisiológica.

O implante é particularmente preferido, formulado como gel ou como preparação aquosa, de preferência de fase única.

O implante de acordo com a invenção, o qual compreende pelo menos um polímero contendo grupo tiol, pode ser formulado em uma pluralidade de formas de aplicação. Particularmente vantajosa é a provisão da formulação como solução/preparação aquosa. Se o implante é fornecido como uma solução aquosa, o último pode ser administrado de uma maneira simples subcutaneamente, intradermicamente ou intramuscularmente em um local desejado.

O uso de polímeros possuindo a forma de géis e soluções fracamente viscosas aquosas, ou na forma de preparações sólidas (também como suplementos para a liberação de substância ativa controlada) como implantes no corpo humano, pode causar reações inflamatórias no tecido circundante. Pela eliminação de radical e efeito antioxidante que os polímeros contendo grupo tiol inventivos exercem, estas reações inflamatórias podem ser aliviadas ou totalmente eliminadas, respectivamente. Isto se aplica, por exemplo, à aplicação intradérmica e subcutânea de polímeros contendo grupo tiol para injeção debaixo de rugas, ao uso de polímeros contendo grupo tiol para aumento de esfíncter e à implantação de preparações (semi-) sólidas com base em polímeros contendo grupo tiol.

Mostrou-se que é particularmente vantajoso usar o polímero de acordo com a presente invenção como uma preparação aquosa de fase única homogênea que pode ser distribuída depois da aplicação de um modo fácil e que pode ser degradado igualmente lentamente por enzimas presen-

tes no sítio de aplicação. Com partículas de polímero reticulado tal como descrito, por exemplo, no WO 99/31167, apenas formulações de duas fases podem ser produzidas, o que consiste em uma suspensão de partículas em um meio portador líquido. Com tais formulações é difícil estimar a quantidade requerida do implante para um aumento (por exemplo, injeções debaixo de rugas), porque o meio portador é absorvido bastante rapidamente do corpo e as partículas residuais possuem um volume significantemente reduzido. Por esse motivo, a aplicação deve ser corrigida, o que torna difícil obter um resultado satisfatório.

De acordo com uma modalidade preferida, o medicamento ou o implante, além disso, adicionalmente compreende pelo menos uma substância ativa; para a aplicação em dermatologia, de preferência uma substância ativa do grupo dos anestésicos locais (por exemplo, lidocaína, prilocaína, procaína, mepivacaína), antimicóticos (por exemplo, omoconazol, clotrimazol, bifonazol, miconazol, floconazol, itraconazol, oxiconazol, fenticonazol, terbinafina, ciclopirox, amorolfina), anti-histaminas, agentes antialérgicos, agentes anti-inflamatórios, antibióticos (por exemplo, tetraciclina e derivados, ácido fusidínico, cloranfenicol, neomicina, bacitracina, gentamicina, tirotricina, mupirocina, virginiamicina, rifaximina e amicacina), agentes quimioterapêuticos, agentes antivirais, emolientes, agentes de proteção de pele, agentes para tratamento de ferimentos, agentes antiacne tópicos e corticosteróides, antiflogísticos não esteroidais, agente para tratamento de hemorróidas, antissépticos tópicos e agentes contendo iodo. Além disso, pelo menos um excipiente farmacêutico do grupo dos sais de tampão, agentes conservantes, excipientes para ajuste da osmolaridade desejada, excipientes para ajuste da viscosidade desejada, estabilizantes, amaciantes, materiais de revestimento, agentes de fluxo, aglutinantes, lubrificantes, cargas, dessecantes, agentes desintegrantes, solventes, solubilizantes e excipientes para aumento da tolerância da formulação, pode ser contido no implante.

Além dos polímeros contendo grupo tiol inventivos e os excipientes possivelmente misturados requeridos ou de vantagem para formulações particulares, o medicamento, ou implante, respectivamente, pode compreen-

der, além disso, substâncias ativas. Substâncias ativas, que de preferência são misturadas ao polímero contendo grupo tiol, podem elas próprias possuir propriedades antioxidantes ou podem servir para curar, aliviar ou prevenir a doença antioxidante ou a doença causada por estresse oxidativo, respectivamente. Substâncias anti-inflamatórias e vitaminas possuindo atividade antioxidante serão mencionadas a título de exemplo neste contexto.

De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, o implante adicionalmente compreende pelo menos um polímero não modificado. Em implantes que compreendem tanto polímeros contendo grupo tiol quanto também polímeros não modificados, sua relação de mistura relativa um ao outro é variável. De acordo com a invenção, sob "polímeros não modificados", polímeros são sumariados, os quais são totalmente não modificados, ou que são modificados, no entanto não possuem qualquer grupo tiol, respectivamente.

De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, o implante compreende o polímero contendo grupo tiol em uma concentração de 0,001 a 100% em peso, de preferência de 0,01 a 90% em peso, até mais preferida de 0,05 a 80 % em peso; em que o administração ocorre mais preferivelmente em uma concentração de 0,1 a 20%, ou até mais preferivelmente de 0,1 a 10%.

O implante de acordo com a invenção pode também totalmente consistir em polímero contendo grupo tiol, ou ele pode ser misturado com excipientes, portadores e substâncias farmaceuticamente ativas.

Devido aos grupos de tiol contidos no polímero da invenção, o polímero possui propriedades antioxidantes.

De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, o tecido a ser aumentado é selecionado do grupo consistindo em tecido dérmico, tecido muscular e tecido conjuntivo.

Um aspecto adicional da presente invenção refere-se a um implante para aumento de tecido compreendendo, pelo menos, um polímero contendo grupo tiol tal como definido acima.

Ainda, um aspecto adicional da presente invenção refere-se a

um método para o tratamento cosmético de pele, e para redução e/ou prevenção do envelhecimento de pele, no qual um polímero contendo grupo tiol tal como definido acima é aplicado subcutaneamente e/ou intradermicamente.

Polímeros contendo grupo tiol podem ser usados para o tratamento cosmético da pele e para redução de envelhecimento da pele. Polímeros, tais como, por exemplo, ácido hialurônico, são agentes auxiliares bem conhecidos e frequentemente usados em produtos cosméticos, por exemplo, para injeção debaixo de rugas e nos lábios. Para este propósito, na maioria das vezes um gel viscoso de moléculas de cadeia longa é usado, o qual é muito lentamente degradado pelo corpo. Em um processo adicional, os polímeros são fragmentados com luz UV, massageados na pele, e subsequentemente tratados por laser, por meio do que os fragmentos de polímero massageados novamente reagem a macromoléculas na pele. Tais polímeros são usados como uma alternativa a colágeno.

O uso cosmético de polímeros, particularmente de ácido hialurônico, pode resultar em efeitos colaterais parcialmente pronunciados, tais como, por exemplo, erupção da pele e avermelhamento com base no estresse oxidativo. Foi atualmente constatado que quando administrando polímeros contendo grupo tiol, tais efeitos colaterais podem ser totalmente prevenidos, ou largamente reduzidos, respectivamente.

A invenção será explicada em mais detalhe a título dos seguintes exemplos e figuras aos quais, certamente, ela não está restrita.

A Figura 1 mostra uma representação esquemática do mecanismo de ativo antioxidante dos polímeros contendo grupo tiol.

A Figura 2 mostra a inibição do efeito oxidante de radicais de hidroxila por soluções aquosas a 0,1% (m/v) de ácido hialurônico tiolado em comparação com os polímeros não modificados (n>3; ± SD).

A Figura 3 mostra a inibição do efeito oxidante de radicais de hidroxila por soluções aquosas a 0,1% (m/v) de ácido hialurônico tiolado, modificado a vários graus (200 µM de grupos de tiol/g de polímero e 70 µM de grupos de tiol/g de polímero) em comparação com ácido hialurônico não

modificado (n>4; ± SD).

A Figura 4 mostra a inibição da oxidação de lipídeo em córnea de porcino *in vitro* por soluções aquosas a 0,1% (m/v) de ácido hialurônico tiolado em comparação com polímeros não modificados (n>3; ± SD).

Exemplos:

Exemplo 1: Inibição do efeito oxidante de radicais de hidroxila por polímeros contendo grupo tiol inventivo

As propriedades de eliminação de radical de hidroxila dos polímeros contendo grupo tiol inventivos foram avaliadas com o teste de desoxirribose (Halliwell e outro, Food Chem. Toxicol. 33 (1995): 601-617). Neste sistema de teste, radicais de hidroxila são gerados por íons de ferro que atacam desoxirribose. Os produtos de degradação resultantes reagem com ácido tiobarbitúrico até um agente de coloração rosada cuja absorção é medida. Com este método, tanto as propriedades de eliminação de radical quanto também as de complexação dos polímeros contendo grupo tiol inventivos são testadas.

As propriedades de eliminação de radical de hidroxila e complexação dos polímeros contendo grupo tiol inventivos foram também avaliadas com o teste de desoxirribose em dependência de sua concentração e seu grau de modificação. É importante que os polímeros contendo grupo tiol inventivos ainda revele sua atividade antioxidante até em concentrações baixas porque, deste modo, - em combinação com o tempo de permanência estendido destes polímeros contendo grupo tiol - um efeito de longa duração pode ser alcançado. Além do mais, em preparações para aplicações oculares, intra-articulares, intradérmicas ou subcutâneas, compostos poliméricos moleculares elevados podem ser usados apenas em concentrações iniciais relativamente baixas, uma vez que de outra forma, devido a sua alta viscosidade, uma tolerância ideal não é mais garantida.

Para este teste, soluções de polímero foram recentemente preparadas por dissolução do polímero em tampão de fosfato, pH 7,4, a fim de que a concentração final do polímero na solução de amostra integral fosse 0,1% (m/v). Se necessário, o pH da solução de amostra foi ajustado a 7,4

pela adição de NaOH.

Tampão de fosfato, pH 7,4 sem polímero servido como o controle. A 0,6 ml da solução de amostra, a princípio 0,1 ml de uma solução de 2-desóxi-D-ribose a 10 mM foi adicionado.

Imediatamente depois da adição de 0,1 ml de uma solução de $FeSO_4$ a 10 mM recentemente preparada, as amostras foram incubadas durante 120 min em 37°C. A reação foi parada pela adição de 0,5 ml de ácido trifluoroacético a 2,5% (v/v). Depois da adição de 0,2 ml de ácido tiobarbitúrico a 1% (m/v), as amostras foram incubadas durante 20 min em 95°C para desenvolvimento de cor. Em seguida as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas durante 5 min. Uma alíquota da solução de amostra foi transferida em cubetas microfotométricas, e a absorção foi medida em 532 nm.

As propriedades antioxidantes do polímero inventivo foram calculadas na forma da inibição da oxidação de desoxirribose:
Inibição de oxidação em % = $(1 - (A_s/A_c)) * 100$, em que A_s é a absorção da amostra, e A_c é a absorção do controle.

Os resultados são ilustrados nas Figuras 2 e 3. No eixo y, em cada caso a inibição do efeito de oxidação (em %) de radicais de hidroxila pelos polímeros é ilustrada. Os valores ilustrados são os valores médios de pelo menos 3 repetições de teste ± desvio padrão. Na Figura 2 é mostrado que pela ligação covalente de compostos de tiol, o efeito antioxidante de ácido hialurônico poderia ser significantemente aumentado. A dependência do efeito antioxidante dos polímeros de acordo com a invenção no grau de modificação com compostos de tiol é ilustrada na Figura 3 a título do exemplo de ácido hialurônico tiolado. Ácido hialurônico tiolado possuindo um grau de modificação de 200 µM de grupos de tiol/g de polímero desta forma possui um efeito antioxidante maior do que ácido hialurônico tiolado possuindo um grau de modificação de 70 µM de grupos tiol/g de polímero.

Exemplo 2: Inibição da peroxidação de lipídeo na pele por polímeros contendo grupo tiol :

Com um teste *in vitro*, o potencial dos polímeros contendo grupo

tiol para inibir a oxidação de lipídeos da derme foi avaliado. Peroxidação de lipídeos intracelulares causados por exemplo por radiação de UV resulta em danos da pele/derme humana.

Com este método, tanto as propriedades de eliminação de radical quanto as de complexação dos polímeros contendo grupo tiol são testadas (Halliwell e outro, Food Chem. Toxicol. 33 (1995): 601-617). Neste sistema de teste *in vitro*, a peroxidação de lipídeo é acelerada pela adição de íons de ferro e aquecimento. Os fragmentos de lipídeo oxidados (TBARS; substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico) reagem com ácido tiobarbitúrico até um agente de coloração rosada cuja absorção é medida.

Soluções de polímero são recentemente preparadas em tampão de fosfato isotônico a fim de que a concentração final do polímero na solução de amostra integral fosse 0,05% (m/v). O pH das soluções de amostra foi ajustado a 7,4 pela adição de NaOH. Tampão de fosfato isotônico, pH 7,4 servido como o controle. A estas amostras, 100 mg de derme de porcino foram adicionados. Depois da adição de 0,3 ml de uma solução de $FeSO_4$ a 20 mM recentemente preparada, as amostras foram incubadas em 95^0C durante 60 min. A reação foi parada pela adição de 0,3 ml de ácido trifluoroacético a 20% (v/v). Depois da adição de 0,3 ml de ácido tiobarbitúrico a 1% (m/v), as amostras foram incubadas durante outros 20 min em 95°C e, depois do resfriamento à temperatura ambiente, centrifugadas. Uma alíquota foi transferida a cubetas microfotométricas, e a absorção foi medida em 532 nm.

A inibição da peroxidação de lipídeo foi calculada de acordo com a seguinte equação: inibição de oxidação em % = $(1 - (A_s/A_c)) * 100$, em que A_S é a adsorção da amostra, e A_c é a absorção do controle.

Os resultados são ilustrados na Figura 4. No eixo y, a inibição de oxidação dos respectivos polímeros é plotada em %. Os valores mostrados são os valores médios de 3 repetições de teste + desvio padrão. Destes estudos é claramente aparente que, por causa de suas propriedades de eliminação de radical, complexação e, desta forma, antioxidantes, os polímeros contendo grupo tiol são capazes de significantemente redução da oxidação

de lipídeos causada por processos inflamatórios.

Exemplo 3: Aplicação intradérmica dos polímeros contendo grupo tiol de acordo com a presente invenção:

A seguinte preparação para aplicações intradérmicas foi produzida: 2 g de ácido hialurônico contendo grupo tiol foram dissolvidos em tampão de fosfato de isotona estéril, agitados para formar um polímero parcialmente reticulado, carregados em seringas e esterilizados. 0,1 ml desta formulação foi injetado intradermicamente na região dorsal de coelhos. A aplicação produziu uma irritação local mínima que desapareceu depois de um dia. O depósito formado pelo ácido hialurônico contendo grupo tiol foi, de modo palpável, detectável durante o período de exame total de duas semanas.

Exemplo 4 : Produção de uma preparação para o uso subcutâneo e intradérmico para aumento dérmico:

Uma preparação para o uso subcutâneo e intradérmico foi manufaturado como segue: 1 g de ácido hialurônico contendo grupo tiol estéril foi dissolvido sob condições assépticas e na ausência de oxigênio em um tampão de fosfato estéril de 100 ml pH 7,4. A osmolaridade desta preparação foi ajustada pela adição de NaCl para produzir uma osmolaridade da solução entre 200 e 400 mosmols/kg. A solução foi carregada em frascos e acondicionada em gás impermeável.

Exemplo 5: Formulação para aumento de tecido de cicatriz:

Uma preparação foi produzida como segue: 3 g de ácido hialurônico contendo grupo tiol estéril foram dissolvidos sob condições assépticas em 100 ml de tampão de fosfato estéril, pH 7,4, e parcialmente reticulados. Posteriormente, a osmolaridade para adição sugerida de NaCl para produzir uma osmolaridade da solução é entre 200 e 400 mosmols/kg. A solução foi carregada em frascos e fechada em gás impermeável.

Exemplo 6: Formulação para aumento dos músculos esfíncter anal e uretral:

Os polímeros contendo grupo tiol foram usados para aumentar o esfíncter anal interno a fim de prevenir incontinência anal por sustentação de acolchoamento de ocorrência natural no canal anal. A mesma formulação foi

usada também para aumentar os músculos de esfíncter uretral (veja também US 5.785.642). Incontinência é um problema de ocorrência frequente, em particular para mulheres, cujo pavimento pélvico é significantemente enfraquecido depois da gravidez. Se os músculos do pavimento pélvico não podem ser forçados por métodos convencionais, a injeção de materiais para aumento da uretra é uma boa alternativa.

Uma formulação para o aumento do esfíncter foi produzido como segue: 5 g de quitosana contendo grupo tiol estéril foram dissolvidos sob condições assépticas em 100 ml de tampão de borato estéril, pH 6,5, e parcialmente reticulados, a osmolaridade foi ajustada por adição de NaCl a 200 até 400 mosmol/kg. A solução foi carregada em seringas.

Exemplo 7: Degradação enzimática de uma formulação de ácido hialurônico reticulado contendo grupo tiol de fase única e uma partícula de ácido hialurônico reticulado compreendendo formulação:

Também vantajoso dos polímeros contendo grupo tiol, em particular de ácido hialurônico contendo grupo tiol, é mostrado neste exemplo. Ácido hialurônico contendo grupo tiol e formulações comercialmente disponíveis compreendendo partículas de ácido hialurônico reticulado foram digeridos com hialuronidase. Em ambos os casos, o ácido hialurônico foi degradado, por meio do que a degradação foi comparável com um ácido hialurônico não modificado no caso de ácido hialurônico contendo grupo tiol e os fragmentos formados mostram um peso molecular muito mais elevado como as partículas compreendendo ácido hialurônico reticulado. Isto resulta do fato que as pontes de dissulfeto não são degradadas por uma enzima, e em segundo lugar, o grau de reticulação é muito maior do que em partículas de ácido hialurônico reticulado. Por esse motivo, os ácidos hialurônicos contendo grupo tiol reticulado de acordo com a presente invenção ficam mais longos no lado de aplicação do que partículas de ácido hialurônico reticulado.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um polímero contendo grupo tiol, caracterizado pelo fato de que é no preparo de um implante para aumento de tecido, sendo que o polímero de base é um polissacarídeo.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polímero contendo grupo tiol apresenta uma massa molecular de pelo menos 10.000 g/mol, de preferência, pelo menos 25.000 g/mol, em particular, pelo menos 50.000 g/mol.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que os grupos de tiol dentro do polímero formam ligações de dissulfeto inter e/ou intramolecular.

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a porção de grupo tiol do polímero é superior a 20 µmol/g de polímero, de preferência, superior a 50 µmol/g de polímero, em particular, superior a 100 µmol/g de polímero.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o polímero contendo grupo tiol é selecionado a partir do grupo consistindo em ácido hialurônico contendo grupo tiol, quitosana contendo grupo tiol e combinações destes polímeros.

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o grupo tiol do polímero inventivo de preferência é derivado de cisteína, cisteamina ou N-acetilcisteína.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o implante é fornecido como uma preparação em gel ou aquosa, de preferência, preparação em fase única.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o implante adicionalmente compreende quitosana e/ou ácido hialurônico.

9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o implante compreende ainda pelo menos uma substância ativa, de preferência, do grupo dos agentes antiflogísticos, agentes antirreumáticos, analgésicos, agentes anti-infecciosos, agentes an-

tivirais, antibióticos, antimicóticos, agentes antissépticos, agentes quimioterapêuticos, espasmolíticos, vitaminas, agentes citostáticos, anestésicos locais, agentes antialérgicos, anti-histaminas, agentes anti-inflamatórios, agentes antivaricósicos, agentes para tratamento de hemorróidas, agentes terapêuticos para tratamento da pele, agentes ginecológicos, agentes oftálmicos, agentes urológicos, agentes rinológicos e agentes otológicos, e/ou pelo menos um excipiente farmacêutico, de preferência do grupo de sais de tampão, agentes conservantes, excipientes para ajuste da osmolaridade desejada, excipientes para ajuste da viscosidade desejada, estabilizantes, amaciantes, materiais de revestimento, agentes de fluxo, aglutinantes, lubrificantes, cargas, dessecantes, agentes desintegrantes, solventes, solubilizantes e excipientes para realce da compatibilidade da formulação.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o implante compreende o polímero contendo grupo tiol em uma concentração de 0,001 a 100% em peso, de preferência, de 0,01 a 90% em peso, preferivelmente, de 0,05 a 80% em peso.

11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o tecido a ser aumentado é selecionado partir do grupo consistindo em tecido dérmico, tecido muscular e tecido conjuntivo.

12. Implante, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um polímero contendo grupo tiol, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 e 9.

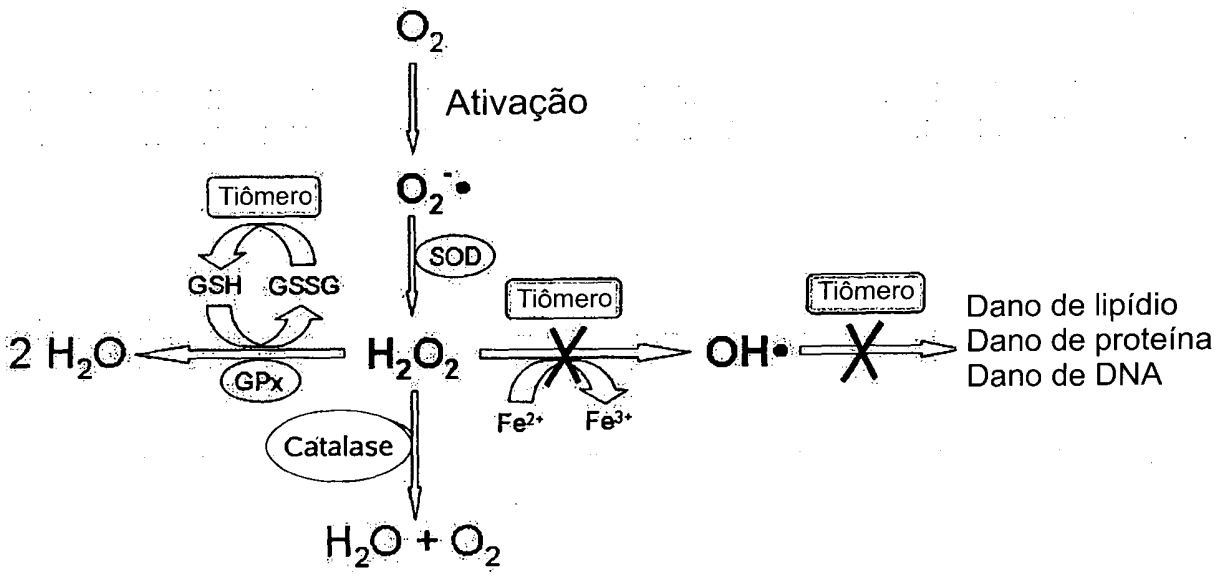
O_2
Ativação
$O_2^{-\bullet}$
Tiômero
GSH GSSG
SOD
Tiômero
Tiômero
2 H_2O
GPx
H_2O_2
OH•
Fe^{2+}
Fe^{3+}
Catalase
$H_2O + O_2$
Dano de lipídio
Dano de proteína
Dano de DNA

Fig. 1

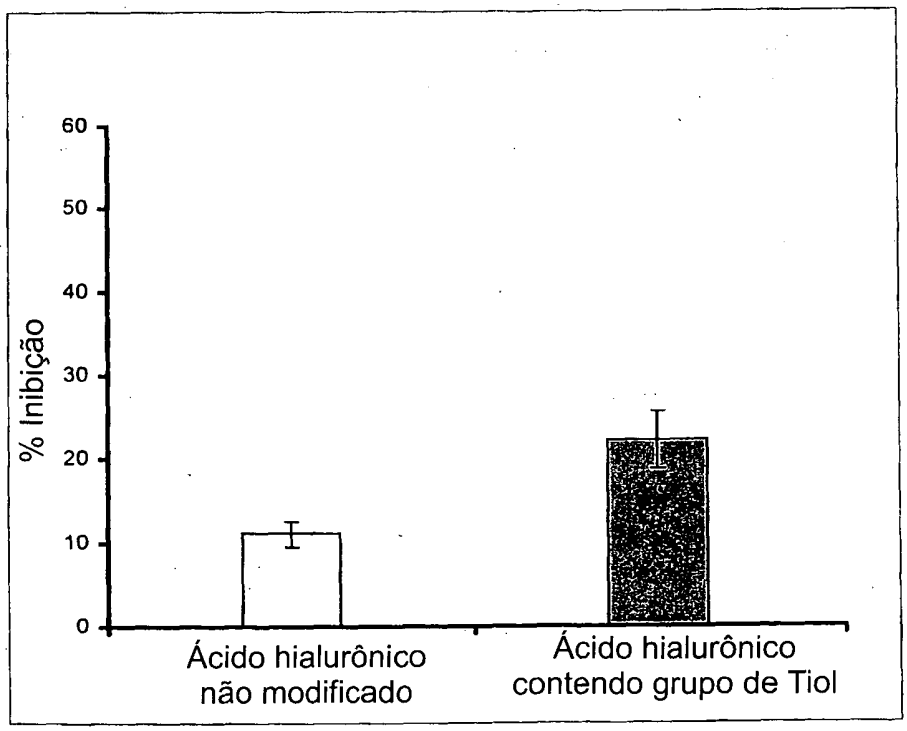
% Inibição
60
50
40
30
20
10
0
Ácido hialurônico não modificado
Ácido hialurônico contendo grupo de Tiol

Fig. 2

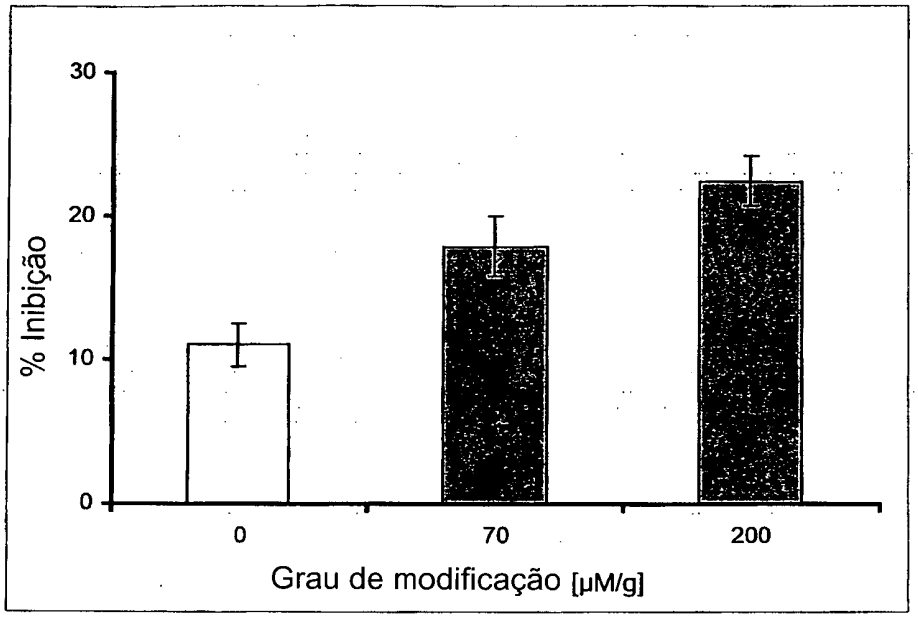
30
20
10
0
% Inibição
0
70
200
Grau de modificação [µM/g]

Fig. 3

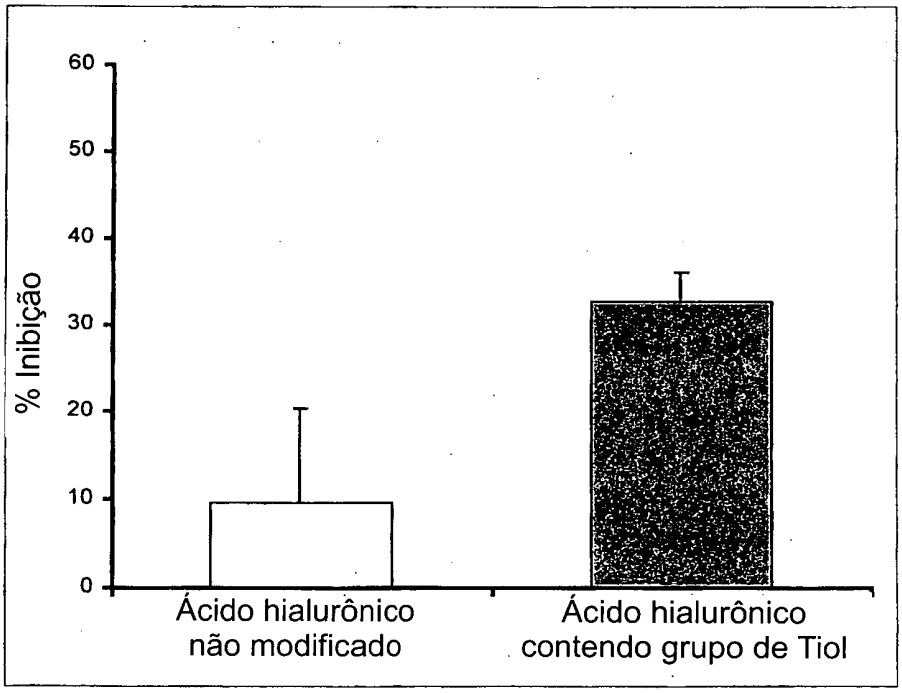
60
50
40
30
20
10
0
% Inibição
Ácido hialurônico
não modificado
Ácido hialurônico
contendo grupo de Tiol

Fig. 4