

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 985 960**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2020 PCT/EP2020/087140**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021 WO21123247**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2020 E 20838962 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 4077402**

(54) Título: **Hialuronano modificado con tiol e hidrogel que comprende el hialuronano reticulado**

(30) Prioridad:

19.12.2019 EP 19218338

(73) Titular/es:

**CROMA-PHARMA GMBH (100.0%)
Industriezeile 6
2100 Leobendorf, AT**

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

07.11.2024

(72) Inventor/es:

HOLLAUS, RALPH

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 985 960 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hialuronano modificado con tiol e hidrogel que comprende el hialuronano reticulado

- 5 La presente invención se refiere a un hialuronano modificado con tiol, una composición de hidrogel estéril, que comprende un polímero reticulado, en el que el polímero reticulado es un producto de oxidación del hialuronano modificado con tiol, así como a sus usos y a un método para producir el mismo.

Estado de la técnica

10 El hialuronano, abreviado HA, también denominado ácido hialurónico y sus sales, por ejemplo, hialuronato de sodio, es un glucosaminoglicano aniónico no sulfatado de origen natural con disacáridos repetidos compuestos por ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina.

15 El hialuronano de alto peso molecular está presente de forma natural en la piel y es conocido por sus propiedades viscoelásticas y también por su muy alta propensión a absorber agua. Sus propiedades contribuyen en gran medida a la elasticidad de la piel. Dadas sus propiedades y sus cualidades de biocompatibilidad, tolerancia y falta de toxicidad, este compuesto se ha aprovechado durante más de 10 años en muchas aplicaciones en los campos de la medicina y la cosmética, en particular en los procedimientos estéticos. Por ejemplo, el hialuronano se usa para rellenar las arrugas mediante inyección directa en la dermis de la zona considerada (se usa como relleno dérmico).

20
25 El HA no modificado altamente purificado de origen biofermentativo es perfectamente biocompatible e idéntico al hialuronano endógeno. Sin embargo, a pesar de tener la ventaja de ser altamente compatible con los tejidos del cuerpo humano, tener una elevada afinidad por el agua y realizar una fuerte función hidratante, el HA no tiene propiedades biomecánicas adecuadas. Cuando se inyecta HA en los tejidos de la piel, se produce una rápida degradación *in vivo* tanto por las hialuronidasas (degradación enzimática) como por los radicales libres (degradación química) presentes en los tejidos del cuerpo humano.

30 Se han propuesto numerosas soluciones para ralentizar la degradación *in vivo* del HA y modificar sus propiedades químicas, físicas y biológicas, proporcionando además una mayor resistencia de las formulaciones a la degradación durante el almacenamiento, al calor y, por lo tanto, a la esterilización.

35 Estos enfoques normalmente implican la modificación química del HA, incluida, por ejemplo, la reticulación del HA por medios químicos, enzimáticos o fotoquímicos. Estos geles de hialuronano reticulados se pueden obtener mediante diversos procesos de preparación. En general, estos procesos requieren dos etapas principales, consistiendo la primera en hidratar el hialuronano para convertirlo en una solución acuosa y la segunda tiene como objetivo reticular las moléculas de HA de dicha solución acuosa en presencia de un agente capaz de inducir la reticulación de la misma (también denominado "agente de reticulación"). Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen formaldehído, divinil sulfona, biscarbodiimidas y epóxidos.

40 Para la producción de rellenos dérmicos, el agente reticulante se elige más comúnmente entre epóxidos, tales como el éter diglicidílico de 1,4-butanodiol (BDDE) o el 1,2,7,8-diepoxioctano (DEO), aldehídos o polivinilsulfonas, tales como la divinilsulfona (DVS), y por lo tanto es de naturaleza sintética.

45 Desafortunadamente, las modificaciones químicas provocan efectos secundarios y reacciones de cuerpos extraños que no se observan con el HA sin modificar, que tiene una inmunogenicidad naturalmente baja y no tiene toxicidad. En la mayoría de los rellenos de tejidos blandos con HA comercializados, se usa el BDDE como agente de reticulación. Debido a la naturaleza reactiva de los grupos epóxido presentes en el BDDE, el BDDE que no ha reaccionado que permanece en el relleno dérmico puede tener efectos genotóxicos. Por tanto, el BDDE en rellenos dérmicos, ha de mantenerse en cantidades traza (< 2 partes por millón) de tal manera que son necesarios caros procedimientos de ensayo y purificación adicionales durante la producción. Si bien el perfil de seguridad de los rellenos reticulados con BDDE está respaldado por una experiencia clínica a largo plazo (De Boulle, Glogau y col., 2013, A review of the metabolism of 1,4-butanodiol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers, Dermatol Surg (39): 1758-1766), el BDDE aún puede plantear algunos problemas de seguridad (Choi, Yoo y col., 2015, Modulation of biomechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking agents, J Biomed Mater Res Part A (103A): 3072-3080).

60 Debido a los riesgos genotóxicos asociados con el BDDE, la dosis anual de productos de relleno dérmico tales como Juvederm®, que se pueden aplicar durante toda la vida de un paciente, se limita a 20 ml por año. La administración del producto de relleno dérmico Restylane® disponible en el mercado se limita a un volumen de 6 ml por aplicación. Se aplican limitaciones similares a los rellenos dérmicos que comprenden hialuronano reticulado con DVS.

65 Otro problema con las modificaciones químicas es la necesidad de condiciones de reacción severas, tales como valores de pH alcalinos y altas temperaturas (por encima de 50 °C) a las que debe someterse el hialuronano durante la reacción de reticulación para lograr el grado deseado de reticulación. Se sabe que el peso molecular del HA disminuye debido a la degradación hidrolítica durante la exposición a un pH ácido (pH inferior a 4) o alcalino (pH

superior a 10). Además, el hialuronano se degrada a temperaturas superiores a los 40 °C (Troncoso y col., 2016, A kinetic study of the degradation of hyaluronic acid at high concentration of sodium hydroxide, tesis de grado, consultada en línea a través de <http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:954372/FULLTEXT01.pdf>; Stem y col., 2007. The many ways to cleave hyaluronan, Biotechnology Advances (25): 537-557; Tokita y Okamoto, 1996, Degradation of hyaluronic acid - kinetic study and thermodynamics, Eur. Polym. J. (32): 1011-1014). Se sabe además que los fragmentos de hialuronano de bajo peso molecular con un peso molecular inferior a aproximadamente 200 kDa tienen efectos proinflamatorios (Naor, 2016, Editorial: Interaction Between Hyaluronic Acid and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulates the Activity of Inflammation and Cancer, Frontiers in immunology 7:39; Monslow y col., 2015, Hyaluronan-a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment, Frontiers in immunology 6:231).

Los hidrogeles de hialuronano reticulados con disulfuro fueron descritos por primera vez por Shu y col. (Biomacromolecules 3, 1304-1311, 2002).

Se puede obtener el derivado reticulado con disulfuro de un hialuronano modificado con tiol (HA-SH) mediante un mecanismo de autorreticulación. Tras la formación de enlaces disulfuro entre los grupos tiol (HA-S-S-HA), se establece una red de polímeros de hialuronano reticulados. El grupo tiol que forma un enlace disulfuro puede conectar los grupos colgantes de una molécula principal de HA común o una molécula de HA vecina, es decir, la reticulación puede ser intramolecular o intermolecular, respectivamente. La formación de enlaces disulfuro a partir de grupos tiol libres es una reacción de oxidación que puede producirse de forma espontánea, por ejemplo, debido al oxígeno omnipresente, o tras la adición de un agente de oxidación.

El documento WO 2004/037164 estudió además el hialuronano modificado con 3,3'-ditiobis (dihidrazida propanoica) (DTP) o 4,4'-ditiobis (dihidrazida butírica) (DTB). Se evaluaron los geles obtenidos mediante la formación de disulfuros y el uso de agentes reactivos con tiol, tales como los ácidos di(met)acrílicos de polietilenglicol para la reticulación, para determinar su potencial en la ingeniería tisular, es decir, como andamiaje para el crecimiento y el cultivo de células para su implantación. En el documento WO 2005/056608 se emplearon las mismas técnicas para reticular un carboximetil hialuronano modificado con hidrazida tiolada a fin de obtener armazones celulares macromoleculares. Serban y col. describen la síntesis de un derivado de 2-tioetil éter hialuronano (Biomaterials 29, 1388-1399; 2008), que sin embargo no era adecuado para la reticulación por parte de los agentes de reticulación investigados. El documento EP 2 103 631 describe macromoléculas modificadas con tiol, incluido el ácido hialurónico, en donde se introduce un grupo tiol mediante un método de acoplamiento de hidrazida, y sus productos reticulados. Los productos reticulados se obtienen tanto con un agente de reticulación como mediante la formación de disulfuro.

La síntesis de ácido hialurónico tiolado también se describió en Kafedjiiski y col. (Int J Pharm 343, 48-58; 2007), así como su posible uso en la administración de fármacos, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. El documento CN101367884A describe la síntesis de conjugados de HA-cisteamina que comprenden tanto grupos tiol libres como grupos disulfuro. El documento EP 2 614 828 describe derivados poliméricos biocompatibles modificados con tiol con un bajo grado de modificación y materiales reticulados de los mismos. El documento WO 2008/077172 describe el ácido hialurónico tiolado para el aumento de tejido. En un ejemplo, el documento WO 2008/077172 describe una aplicación intradérmica de una formulación de hidrogel estéril con 2 g de ácido hialurónico que contiene el grupo tiol (hialuronano modificado con tiol), en donde un depósito formado por el grupo tiol que contiene ácido hialurónico podría detectarse tácticamente durante dos semanas; sin embargo, el documento no menciona las características específicas del hialuronano modificado con tiol usado en este ejemplo.

Los inventores de la presente invención estudiaron además el potencial de los hidrogeles de hialuronano modificados con tiol autorreticulados como rellenos de tejidos blandos. Para los rellenos de tejidos blandos, se desea que el hidrogel implantado permanezca en el sitio del implante durante un período de tiempo prolongado y, por lo tanto, logre un efecto sostenible debido a la lenta degradación.

Sin embargo, los estudios iniciales *in vivo* con composiciones de hidrogel basadas en hialuronano modificado con tiol autorreticulado mostraron un comportamiento de degradación más rápido tras el implante en comparación con los rellenos dérmicos con un agente reticulante externo. Además, con respecto a la optimización del tiempo de residencia para aplicaciones específicas, es deseable tener acceso a hidrogeles con diferentes propiedades reológicas. Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un hialuronano modificado con tiol (HA-SH) para una composición que comprende un polímero reticulado con disulfuro, que permita optimizar las propiedades de la composición, especialmente en lo que respecta a la aplicación como relleno de tejidos blandos.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un hialuronano modificado con tiol, en donde el hialuronano modificado con tiol comprende una pluralidad de grupos de modificación con un grupo tiol en las cadenas laterales del hialuronano y en donde el grupo de modificación comprende un residuo de aminoácido con una cadena lateral básica y un aminotiol terminal conjugado de origen natural, preferiblemente el aminotiol se selecciona del grupo que consiste en cisteamina, cisteína, homocisteína y ésteres de cisteína u homocisteína.

- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de hidrogel estéril que comprende un polímero reticulado, en donde el polímero reticulado es un producto de oxidación del hialuronano modificado con tiol según la invención. La composición de hidrogel estéril según la presente invención es un hidrogel basado en un hialuronano modificado con grupos tiol (HA-SH), en donde el hialuronano está reticulado mediante enlaces disulfuro entre los grupos tiol del hialuronano modificado (producto de oxidación de un hialuronano modificado con tiol). El producto de oxidación es un copolímero que consiste en secciones de hialuronano no modificado y de hialuronano modificado, estando este último conectado mediante enlaces disulfuro.
- El grupo de modificación del hialuronano modificado con tiol comprende o consiste en un residuo derivado de un aminoácido con cadena lateral básica, preferiblemente un aminoácido proteinogénico, y un aminotiol de origen natural, que se conjuga en una posición terminal de manera que el grupo tiol permanece libre. Por lo tanto, el hialuronano modificado con tiol y la composición pueden estar compuestos ventajosamente por componentes altamente biocompatibles y no tóxicos, por ejemplo, el hialuronano modificado con tiol HA-LYSC, en donde el grupo de modificación consiste en lisina y cisteamina.
- El hidrogel está libre de cualquier agente reticulante bifuncional externo adicional, tal como la divinil sulfona. Con la pluralidad de grupos de modificación que tienen un grupo tiol libre, el hialuronano modificado con tiol puede reticularse mediante oxidación y se demostró que el hialuronano modificado con tiol según la invención permite preparar composiciones de hidrogel que comprenden el hialuronano modificado con tiol reticulado con disulfuro (ejemplos 7 a 10). Se demostró que las composiciones según la invención tienen un buen rendimiento *in vivo* en términos de tiempo de residencia en tejidos blandos y biocompatibilidad (ejemplos 12 y 13).
- Un aminoácido con una cadena lateral básica es una base débil y su cadena lateral puede estar cargada positivamente. Por consiguiente, el nuevo hialuronano modificado con tiol (HA-SH) comprende una cadena lateral básica y, por lo tanto, una característica ionizable positivamente además de un grupo tiol distal. Los inventores descubrieron que el hialuronano modificado con tiol según la invención, así como las composiciones de hidrogel que comprenden el hialuronano modificado con tiol reticulado con disulfuro, tienen varias propiedades reológicas sorprendentes.
- Por ejemplo, los inventores descubrieron que las soluciones de hialuronano modificado con tiol que comprenden un grupo de modificación de lisina cargado positivamente muestran una viscosidad significativamente menor en comparación con las soluciones preparadas con hialuronanos modificados con tiol que comprenden grupos de modificación neutros o cargados negativamente en sus cadenas laterales (véase el ejemplo 14, tabla 7). Sin pretender imponer ninguna teoría, se supone que el efecto reológico observado es causado por una distorsión de la rígida red de enlaces de hidrógeno del hialuronano a través de los residuos de lisina cargados positivamente. Una viscosidad más baja de las soluciones acuosas de hialuronano modificado con tiol que comprenden un grupo de modificación de lisina cargado positivamente proporciona a su vez la posibilidad de acceder a soluciones más concentradas, lo que da como resultado hidrogeles reticulados con un módulo de elasticidad más natural y más bajo y una fuerza de extrusión aceptable.
- Al comparar el tiempo de residencia *in vivo* de los hidrogeles basados en hialuronano modificado con tiol reticulado con un grado similar de modificación, se encontró una disminución más lenta del volumen medio de depósito relativo para los hidrogeles que comprendían hialuronano modificado con tiol reticulado en concentraciones más altas (ejemplo 12, tabla 6). Sin embargo, debido al módulo elástico excepcionalmente alto de las composiciones que comprenden hialuronanos modificados con tiol convencionales, que supera los 1000 mPa, existen límites para aumentar aún más la concentración con el fin de aumentar el tiempo de residencia de los implantes. Por consiguiente, para los polímeros de hialuronano modificados con tiol convencionales, el límite máximo de concentración en una composición reticulada parece estar en el intervalo de 20 mg/ml.
- Además de la concentración del hialuronano modificado con tiol, un segundo parámetro crucial que determina el tiempo de residencia de un relleno dérmico puede ser su módulo de elasticidad G' (Guarise y col., 2019, HA-based dermal filler: downstream process comparison, impurity quantitation by validated HPLC-MS analysis, and *in vivo* residence time study, Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials, 173: 1-9). Los rellenos de ácido hialurónico altamente reticulado, que a su vez tienen un módulo de elasticidad anormalmente alto, son más propensos a provocar efectos adversos (Keizers y col., 2018, A high crosslinking grade of hyaluronic acid found in a dermal filler causing adverse effects, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 159: 173-178).
- Cuando se comparan las composiciones de hidrogel estériles que comprenden un polímero de hialuronano-lisil-cisteamina reticulado con las composiciones de hidrogel estériles que comprenden un hialuronano modificado con tiol convencional (hialuronano-cisteamina) en la misma concentración, las composiciones que comprenden el polímero de hialuronano-lisil-cisteamina tenían un módulo de elasticidad G' significativamente menor (véase el ejemplo 11, tabla 5). Sorprendentemente, estas composiciones mostraron una velocidad de degradación *in vivo* que era comparable a la velocidad de degradación observada después de implantar composiciones que comprendían hialuronano modificado con tiol convencional reticulado (véase el ejemplo 12, tabla 6).
- Cuando se usan hialuronanos modificados con tiol con un grupo de modificación que comprende lisina, se pueden producir composiciones que comprenden concentraciones incluso mayores del derivado de hialuronano modificado

con tiol, lo que finalmente permite la aplicación de una mayor cantidad de hialuronano modificado con tiol reticulado por implante para prolongar aún más el tiempo de residencia *in vivo*.

En una realización, el hialuronano modificado con tiol muestra una viscosidad dinámica inferior a 300 mPa*s, en donde la viscosidad dinámica se determina con un sistema de placas cónicas usando, por ejemplo, un reómetro de placas cónicas tal como un reómetro MCR 102 de Anton Paar, a una temperatura de 25 °C y una velocidad de cizallamiento constante de 5/s basada en una solución acuosa, preferiblemente ácida, del hialuronano modificado con tiol en una concentración del 1,2 % por peso. Preferiblemente, la viscosidad dinámica, determinada como se ha definido anteriormente, está por debajo de 250 mPa*s, más preferiblemente por debajo de 200 mPa*s.

En una realización preferida del hialuronano modificado con tiol, el grupo de modificación se une al hialuronano mediante una carboxamida, en donde el grupo acilo de la carboxamida se origina en el grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico en el hialuronano. En otras palabras, el grupo de modificación se conjuga con el grupo carboxilo del hialuronano para formar una carboxamida. Preferiblemente, la carboxamida se forma junto con un grupo amino del aminoácido, que puede ser tanto el grupo amino en posición alfa con respecto a su grupo carboxilo como un grupo amino en la cadena lateral básica del resto de aminoácido.

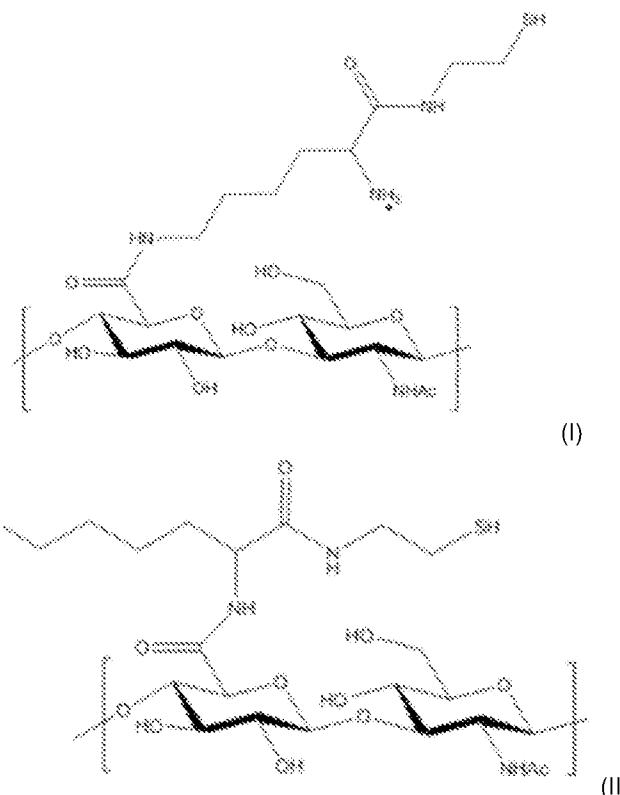
El grupo de modificación comprende un aminotiol de origen natural terminal conjugado, es decir, un resto con un grupo amino y un grupo tiol (libre). En una realización preferida, el aminotiol se selecciona del grupo que consiste en cisteamina, cisteína, homocisteína y ésteres de cisteína u homocisteína.

Se prefiere que el grupo amino del aminotiol se conjugue con el grupo carboxilo del aminoácido para formar una carboxamida.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los componentes del grupo de modificación están unidos con enlaces amida y el grupo de modificación está unido al hialuronano mediante un enlace amida. Se prefieren los enlaces amida debido a su naturaleza estable y, sin embargo, biocompatible.

El residuo de aminoácido con cadena lateral básica se deriva preferiblemente de un aminoácido alfa, por ejemplo, un aminoácido proteinogénico, tal como lisina, arginina o histidina, lo más preferiblemente, se deriva de lisina.

Por ejemplo, el grupo de modificación comprende un residuo de aminoácido basado en lisina y la aminotiol cisteamina, en donde el grupo amino de la cisteamina está conjugado con el grupo carboxilo de la lisina. El hialuronano modificado con tiol respectivo con este grupo de modificación en la presente memoria se denomina HA-LYSC. El hialuronano HA-LYSC modificado con tiol tiene una subestructura según la Fórmula (I) o la Fórmula (II) o ambas.



En una realización preferida, el hialuronano modificado con tiol tiene una subestructura según la Fórmula (II). Un análisis de la realización de unión de la lisina en ciertos hialuronanos modificados con tiol investigados en la presente memoria indicó que la lisina se une a través de la amina en el alfa-CH (ejemplo 16).

- 5 En otra realización preferida, el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol de más de aproximadamente 80 µmol por gramo de polímero, preferiblemente más de aproximadamente 105 µmol por gramo de polímero, más preferiblemente más de aproximadamente 120 µmol por gramo de polímero, y el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol de menos de aproximadamente 320 µmol por gramo de polímero, preferiblemente menos de aproximadamente 290 µmol por gramo de polímero, más preferiblemente 10 menos de 250 µmol por gramo de polímero.

Los inventores descubrieron además que el grado de modificación del hialuronano con grupos tiol es otra característica importante para influir en el tiempo de residencia *in vivo* del hidrogel estéril.

- 15 El "grado de modificación con grupos tiol" indica la cantidad inicial de grupos tiol (normalmente expresada en µmol) por gramo (g) del hialuronano modificado con tiol y puede abreviarse como DoM. Esta cantidad de grupos tiol es una característica de la materia prima de hialuronano modificado con tiol e indica la cantidad de grupos tiol que están disponibles para la reticulación durante el proceso de producción de la composición. Los grupos o fracciones tiol también pueden denominarse grupos mercapto o sulfhidrilo. Basándose en varios ejemplos con hialuronano-cisteamina, los inventores identificaron un intervalo óptimo para el grado de modificación entre aproximadamente 20 80 µmol por g de polímero y aproximadamente 320 µmol por g de polímero. Por un lado, era necesario un grado de modificación superior a 80 µmol por g de polímero para producir composiciones con un efecto voluminizador de más de 12 semanas tras el implante. Por otro lado, el uso de hialuronano modificado con tiol con mayores grados de modificación no dio como resultado un efecto voluminizador del hidrogel producido, es decir, un aumento en el volumen 25 de depósito (por ejemplo, ≥ 335 µmol por g de polímero, datos no mostrados).

Además del grado de modificación, los parámetros que influyen notablemente en las propiedades reológicas e *in vivo* del hidrogel son la distribución de pesos moleculares de las cadenas de hialuronano, el grado de reticulación y la concentración del hialuronano modificado con tiol reticulado.

- 30 Preferiblemente, el hialuronano modificado con tiol tiene un peso molecular promedio (MMW) de al menos aproximadamente 400 kDa, preferiblemente al menos aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente al menos 35 400 kDa, tal como aproximadamente 600 kDa, tal como aproximadamente 700 kDa.
- 40 Por otro lado, el hialuronano modificado con tiol tiene preferiblemente un peso molecular promedio (MMW) de como máximo aproximadamente 4.500 kDa, en particular como máximo un peso molecular promedio en el intervalo de 4.000 kDa a 4.200 kDa. Se descubrió que los materiales de partida de hialuronano con especificaciones de pesos moleculares aún más altas no están disponibles en la cantidad y calidad necesarias para preparar un hialuronano modificado con tiol adecuado para preparar composiciones de hidrogel estériles a escala industrial y/o como relleno dérmico. Más preferiblemente, el hialuronano modificado con tiol tiene un peso molecular promedio de como máximo 4.500 kDa o como máximo 2.000 kDa. Por ejemplo, el peso molecular promedio del hialuronano modificado con tiol 45 puede estar en el intervalo de aproximadamente 700 kDa a aproximadamente 2.000 kDa.

- 50 Un alto grado de reticulación (mediante la oxidación de los grupos tiol) es beneficioso para obtener composiciones de hidrogel con propiedades elásticas adecuadas para un relleno voluminizador de tejidos blandos. Para proporcionar composiciones de hidrogel con características reproducibles y estables, tales como las propiedades reológicas, la reticulación del hialuronano modificado con tiol (es decir, la formación de enlaces disulfuro) debe completarse en su mayor parte antes de que el hidrogel se siga procesando (es decir, sometiéndolo a etapas de procesamiento adicionales tales como tamizado, homogeneización, llenado en jeringas y esterilización). Sin embargo, es posible que una determinada cantidad pequeña de grupos tiol no esté disponible para la formación de disulfuro debido a factores como el impedimento estérico.

- 55 La composición de hidrogel estéril según la invención tiene un contenido de tiol residual inferior al 20 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol. Esto corresponde a que más del 80 % de los grupos tiol disponibles del hialuronano modificado con tiol se oxidan durante el proceso de producción de hidrogel. La fracción de grupos tiol no reticulados en el polímero reticulado se puede determinar mediante el contenido de tiol residual expresado en µmol por g de polímero. Se pueden obtener velocidades de oxidación altas y uniformes y, por lo tanto, un contenido de tiol residual bajo y reproducible en la composición de hidrogel estéril mediante el uso de un agente de oxidación, por ejemplo peróxido de hidrógeno, durante una etapa de oxidación en el método de producción.

- 60 Dentro de la composición de hidrogel según la invención, se prefiere que el contenido de tiol residual sea inferior al 15 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol.

- 65 Se identificó que las concentraciones preferidas eran de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. Por un lado, el hialuronano modificado con tiol puede estar comprendido en la composición con una concentración de como máximo 50 mg/ml, preferiblemente como máximo 35 mg/ml, más preferiblemente como máximo 25 mg/ml, en

particular como máximo 18 mg/ml. Por otro lado, el hialuronano modificado con tiol puede estar comprendido en la composición con una concentración de al menos 4 mg/ml, más preferiblemente al menos 5 mg/ml, más preferiblemente al menos 7 mg/ml.

- 5 Preferiblemente, la composición de hidrogel comprende el producto de oxidación del hialuronano modificado con tiol en una concentración de aproximadamente 7 mg/ml a aproximadamente 35 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 13 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, por ejemplo, 18 mg/ml o 22 mg/ml.
- 10 La concentración del hialuronano modificado con tiol en mg/ml se da en peso con respecto al volumen de la composición de hidrogel estéril. La concentración se refiere preferiblemente a la concentración de la sal, por ejemplo, la sal sódica del hialuronano modificado con tiol reticulado. Por consiguiente, se proporciona una cantidad equivalente de hialuronano modificado con tiol para la preparación. Las concentraciones más altas no se consideran adecuadas, ya que dan como resultado composiciones de hidrogel con altas viscosidades sin una inyectabilidad aceptable. Sin embargo, debido a la baja viscosidad del hialuronano modificado con tiol según la invención, son posibles concentraciones más altas, de modo que la composición podría comprender hasta 50 mg/ml de hialuronano modificado con tiol. Se descubrió que los hidrogeles que comprendían el hialuronano modificado con tiol en una concentración de hasta 35 mg/ml mostraban una fuerza de extrusión aceptable para la inyección dérmica. Las concentraciones de 4 mg/ml o inferiores no se consideran adecuadas debido al bajo módulo de elasticidad G' observado para tales composiciones de hidrogel, lo que da como resultado una degradación *in vivo* más rápida. Dentro del intervalo de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, por ejemplo, 7 o 18 mg/ml, se observaron buenas propiedades reológicas.
- 15 En otro aspecto, la invención proporciona la composición según la invención para su uso como medicamento, en particular para su uso en el tratamiento y la prevención de afecciones de los tejidos blandos. Además, la invención se refiere al uso cosmético de la composición según la invención. Dichos usos (terapéuticos o cosméticos) pueden referirse al uso de la composición según la invención como relleno de tejidos blandos o para el aumento de tejido. Dichos usos incluyen preferiblemente la aplicación, por ejemplo, mediante inyección o implante, a un ser humano, mientras que la aplicabilidad no se limita a la especie humana.
- 20 En otro aspecto, la invención se refiere a un método, en el que el método comprende introducir la composición según la invención, por ejemplo, mediante inyección desde una jeringa, en un sitio específico de tejido blando. El método se refiere al uso de la composición como relleno de tejidos blandos o para el aumento de tejido con fines terapéuticos y cosméticos.
- 25 En una realización, los usos o métodos según estos aspectos comprenden que la composición de hidrogel se introduzca en un sitio tisular mediante inyección desde una jeringa por vía intradérmica, supraperiosteal o subcutánea en un ser humano.

Descripción detallada de la invención

- 40 El “hialuronano modificado con tiol” (HA-SH) es un derivado de un ácido hialurónico (HA) que contiene un grupo tiol. Según la presente invención, el hialuronano modificado con tiol comprende una pluralidad de grupos de modificación que incluyen un grupo básico unido al hialuronano. Es accesible a través de métodos sintéticos conocidos a partir del hialuronano, que está disponible en diferentes pesos moleculares (o intervalos de pesos moleculares). En la bibliografía científica y de patentes se pueden encontrar numerosos ejemplos de modificación de HA con grupos de modificación que contienen grupos tiol:
- 45 Griesser y col. proporcionan una revisión de los polímeros de ácido hialurónico tiolado (Griesser y col., Polymers 10 (2018) 243). Aeschlimann (documento EP 1 115 433 B1) describe un método de funcionalización del HA que no compromete el peso molecular del HA y que además proporciona moléculas de HA que se toleran bien *in vivo* y son biodegradables. El método se usa para generar HA con diferentes grupos funcionales terminales para la reticulación, tales como los grupos tiol. Estas cadenas laterales se introducen en el HA mediante el acoplamiento mediado por carbodiimida de aminas que contienen grupos tiol primarios (protegidos) o ligandos de diamino o dihidrazida que contienen enlaces disulfuro al grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico usando un intermedio de éster activo.
- 50 Los productos intermedios con enlaces disulfuro se reducen a continuación y los productos intermedios con grupos tiol protegidos se desprotegen eliminando el grupo protector. Otro método es descrito por Bulpitt y col. (documento US 6.884.788) que comprende una reacción directa del grupo carboxilo HA con un enlace disulfuro que contiene carbodiimida, tal como 2,2'-ditíobis (N-etil-(N'-etilcarbodiimida)), seguida de la reducción del enlace disulfuro con un agente reductor. El documento WO 2008/008857 A2 describe métodos de síntesis para hialuronano derivado de 2-tioetil éter. El documento EP 0 587 715 describe cómo sintetizar polisacáridos aniónicos insolubles en agua disolviendo al menos un polisacárido polianiónico (por ejemplo, HA), en una mezcla acuosa; activar el polisacárido polianiónico con un agente activador tal como una diimida, por ejemplo EDC o ETC, o BOP; modificar el polisacárido polianiónico activado con un compuesto modificador tal como hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol; y hacer reaccionar el polisacárido polianiónico activado con un nucleófilo adecuado (tal como un aminotiol) para formar la composición insoluble deseada. Los inventores afirman que una ventaja importante de la activación por BOP del polisacárido polianiónico es que el peso molecular del polisacárido polianiónico no disminuye

tras el acoplamiento con el nucleófilo. El documento EP 1 790 665 B 1 describe un ácido hialurónico modificado soluble en agua, que se produce mediante la introducción de un sustituyente en el grupo carboxi del ácido glucurónico del ácido hialurónico, mediante un enlace amida utilizando un agente de condensación de BOP en un disolvente polar aprotólico. Las diaminas con un enlace disulfuro se encuentran entre los sustituyentes listados. Se describe en Borke y col. la amidación mediada por triazina con DMT-MM para una funcionalización eficiente y controlada del ácido hialurónico con cisteamina, en donde las condiciones de reacción suaves y la degradación mínima de la cadena de polisacáridos se enumeran como ventajas de usar este grupo de agentes de acoplamiento en comparación con otros reactivos de acoplamiento, tal como la sustitución mediada por EDC (Borke y col., Carbohydrate Polymers 116 (2015) 42-50). Liang y col. describen la introducción de grupos tiol en el HA mediante una reacción de amidación de los carboxilatos laterales con cisteamina en presencia de CDMT y NMM, seguida de una reacción reductora con DTT (Liang y col. Carbohydrate Polymers 132 (2015) 472-480). La modificación tiólica del HA con clorhidrato de éster etílico de 1-cisteína mediante el doble sistema catalítico: carbodiimida/N hidroxisuccinimida se describió en Kafedjiiski y col. (Int J Pharm 343, 48-58; 2007). En el documento WO 2004/037164, el hialuronano se modificó con 3,3'-ditriobis(dihidrazida propanoica) (DTP) o 4,4'-ditriobis(dihidrazida butírica) (DTB). Tras la reducción con un agente reductor tal como DTT, se obtuvieron los correspondientes derivados de HA tiolados HA-DTPH y HA-DTBH. El documento EP 2 103 631 también describe la introducción de un ligando portador de un grupo tiol a través de los grupos carboxílicos del HA mediante un método de acoplamiento de hidrazida. Se sintetizaron diferentes polímeros de HA tiolados (HA-DGDTDPH, HA-DPDTPDH, HA-DSCDH).

Durante la preparación del hialuronano modificado con tiol según la invención, el grupo de modificación se introduce mediante un agente de modificación. En una realización preferida, el agente de modificación reacciona con el grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico en el hialuronano, de manera que el grupo de modificación se une al hialuronano mediante un enlace carboxamida. Por consiguiente, el agente de modificación para la síntesis del hialuronano modificado con tiol según la invención comprende preferiblemente al menos un grupo amino capaz de formar el enlace amida con el grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico en el hialuronano y el agente de modificación comprende un grupo tiol.

Preferiblemente, los agentes de modificación son derivados de los aminotíoles, por ejemplo, cisteamina, cisteína, homocisteína o ésteres de cisteína u homocisteína, en los que el extremo N (grupo amino) está acoplado con el grupo carboxilo del aminoácido, por ejemplo, el aminoácido lisina. Estos agentes de modificación se sintetizan preferiblemente mediante amidación de lisina N-protectida con cisteamina, cisteína, homocisteína o ésteres de cisteína u homocisteína, usando reactivos de acoplamiento peptídico de rutina, preferiblemente aquellos que permiten una purificación fácil del producto, por ejemplo, mediante la eliminación de los reactivos y productos secundarios mediante una extracción acuosa al terminar la reacción (véase el ejemplo 15). Alternativamente, la cisteamina, la cisteína, la homocisteína o los ésteres de cisteína u homocisteína se hacen reaccionar con los correspondientes ésteres activos de lisina N-protectida en disolventes orgánicos, tales como ésteres de succinimidilo. En una realización preferida, el hialuronano modificado con tiol es una hialuronano-lisil-cisteamina, en donde el resto de lisina está unido al hialuronano mediante un enlace amida. Por lo tanto, el agente de modificación apropiado puede ser la bis(lisil)-cistamina N-protectida.

La regioselectividad de la reacción de acoplamiento que une el aminoácido con el hialuronano mediante la formación de enlaces amida se puede controlar, por ejemplo, mediante la protección N adecuada del agente de modificación. Se logró un acoplamiento regioselectivo con el hialuronano usando bis(lisil)-cistamina desprotegida (ejemplo 15 A) como se describe en el ejemplo 16. Aparentemente, las condiciones de reacción durante el acoplamiento de la amida, por ejemplo, el control del pH en el sistema acuoso, aseguran la regioselectividad de la reacción. En el ejemplo 15 B, se describe la preparación de diclorhidrato de bis(épsilon-azido-L-lisil)-cistamina, cuyo agente de modificación tiene un grupo protector de azida que enmascara el grupo épsilon-amino, de modo que solo el grupo alfa-amino libre es reactivo en condiciones de amidación. Posteriormente, el grupo amino enmascarado se puede desproteger en paralelo a la reducción con disulfuro mediante la aplicación de cantidades en exceso de agente reductor. Alternativamente, el acoplamiento regioselectivo mediante el grupo épsilon-amino se puede lograr mediante la síntesis de diclorhidrato de bis(alfa-azido-L-lisil)-cistamina, que se puede preparar mediante acilación de la cistamina con la N-épsilon-t-butiloxicarbonil-alfa-azido-L-lisina disponible en el mercado, de forma análoga al protocolo descrito.

Las propiedades del hialuronano modificado con tiol y también de la composición de hidrogel según la invención están críticamente influenciadas por el “grado de modificación” del hialuronano modificado con tiol. Los métodos establecidos para determinar el grado de modificación incluyen el método de Ellman o la medición de la liberación de una tiona cromofórica tras la reacción de la 2,2'-ditiodipiridina con un agente que contiene tiol (véase el ejemplo 1). Los expertos en la materia conocerán también métodos alternativos que dan como resultado valores similares. En este caso, el grado de modificación se da en μmol de grupos tiol por gramo de polímero. Alternativamente, el grado de modificación puede indicarse como porcentaje, en donde la cantidad de unidades repetitivas modificadas se divide por la cantidad total de unidades de repetición HA en el polímero (ácido D-glucurónico y N-acetyl-D-glucosamina). El grado de modificación en μmol de grupos tiol por gramo de polímero se puede convertir en porcentaje teniendo en cuenta el peso molecular de 400 g/mol de la unidad de repetición HA. En esta conversión, normalmente se descuidaría el cambio de peso molecular introducido por la modificación.

El término “estéril”, tal como se usa en la presente memoria, debe entenderse según la técnica que especifica una composición que cumple con los estándares microbiológicos tal como se definen para los productos cosméticos o farmacéuticos, por ejemplo, en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) u otras normas nacionales. Clásicamente, los geles de hialuronano se esterilizan tras introducirse en jeringas. La esterilización térmica mediante calor húmedo con un autoclave es uno de los métodos estándar, que comprende someter los geles de HA a vapor saturado a alta presión a 121 °C durante aproximadamente 15-20 minutos. La esterilización en autoclave durante períodos de tiempo más cortos (por ejemplo, entre aproximadamente 1 minuto y 5 minutos) y a temperaturas más altas (por ejemplo, entre aproximadamente 130 °C y 135 °C) podría conducir a una mejor conservación del peso molecular de las moléculas de HA en los geles (véase M.L. Bernuzzi, A. Giori, “An innovative way to thermally sterilize hyaluronic acid pre-filled syringes”, libro blanco de 2016 disponible en <https://www.fedegari.com/wp-content/uploads/2019/03/WP-Fedegari-Thermal-sterilization-PFS-with-Hyaluronic-Acidv-2.pdf>, US 2016/0220729). La optimización de otros parámetros de esterilización en autoclave (tal como garantizar un enfriamiento rápido del producto) podría ser además ventajosa para preservar el peso molecular del polímero (<http://www.steriflow.com/en/news/Sterilization-hyaluronic-acid>).

El término “hidrogel”, tal como se usa en la presente memoria, debe entenderse como la descripción de una composición que tiene características tanto sólidas como fluidas (líquidas). Por un lado, el hidrogel puede ser inyectable, es decir, muestra un comportamiento similar al de un fluido. Por otro lado, el hidrogel puede ser lo suficientemente rígido (o rígido) como para mantener una determinada forma, por ejemplo, el hidrogel puede proporcionarse en forma de un implante, hilo o filamento preformado. Por lo tanto, el término hidrogel por sí solo no limita las propiedades reológicas de la composición de manera cuantitativa.

La invención también proporciona un método para producir una composición de hidrogel según la invención que comprende las etapas de:

a) proporcionar un hialuronano modificado con tiol, en donde

el hialuronano modificado con tiol comprende una pluralidad de grupos de modificación con un grupo tiol en las cadenas laterales del hialuronano, en donde el grupo de modificación comprende un residuo de aminoácido con una cadena lateral básica y un aminotiol de origen natural terminal conjugado, en una solución acuosa,

b) oxidar el hialuronano modificado con tiol exponiendo la solución acuosa obtenida previamente a condiciones que permitan que el hialuronano modificado con tiol forme un polímero reticulado con disulfuro, en donde o mediante el cual la solución acuosa se convierte en un hidrogel, en donde dicho hidrogel tiene un contenido de tiol residual inferior al 20 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol,

opcionalmente c) añadir un polímero no modificado seleccionado del grupo de polisacáridos biocompatibles al hidrogel obtenido previamente o a la solución obtenida previamente,

40 opcionalmente d) tamizar el hidrogel obtenido previamente para obtener un hidrogel con una distribución del tamaño de partículas concreta,

e) llenar un recipiente con el hidrogel obtenido anteriormente, preferiblemente una jeringa, y exponer el recipiente lleno a condiciones que permitan la esterilización del hidrogel,

45 f) obtener una composición de hidrogel estéril en un recipiente que comprende un polímero reticulado.

En el método para producir un hidrogel, las etapas se pueden llevar a cabo en diferentes secuencias. Especialmente las etapas de reticulación (oxidación), adición de un polímero no modificado y tamizado se pueden realizar en diferentes secuencias sin afectar necesariamente a la calidad del hidrogel. Preferiblemente, las etapas se llevan a cabo en la secuencia a), c), b), d), e) y f), en donde la preparación de la solución (etapa a) y la adición del polímero no modificado (etapa c) se pueden realizar de forma concomitante y, opcionalmente, se puede añadir un componente adicional (por ejemplo, un agente anestésico local) al mismo tiempo.

55 La formación de enlaces disulfuro (reticulación) se produce naturalmente a valores de pH fisiológicos en presencia de oxígeno (por ejemplo, suministrado por el aire circundante o disuelto en una solución acuosa). Sin embargo, se prefiere la adición de un agente de oxidación para garantizar que las condiciones de la etapa b) sean suficientes para alcanzar el grado de oxidación que asegure que el hidrogel tenga un contenido de tiol residual inferior al 20 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol. La adición activa de un agente oxidante acelera y completa la formación de disulfuro para obtener el bajo grado deseado de contenido de tiol residual. Además, la adición de un agente de oxidación en la etapa b) resultó ser especialmente relevante para garantizar un resultado reproducible y uniforme en los procesos industriales, es decir, que incluyen grandes volúmenes de granel.

Por consiguiente, en una realización preferida, en la etapa b) se añade un agente de oxidación a la solución acuosa obtenida previamente.

- Los agentes oxidantes adecuados y bien establecidos son, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (u otros peróxidos), ácido deshidroascórbico, sulfóxido de dimetilo y ácido hipocloroso (hipoclorito de sodio). En condiciones de exceso de presión, se puede usar oxígeno gaseoso puro o una mezcla de gas con alto contenido de oxígeno para aumentar la concentración de oxígeno disponible como agente de oxidación en la solución acuosa de polímero. La cantidad preferida a añadir depende del agente de oxidación y de la cantidad de grupos tiol en el hialuronano modificado con tiol. A modo de ejemplo, para el peróxido de hidrógeno, en la etapa b) la relación molar entre los grupos tiol libres del hialuronano modificado con tiol y el peróxido de hidrógeno debería ser preferiblemente de como máximo 4:1; más preferiblemente a lo sumo 2:1.
- En el contexto de los hidrogeles, el módulo de elasticidad G' de la composición de hidrogel se usa normalmente para caracterizar sus propiedades elásticas e indica el módulo de almacenamiento de cizallamiento determinado con un reómetro que aplica una fuerza de cizallamiento, por ejemplo, haciendo girar una placa (cónica). Los métodos estándar para determinar el módulo de elasticidad G' son conocidos en la técnica (Stocks D., Sundaram H., Michaels J., Durrani M.J., Wortzman M. S., Nelson D. B., Rheological Evaluation of the Physical Properties of Hyaluronic Acid Dermal Fillers, 2011, Journal of Drugs in Dermatology, 10(9), 974-980). El módulo de elasticidad G' se usa para caracterizar la firmeza (dureza) o suavidad de un gel. Al mismo tiempo, es una medida de la capacidad del gel para resistir la deformación. En consecuencia, se espera que los hidrogeles de relleno dérmico con valores altos de G' proporcionen un mejor soporte y voluminización después del implante (Stocks y col., 2011). Además de la temperatura y la frecuencia de la placa giratoria, otras condiciones de prueba variables pueden influir en la comparabilidad cuantitativa del módulo de elasticidad G'. Las pruebas repetidas normalmente pueden dar como resultado una variación estándar de aproximadamente $\pm 10\%$ con respecto al valor medio, por ejemplo, un 8 %. En algunos casos, se observó que el módulo de elasticidad variaba hasta un 20 % cuando el hidrogel se proporcionaba mediante extrusión a través de una aguja o sin aguja. Por lo tanto, se recomienda mantenerse cerca del protocolo descrito a continuación en el ejemplo 4 para evaluar el módulo de elasticidad G'.
- En una realización preferida, la composición comprende además un polímero no modificado seleccionado del grupo de polisacáridos biocompatibles. Preferiblemente, el polisacárido no modificado es hialuronano (HA) no modificado. El hialuronano no modificado (no reticulado) o también denominado hialuronano libre puede complementar la composición de hidrogel. El HA no modificado se agrega comúnmente como lubricante a los rellenos de tejidos blandos para garantizar una buena inyectabilidad al disminuir la fuerza de extrusión requerida para inyectar los productos a través de una aguja o cánula. Preferiblemente, la materia prima de hialuronano libre usada para la producción de la composición tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 500 kDa a aproximadamente 3.500 kDa. Sin embargo, debido a la rápida degradación del hialuronano no estabilizado, el experto en la materia comprenderá que el rendimiento *in vivo* de la composición como relleno de tejidos blandos depende en gran medida del polímero reticulado y las propiedades del hialuronano modificado con tiol subyacente. Se prefiere que el polisacárido no modificado esté comprendido en una concentración inferior a la del polímero reticulado. A modo de ejemplo, un hialuronano no modificado está comprendido en las composiciones en concentraciones de 3 mg/ml a 7 mg/ml, tal como 5 mg/ml, en las que la concentración se refiere preferiblemente a la concentración de una sal, por ejemplo, hialuronato de sodio.
- La composición de hidrogel puede incluir un agente anestésico local y/o uno o más componentes seleccionados de una variedad de otros componentes, tales como factores de crecimiento, vitaminas, polialcoholes, haluros de metales alcalinos, minerales, antioxidantes, aminoácidos, coenzimas, partículas cerámicas (tales como partículas de hidroxilapatita de calcio), partículas poliméricas, polímeros (tales como polietilenglicol, glucosaminoglicanos, lubricinas, polisacáridos y sus derivados), proteínas (tales como elastina, colágeno, queratina, fibroína de seda), agentes antcelulíticos, agentes anticatrizantes, agentes antiinflamatorios, agentes antiirritantes, vasoconstrictores, agentes antihemorrágicos (tales como agentes hemostáticos y antifibrinolíticos), agentes tensores, agentes antiacné, agentes pigmentantes, agentes antipigmentantes, agentes antiflogísticos, agentes antirreumáticos, agentes antiviricos, agentes antiinfecciosos, agentes antisépticos, agentes quimioterapéuticos, agentes citostáticos, agentes antialérgicos, agentes antivaricósicos, analgésicos, antibióticos, antimicóticos, espasmolíticos, antihistamínicos, agentes para tratar las hemorroides, agentes terapéuticos para tratar la piel, y agentes hidratantes.
- La adición de un agente anestésico local a la composición de hidrogel es particularmente deseable en vista de su capacidad para mitigar el dolor tras la inyección. Preferiblemente, el agente anestésico es lidocaína, tal como en forma de una sal de adición de ácido, por ejemplo, HCl de lidocaína.
- En un método para producir el hidrogel, se puede añadir un agente anestésico local y/o uno o más componentes durante diferentes etapas de producción, es decir, en una realización, el agente anestésico local y/o uno o más componentes se añaden durante la etapa opcional c) o en otra realización independientemente de la adición del polímero no modificado, por ejemplo, añadido a la solución durante la etapa a) o al hidrogel obtenido en la etapa c) o d). En una realización preferida, se añade un agente anestésico, por ejemplo, HCl de lidocaína, durante la etapa a) o durante la etapa c). En una realización en donde la etapa c) precede a la etapa b), es decir, en donde se añade un hialuronano no modificado antes de la reticulación, se prefiere incluir también un agente anestésico local y/o uno o más componentes adicionales antes de la etapa de reticulación.

- Además, se entenderá que un componente principal de la composición de hidrogel es el agua. Preferiblemente, se usa agua para inyección o agua purificada para producir la composición. Además, se reconocerá que la composición puede tamponarse para mostrar un pH fisiológicamente aceptable en el intervalo de 6,7 a 7,8. Los expertos en la materia conocen los tampones adecuados e incluyen, por ejemplo, un tampón de fosfato. La composición también
- 5 presenta una osmolalidad fisiológicamente aceptable, que es similar a la osmolalidad normal del fluido extracelular en el sujeto a tratar (por ejemplo, en seres humanos). Por lo tanto, la composición puede tener una osmolalidad en el intervalo de 250-350 mOsmol/kg y puede incluir solutos adicionales para ajustar la osmolalidad, tales como cloruro de sodio, cloruro de calcio y/o cloruro de potasio.
- 10 La composición de hidrogel es estéril y se puede usar (en un método), en donde la composición de hidrogel es un medicamento, un cosmético o un dispositivo médico. El hidrogel se implanta, preferiblemente mediante inyección a través de una aguja o cánula, en un sitio de aplicación, preferiblemente en un tejido blando. Alternativamente, el hidrogel puede implantarse mediante un procedimiento quirúrgico. Una vez aplicado, el hidrogel puede denominarse implante o depósito (hidrogel). La composición de hidrogel según la invención es biocompatible y forma un implante
- 15 absorbible (es decir, biodegradable). Por lo tanto, la composición de hidrogel según la invención se puede utilizar como relleno de tejidos blandos. La composición de hidrogel característica según la invención mostró una buena tolerabilidad y un efecto voluminizador *in vivo* tras el implante en un tejido blando en ratas. Estos estudios respaldan que el hidrogel es un valioso relleno de tejidos blandos para diversas aplicaciones.
- 20 Los rellenos de tejidos blandos que comprenden biomateriales tales como hialuronano estabilizado se suministran al sitio del tejido, donde se desea su aumento por medio de una composición de hidrogel inyectable. Los objetivos de los usos o métodos que se refieren al relleno de tejidos blandos incluyen aumentar el tejido blando (dérmico), corregir anomalías congénitas, defectos adquiridos o defectos cosméticos.
- 25 El efecto principal de la composición de hidrogel es puramente físico, ya que tiene un efecto de relleno basado en el volumen original y la hinchazón del implante. Por lo tanto, en ausencia de cualquier interacción fisiológica o farmacológica, el uso puede clasificarse como cosmético y la composición puede considerarse como un dispositivo cosmético o médico. Las aplicaciones en donde el uso de la composición de hidrogel según la invención puede considerarse cosmético incluyen, por ejemplo, la reducción de los signos de la edad, por ejemplo,
- 30 - la aplicación en el tejido de la vulva y la vagina con fines de rejuvenecimiento genital femenino no quirúrgico
- aplicación en la dermis, aplicación subdérmica o supraperióstica.
- 35 A modo de ejemplo, la composición de hidrogel se puede usar (en un método) con fines cosméticos, por ejemplo, para llenar arrugas, para tratar defectos de la piel, para restaurar el volumen perdido de la cara o del cuerpo (por ejemplo, los senos, el lóbulo de la oreja), para reducir los hoyuelos en la celulitis, para tratar las deformidades del lacrimal, para dar forma a los contornos de la cara o el cuerpo (por ejemplo, aumento de glúteos, aumento de cadera, aumento de pantorrillas), para agrandar el pene (aumento de la circunferencia del pene, aumento del glande del pene).
- 40 En otros casos, el llenado y el aumento de un tejido blando pueden dar como resultado el tratamiento o la prevención de una enfermedad, es decir, en donde los síntomas de la enfermedad se reducen, alivian y/o evitan que vuelvan a aparecer. Las enfermedades causadas por un defecto de los tejidos blandos pueden beneficiarse del relleno, la amortiguación, el soporte o el aumento estructural temporal y/o local del tejido circundante mediante el hidrogel
- 45 aplicado. Las enfermedades en donde la composición de hidrogel puede usarse para el tratamiento o la prevención incluyen, por ejemplo
- metatarsalgia, una enfermedad dolorosa de la almohadilla grasa de la bola del pie, para la cual la composición de hidrogel según la invención se puede aplicar en la almohadilla grasa del tejido blando de la bola del pie,
- 50 - incontinencia urinaria o fecal, para lo cual la composición de hidrogel según la invención puede aplicarse en el tejido que define los esfínteres,
- atrofia vulvovaginal (también síndrome genitourinario de la menopausia), para lo cual la composición de hidrogel según la invención se puede aplicar en la zona vulvovaginal mediante inyección en la mucosa vaginal y el vestíbulo y/o para aumentar los labios mayores, en donde una reconstrucción de los labios mayores asegurará un contacto estrecho entre ambos labios mayores para proteger las estructuras internas de la vulva
- 55 - deterioro de las cuerdas vocales,
- 60 - insuficiencia valvular venosa, o
- lipoatrofia facial, cicatrices debilitantes o asimetría o deformación morfológica (congénita o resultante de un traumatismo o una cirugía, por ejemplo, del tórax o de la cara), para las que el hidrogel se aplica con fines reconstructivos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una unidad de aplicación para inyección que comprende una jeringa, en donde la jeringa se llena con una composición de hidrogel según la invención y comprende además al menos una aguja hipodérmica. En una realización preferida, la unidad comprende al menos dos agujas hipodérmicas, que se diferencian entre sí en su luz. En otra realización de la unidad de aplicación, la al menos una aguja hipodérmica se caracteriza por una luz medida en el calibre (G) de al menos 27 G, preferiblemente de 27 G a 32 G.

Dicha unidad de aplicación es de ventaja práctica para usar y aplicar la composición según la invención, ya sea con fines cosméticos o médicos.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación del grado de modificación

La cuantificación de los grupos tiol en un hialuronano modificado con tiol (HA-SH) usado como materia prima para la preparación de composiciones de hidrogel se basa en un método de química húmeda que emplea 2,2'-ditiodipiridina (DTDP). Las fracciones de tiol libres que están unidas covalentemente a una cadena principal polimérica se someten a una reacción de intercambio de tiol-disulfuro con DTDP, mientras que se libera un equivalente de una tiona cromofórica. En un medio ácido tamponado (pH = 4), la absorción de la tiona resultante se puede medir fotométricamente a 343 nm.

Se pesaron con precisión aproximadamente 420 mg de hialuronano modificado con tiol y se disolvieron en 30 g de HCl 0,01 N con agitación magnética continua durante 2-3 horas para preparar una solución madre. A continuación, se pesaron con precisión aproximadamente 310 mg de la solución madre y se mezclaron con 4200 mg de tampón acetato a pH 4 en un tubo Eppendorf para preparar una solución de muestra. Se prepararon tres soluciones de muestra a partir de cada solución madre. Se pesaron con precisión 25,0 mg de N-acetilcisteína y se disolvieron en 25,0 ml de tampón acetato (pH 4). Después, esta solución se diluyó adicionalmente con tampón acetato (pH 4) para la preparación de una curva de calibración. Se usó un tampón acetato para el valor en blanco. Se añadieron 500 µl de una solución que contenía 0,125 mg/ml de DTDP en tampón acetato (pH 4) a 500 µl de cada solución de muestra (curva de calibración, solución de muestra y valor en blanco). Las soluciones se homogeneizaron brevemente y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, cada muestra (curva de calibración, solución de muestra y valor en blanco) se transfirió a microcubetas y se midió a 343 nm en un espectrofotómetro frente al valor en blanco.

Ejemplo 2 - Determinación del contenido de tiol residual

Para la determinación del contenido de tiol residual del polímero reticulado en la composición de hidrogel (es decir, el polímero HA-SH tras la reticulación y la producción de las composiciones) se usó un método similar al descrito anteriormente.

Se pesaron con precisión aproximadamente 50 mg de cada gel de muestra y se mezclaron con 1,3 ml de una solución que contenía 0,125 mg/ml de DTDP en tampón acetato (pH 4). Se pesaron con precisión 25,0 mg de N-acetilcisteína y se disolvieron en 200,0 ml de tampón acetato (pH 4). Después, esta solución se diluyó adicionalmente con tampón acetato (pH 4) para la preparación de una curva de calibración. Se usó un tampón acetato para el valor en blanco. Se añadieron 500 µl de una solución que contenía 0,125 mg/ml de DTDP en tampón acetato (pH 4) a 500 µl de cada muestra de la curva de calibración y del blanco. Todas las muestras se incubaron con agitación continua durante 120 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación de todas las muestras, se diluyeron adicionalmente 500 µl de cada sobrenadante con 500 µl de tampón acetato y se midieron a 343 nm en un espectrofotómetro frente al valor en blanco.

Ejemplo 3 - Métodos de producción de un hidrogel

50 Método A

Disolución: el hialuronano modificado con tiol, el hialuronano no modificado y el HCl de lidocaína se disuelven simultáneamente en una solución acuosa

55 Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes de disulfuro por el oxígeno

60 Tamizado: Opcionalmente, el hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado, hialuronano no modificado y HCl de lidocaína se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces)

Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas

65 Método B

Disolución: El hialuronano modificado con tiol, el hialuronano no modificado y el HCl de lidocaína se disuelven simultáneamente en una solución acuosa ácida.

5 Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por un agente de oxidación y oxígeno.

Tamizado: Opcionalmente, el hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado, hialuronano no modificado y HCl de lidocaína se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

10 Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas

Método C

15 Disolución: El hialuronano modificado con tiol se disuelve en una solución acuosa; se prepara una solución separada que comprende hialuronano no modificado y HCl de lidocaína en tampón fosfato (pH 6,8-7,6).

Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por el oxígeno.

20 Tamizado: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

25 Homogeneización: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y la solución que comprende hialuronano no modificado y HCl de lidocaína se homogeneizan y, opcionalmente, se prensan a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas

30 Método D

Disolución: El hialuronano modificado con tiol se disuelve en una solución acuosa; se prepara una solución separada que comprende hialuronano no modificado y HCl de lidocaína en tampón fosfato (pH 6,8-7,6).

35 Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por un agente de oxidación y oxígeno.

Tamizado: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

40 Homogeneización: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y la solución que comprende hialuronano no modificado y HCl de lidocaína se homogeneizan y, opcionalmente, se prensan a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

45 Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas

Método E

50 Disolución: El hialuronano modificado con tiol y el HCl de lidocaína se disuelven en una solución acuosa; se prepara una solución separada que comprende hialuronano no modificado en tampón fosfato (pH 6,8-7,6).

Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por el oxígeno.

55 Tamizado: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y HCl de lidocaína se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

60 Homogeneización: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y HCl de lidocaína y la solución que comprende hialuronano no modificado se homogeneizan y, opcionalmente, se prensan a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces). Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas.

Método F

65 Disolución: El hialuronano modificado con tiol y el HCl de lidocaína se disuelven en una solución acuosa ácida; se prepara una solución separada que comprende hialuronano no modificado en tampón fosfato (pH 6,8-7,6).

Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por un agente de oxidación y oxígeno.

5 Tamizado: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y HCl de lidocaína se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

10 Homogeneización: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y HCl de lidocaína y la solución que comprende hialuronano no modificado se homogeneizan y, opcionalmente, se prensan a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces). Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas.

Método G

15 Disolución: El hialuronano modificado con tiol, el hialuronano no modificado y el HCl de lidocaína se disuelven consecutivamente en una solución acuosa.

20 Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por el oxígeno.

25 Tamizado: Opcionalmente, el hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado, hialuronano no modificado y HCl de lidocaína se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

30 Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas.

Método H

35 Disolución: El hialuronano modificado con tiol, el hialuronano no modificado y el HCl de lidocaína se disuelven consecutivamente en una solución acuosa ácida.

40 Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por un agente de oxidación y oxígeno.

45 Tamizado: Opcionalmente, el hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado, hialuronano no modificado y HCl de lidocaína se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

50 Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas.

Método I

55 Solución de disolución 1: El hialuronano modificado con tiol, el hialuronano no modificado y el HCl de lidocaína se disuelven simultáneamente en agua.

60 Solución de reticulación 1: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,8 a 7,6, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por un agente de oxidación y oxígeno.

65 Solución de disolución 2: El hialuronano modificado con tiol, el hialuronano no modificado y, opcionalmente, el HCl de lidocaína se disuelven simultáneamente en agua.

70 Reticulación: El pH de la solución 2 se ajusta de aproximadamente 6,8 a 7,6, seguido inmediatamente por mezclar partes iguales de la solución reticulada 1 con la solución 2. El hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por un agente de oxidación y oxígeno.

75 Tamizado: Opcionalmente, el hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado, hialuronano no modificado y HCl de lidocaína se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

80 Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas.

Método J

85 Disolución: El hialuronano modificado con tiol y el hialuronano no modificado se disuelven en una solución acuosa; se prepara una solución separada que comprende HCl de lidocaína.

Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,7 a 7,8, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por el oxígeno.

5 Tamizado: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y hialuronano no modificado se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

10 Homogeneización: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y hialuronano no modificado y la solución que comprende HCl de lidocaína se homogeneizan y, opcionalmente, se prensan a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

10 Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas.

Método K

15 Disolución: El hialuronano modificado con tiol y el hialuronano no modificado se disuelven en una solución acuosa; se prepara una solución separada que comprende HCl de lidocaína.

20 Reticulación: Tras ajustar el pH de aproximadamente 6,7 a 7,8, el hialuronano modificado con tiol se reticula mediante la oxidación de los grupos tiol en puentes disulfuro por un agente de oxidación y oxígeno.

20 Tamizado: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y hialuronano no modificado se prensa a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

25 Homogeneización: El hidrogel que comprende hialuronano modificado con tiol reticulado y hialuronano no modificado y la solución que comprende HCl de lidocaína se homogeneizan y, opcionalmente, se prensan a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces). Esterilización: Esterilización en autoclave tras el llenado del hidrogel en jeringas.

Ejemplo 4 - Determinación del módulo de elasticidad G'

30 Las mediciones reológicas oscilatorias de todas las composiciones se realizaron usando un reómetro Anton Paar MCR 102 con un sistema de placa cónica. Las composiciones se transfirieron al reómetro mediante inyección a través de una aguja de 27 G (o sin aguja, cuando se indique). El módulo de elasticidad se obtuvo durante una prueba de frecuencia con deformación constante dentro de la región viscoelástica lineal del hidrogel a una temperatura de 25 °C y una frecuencia de 1 Hz.

Ejemplo 5 - Determinación del peso molecular

40 Para las mediciones se utilizó un sistema SEC multidetector Viscotek TDAmax con control de temperatura que comprendía detectores de alta sensibilidad en serie: matriz de fotodiodos UV, dispersión de luz (tanto RALS como LALS), índice de refracción y viscosímetro. El detector del índice de refracción registró la concentración de la muestra, lo que dio como resultado la curva de distribución respectiva. En combinación con los detectores de dispersión de luz, se determinó el peso molecular (MW). Para el análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), las muestras se diluyeron con PBS dando como resultado una concentración final de polímero de 0,1 mg/ml.

45 Los errores o fluctuaciones que se producen durante esta prueba suelen provocar una desviación de aproximadamente el 10 %.

Ejemplo 6 - Medición de la fuerza de extrusión

50 Se unió una aguja de 27 G o 30 G a una jeringa de 1 ml que contenía la composición de hidrogel. La fuerza de extrusión se midió con un sistema de ensayo de fuerza Mecmesin y una velocidad de extrusión de 12 mm/min. Las mediciones se realizaron al menos por duplicado. Se indica la fuerza de extrusión (EF) media calculada para la composición de hidrogel investigada.

55 Ejemplo 7 - Preparación y caracterización de una composición de hidrogel que comprende 7 mg/ml de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada

60 Se produjo un hidrogel que comprendía un 0,7 % de sal sódica de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada (HA-LYSC) y un 0,3 % de hialuronato de sodio no modificado según el método B sin la adición de HCl de lidocaína. En resumen, 525 mg de HA-LYSC (peso seco, MMW 590 kDa, grado de modificación 149 µmol/g de polímero) y 225 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW 2,4 MDa) se disolvieron en 66,2 g de HCl 0,01 M (que comprendía 540 mg de NaCl) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 h. A 62,33 g de esta solución, se añadieron 6,925 ml de tampón fosfato 100 mM, pH 11,74, que contenían 0,018 % de H₂O₂, lo que dio como resultado un ajuste del pH de la solución a aproximadamente un pH de 7,2. Se mantuvo la mezcla durante 66 h a 5 °C para su

reticulación, luego se prensó a través de un tamiz de 200 µm, se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El hidrogel estéril tenía un pH de aproximadamente 7,1 y una osmolalidad de 309 mOsm/kg.

Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MMW, el contenido de tiol residual, el módulo de elasticidad G' y la fuerza de extrusión como se ha descrito anteriormente y se resumen en la tabla 1. Para la medición de la fuerza de extrusión, se unió una aguja de 30 G a la jeringa. Para la determinación del módulo de elasticidad G', el hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin necesidad de colocar la aguja).

Tabla 1: Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [$\mu\text{mol/g}$]	Módulo de elasticidad G' (sin aguja) [mPa]	Contenido de tiol residual [$\mu\text{mol/g}$]	Fuerza de extrusión [N]
INVENT1	590	149	79.067	0	5 (30 G)

Ejemplo 8 - Preparación y caracterización de una composición de hidrogel que comprende 17,9 mg/ml de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada

Se produjo un hidrogel que comprendía un 1,79 % de sal sódica de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada (HA-LYSC) y un 0,5 % de hialuronato de sodio no modificado según el método B sin la adición de HCl de lidocaína. En resumen, 1,34 g de HA-LYSC (peso seco, MMW 590 kDa, grado de modificación 149 $\mu\text{mol/g}$ de polímero) y 375 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW 2,4 MDa) se disolvieron en 65,2 g de HCl 0,01 M (que comprendía 458 mg de NaCl) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 h. A 62,30 g de esta solución, se añadieron 6,92 ml de tampón fosfato 100 mM, pH 11,90, que contenían 0,045 % de H_2O_2 , lo que dio como resultado un ajuste del pH de la solución a aproximadamente un pH de 7,2. Se mantuvo la mezcla durante 66 h a 5 °C para su reticulación, luego se prensó a través de un tamiz de 200 µm, se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El hidrogel estéril tenía un pH de aproximadamente 7,2 y una osmolalidad de 303 mOsm/kg.

Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MMW, el contenido de tiol residual, el módulo de elasticidad G' y la fuerza de extrusión como se ha descrito anteriormente y se resumen en la Tabla 2. Para la medición de la fuerza de extrusión, se unió una aguja de 27 G a la jeringa. Para la determinación del módulo de elasticidad G', el hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin necesidad de colocar la aguja).

Tabla 2: Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [$\mu\text{mol/g}$]	Módulo de elasticidad G' (sin aguja) [mPa]	Contenido de tiol residual [$\mu\text{mol/g}$]	Fuerza de extrusión [N]
INVENT2	590	149	636.177	0	8 (27 G)

Ejemplo 9 - Preparación y caracterización de una composición de hidrogel que comprende 9 mg/ml de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada

Se produjo un hidrogel que comprendía 9 mg/ml de sal sódica de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada (HA-LYSC) y 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método B sin la adición de HCl de lidocaína. En resumen, 450 mg de HA-LYSC (peso seco, MMW 505 kDa, grado de modificación 158 $\mu\text{mol/g}$ de polímero) y 150 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW 2,4 MDa) se disolvieron en 44 g de HCl 0,01 M (que comprende NaCl) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 horas. A 39,82 g de esta solución, se añadieron 4,425 ml de tampón de fosfato 100 mM, pH 12, que contenía un 0,024 % de H_2O_2 lo que dio como resultado un ajuste del pH a aproximadamente un pH de 7,4. La mezcla se homogeneizó durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se dejó durante la noche para completar la reticulación. El gel reticulado se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El gel esterilizado tenía un pH de aproximadamente 7,5 y una osmolalidad de 315 mOsm/kg.

Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MMW, el contenido de tiol residual y el módulo de elasticidad G' como se ha descrito anteriormente y se resumen en la Tabla 3. Para la determinación del módulo de elasticidad G', el hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin necesidad de colocar la aguja).

Tabla 3. Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [$\mu\text{mol/g}$]	Contenido de tiol residual [$\mu\text{mol/g}$]	Módulo de elasticidad G' [mPa]
----	-------------------------------------	---	--	--------------------------------

INVENT3	505	158	0	248.863
---------	-----	-----	---	---------

5 Ejemplo 10 - Preparación y caracterización de una composición de hidrogel que comprende 35 mg/ml de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada

10 Se produjo un hidrogel que comprendía 35 mg/ml de sal sódica de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada (HA-LYSC) y 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método B sin la adición de HCl de lidocaína. En resumen, se disolvieron 700 mg de HA-LYSC (peso seco, MMW 590 kDa, grado de modificación 149 pmol/g de polímero) y 60 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW 2,4 MDa) en 17 g de HCl 0,01 M (que comprende NaCl) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 horas. A 16,28 g de esta solución se añadieron 1,81 ml de tampón de fosfato 100 mM, pH 12 que contenía un 0,089 % de H₂O₂, lo que dio como resultado un ajuste del pH de la solución a aproximadamente un pH de 7,1. La mezcla se homogeneizó durante 15 minutos y después se dejó durante 18 h a temperatura ambiente para completar la reticulación. El gel reticulado se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El gel esterilizado tenía un pH de aproximadamente 7,0 y una osmolalidad de 334 mOsmol/kg.

15 20 Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MMW, el contenido de tiol residual, el módulo de elasticidad G' y la fuerza de extrusión como se ha descrito anteriormente y se resumen en la Tabla 4. Para la medición de la fuerza de extrusión, se unió una aguja de 27 G a la jeringa. Para la determinación del módulo de elasticidad G', el hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin necesidad de colocar la aguja).

25 Tabla 4. Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	Materia prima DoM HA-SH [$\mu\text{mol/g}$]	Contenido de tiol residual [$\mu\text{mol/g}$]	Módulo de elasticidad G' [mPa]	Fuerza de extrusión [N]
INVENT4	590	149	0	1 939 050	27

30 Ejemplo 11 - Comparación de diversas composiciones de hidrogel estériles

35 En la Tabla 5 se enumeran varias composiciones y sus características. Las principales diferencias entre las composiciones comparativas ID 1* e ID 8* son las características de concentración y peso molecular del polímero reticulado, que es un producto de oxidación de la HA-cisteamina. Las composiciones de hidrogel INVENT1 e INVENT2 se prepararon reticulando la HA-lisil-cisteamina. Las composiciones de hidrogel estériles que comprenden hialuronano modificado con tiol reticulado, hialuronato de sodio no modificado y 3 mg/ml de HCl de lidocaína se produjeron con métodos similares (compárense los métodos A, B e I anteriores).

40 45 Las composiciones de hidrogel ID 1* a ID 4* se produjeron con un polímero de hialuronano-cisteamina con un MMW de 150 kDa y un grado de modificación de 118 $\mu\text{mol/g}$. Las composiciones de hidrogel ID 1* a ID 3* comprendían 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado y 6 mg/ml (ID 1*), 9 mg/ml (ID 2*) y 13 mg/ml (ID3*) de hialuronano-cisteamina reticulada, respectivamente. La composición de hidrogel ID 4* comprendía 4 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado y 13 mg/ml de hialuronano-cisteamina reticulada.

50 55 Las composiciones de hidrogel ID 5* e ID 6* se produjeron con un polímero de hialuronano-cisteamina con un MMW de 730 kDa y un grado de modificación de 151 $\mu\text{mol/g}$. Los hidrogeles ID 5* e ID 6* comprendían 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado (MMW 2,41 MDa) y 5 mg/ml (ID 5*) y 9 mg/ml (ID 6*) de sal sódica de hialuronano-cisteamina reticulada, respectivamente.

60 65 Las composiciones de hidrogel ID 7* e ID 8* se produjeron con un polímero de hialuronano-cisteamina con un MMW de 780 kDa y un grado de modificación de 149 $\mu\text{mol/g}$. La composición de hidrogel ID 7* comprendía 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado (MMW 1,94 MDa) y 7 mg/ml de sal sódica de hialuronano-cisteamina reticulada. La composición de hidrogel ID 8* comprendía 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado (MMW 1,94 MDa) y 13 mg/ml de sal sódica de hialuronano-cisteamina reticulada.

70 La composición de hidrogel ID 9* se produjo según el método B con un polímero de hialuronano-cisteamina con un MMW de 720 kDa y un grado de modificación de 146 $\mu\text{mol/g}$. La composición de hidrogel ID 9* comprendía 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado (MMW 1,94 MDa) y 17,9 mg/ml de sal sódica de hialuronano-cisteamina reticulada.

75 Las composiciones de hidrogel INVENT1 (Ejemplo 7) e INVENT2 (Ejemplo 8) se produjeron con un polímero de hialuronano-lisil-cisteamina con un MMW de 590 kDa y un grado de modificación de 149 $\mu\text{mol/g}$. La composición de hidrogel INVENT1 comprendía 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado (MMW 1,94 MDa) y 7 mg/ml de sal sódica de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada. La composición de hidrogel INVENT2 comprendía 5 mg/ml de

hialuronato de sodio no modificado (MMW 1,94 MDa) y 17,9 mg/ml de sal sódica de hialuronano-lisil-cisteamina reticulada.

Se determinaron el MMW del hialuronano modificado con tiol y su grado de modificación (DoM), el módulo de elasticidad G' y la fuerza de extrusión (EF) de la composición de hidrogel estéril, y el contenido de tiol residual del polímero reticulado en la composición de hidrogel estéril como se ha descrito anteriormente.

Todas las composiciones de hidrogel estériles tenían un pH en el intervalo de 6,7 a 7,8 y una osmolalidad en el intervalo de 250 a 350 mOsm/kg

10 Tabla 5: Características de las composiciones de hidrogel estériles que comprenden polímeros reticulados

Composición de hidrogel	MMW del polímero HA-SH	Módulo de elasticidad G'	EF	DoM	Contenido residual de tiol	Método de producción
	kDa	mPa	N	μmol/g	μmol/g	
ID 1*	150	33.987	6 (30 G)	118	0	B
ID 2*	150	140.218	11 (30 G)	118	0	B
ID 3*	150	475.046	25 (30 G)	118	n.d.	B
ID 4*	150	258.226	15 (30 G)	118	n.d.	I
ID 5*	730	88.290	5 (30 G)	151	0	A
ID 6*	730	390.540	10 (30 G)	151	0	A
ID 7*	780	183.557a	5 (30 G)	149	1	B
ID 8*	780	817.850a	n.d.	149	2	B
ID 9*	720	1.549.000a	12 (27 G)	146	3	B
INVENT1	590	79.067	5 (30 G)	149	0	Bb
INVENT2	590	636.177	8 (27 G)	149	0	Bb

15 Un asterisco (*) indica aquellos ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones, pero que se incluyen con fines comparativos. La abreviatura n.d. significa "no determinado". ^aPara la determinación del módulo elástico G', la composición de hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin necesidad de fijar la aguja). ^bsin HCl de lidocaína

20 La formación de enlaces disulfuro se controló midiendo el contenido de tiol residual de los polímeros reticulados y comparándolo con el grado inicial de modificación del hialuronano modificado con tiol. Se descubrió que todas las composiciones de hidrogel según esta invención tenían un contenido de tiol residual inferior al 15 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol.

25 Sorprendentemente, se descubrió que las propiedades elásticas de los hidrogeles no solo estaban influenciadas por la concentración del polímero reticulado, sino también por el MMW y la adición de lisina al agente de modificación que contiene tiol del hialuronano modificado con tiol.

30 La comparación del módulo de elasticidad de las composiciones de hidrogel ID 3* e ID 8* muestra que el MMW del hialuronano modificado con tiol usado para la reticulación tuvo una influencia positiva en las propiedades elásticas de la composición estéril. El hialuronano modificado con tiol de la composición de hidrogel ID 3* tenía un MMW de 150 kDa, mientras que el hialuronano modificado con tiol de la composición de hidrogel ID 8* tenía un MMW de 780 kDa. A parte de eso, ambas composiciones de hidrogel comprendían 13 mg/ml de hialuronano-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado y 3 mg/ml de HCl de lidocaína, y ambas composiciones de hidrogel se produjeron mediante el mismo método de producción.

35 La comparación del módulo de elasticidad de la composición de hidrogel ID 7* e INVENT1 muestra que las composiciones que comprenden hialuronano-lisil-cisteamina reticulada son menos elásticas que las composiciones que comprenden hialuronano-cisteamina reticulada. Ambas composiciones de hidrogel comprendían 7 mg/ml de hialuronano modificado con tiol reticulado, 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado y 3 mg/ml de HCl de lidocaína, y ambas composiciones de hidrogel se produjeron mediante el mismo método de producción (B). Se observó el mismo efecto al comparar el módulo de elasticidad de las composiciones de hidrogel ID 9* e INVENT2.

40 Ejemplo 12 - Caracterización *in vivo* de composiciones de hidrogel implantadas

45 Se investigaron diversas composiciones según la invención, así como composiciones comparativas, para determinar el desarrollo del volumen medio de depósito a lo largo del tiempo después del implante intradérmico mediante inyección con imágenes de resonancia magnética (IRM).

En detalle, se calcula el volumen del depósito en % con respecto al punto de partida para compensar las posibles diferencias en el volumen de la aplicación. El volumen de depósito en t = 0 (directamente después del implante) corresponde al 100 %. El volumen del depósito puede monitorizarse, por ejemplo, mediante exploraciones de imágenes por resonancia magnética (IRM).

Se entenderá que el volumen del depósito como parámetro biológico, preferiblemente determinado en modelos animales, está sujeto a una gran variación individual. En consecuencia, los puntos de datos individuales son menos informativos y solo los valores medios (teniendo en cuenta múltiples sitios de aplicación y/o múltiples objetos de estudio) proporcionan datos concluyentes. Por supuesto, el rendimiento dependerá además de factores tales como el tipo de tejido en el sitio del implante, el método utilizado para medir el volumen del depósito y la especie del organismo estudiado. La transferibilidad cuantitativa de los datos, por ejemplo, para su aplicación en seres humanos, puede estar restringida. Sin embargo, se observaron resultados comparables a los datos de ratas en otro estudio *in vivo* con ratones (datos no mostrados). Por lo tanto, la caracterización *in vivo* proporciona una herramienta valiosa para evaluar y comparar las composiciones de hidrogel individuales entre sí.

El tiempo de residencia se puede usar como parámetro para describir la presencia de un volumen medio de depósito durante un período de tiempo, preferiblemente la presencia de un volumen de depósito de aproximadamente el 100 % (o incluso mayor) durante un período de tiempo. Un efecto voluminizador puede definirse por un volumen de depósito de aproximadamente el 100 % (o más) en un cierto punto de tiempo tras la aplicación del hidrogel, por ejemplo, medido en la semana 5 (por ejemplo, en el día 30) o, en otra realización, en la semana 12 (por ejemplo, del día 81 al 84) y, finalmente, incluso en la semana 24 (por ejemplo, medido de 165 a 168 días) tras el implante.

Se probaron once composiciones de hidrogel estériles diferentes (véase la tabla 6 para conocer las características del hidrogel) y dos rellenos dérmicos disponibles en el mercado para el tratamiento de líneas finas, Beloteró® soft (COMP1*) y Prophilo® (COMP2*). COMP1* contiene 20 mg/ml de hialuronano reticulado con BDDE y 3 mg/ml de HCl de lidocaína en una solución tamponada con fosfato. COMP2* contiene 16 mg/ml de hialuronano de alto MW y 16 mg/ml de hialuronano de bajo MW en una solución tamponada con fosfato.

Las composiciones se inyectaron por vía intradérmica en la piel posterior de las ratas Sprague Dawley hembras. El volumen de inyección fue de aproximadamente 50 µl. Se aplicó un máximo de 8 depósitos por rata con un total de 12 aplicaciones por composición ID 5*, ID 6*, ID 7*, ID 8* e ID 9*, 14 aplicaciones por composición ID 1*, ID 2* y COMP1*, 5 aplicaciones por composición ID 3* e ID 4*, 16 aplicaciones por INVENT1 e INVENT2 y 8 aplicaciones por COMP2*. El volumen de los depósitos de hidrogel intradérmico se monitorizó mediante IRM (dispositivo MRT Siemens Espree 1.5 T) en distintos puntos temporales durante un período de tiempo total de hasta 170 días. Los volúmenes de depósito individuales (mm^3) se calcularon según las imágenes de IRM y se controlaron a lo largo del tiempo. Se normalizaron los volúmenes calculados con los resultados obtenidos el día 0 (inmediatamente tras la aplicación) y se indican en porcentaje (%). En la Tabla 6 se enumeran los volúmenes medios de depósito relativos de diferentes composiciones en diferentes puntos temporales. Se permitió un determinado intervalo de días para cada punto temporal. Para cada composición de hidrogel, todos los volúmenes de depósito se determinaron el mismo día.

Tabla 6: Evolución del volumen medio relativo de los depósitos (%) a lo largo del tiempo

	Volumen medio relativo de los depósitos (%)								
	Día 7	Día 14	Días 21-24	Días 28-30	Días 53-56	Días 81-84	Días 107-112	Días 133-140	Días 168-170
Composición de hidrogel									
ID 1*	14,1	0,0	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ID 2*	27,3	6,9	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ID 3*	n.d.	n.d.	n.d.	15,9	4,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ID 4*	n.d.	n.d.	n.d.	10,1	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ID 5*	n.d.	n.d.	67,6	n.d.	54,9	49,2	48,3	41,5	39,5
ID 6*	n.d.	n.d.	108,1	n.d.	85,7	85,7	75,8	75,3	75,9
ID 7*	n.d.	n.d.	n.d.	93,2	93,1	77,4	75,0	67,8	63,6
ID 8*	n.d.	n.d.	n.d.	136,7	114,1	103,7	98,0	94,5	85,2
COMP1*	5,2	0,0	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
COMP2*	n.d.	n.d.	0,0	n.d.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
INVENT1	58,1	48,1	n.d.	34,3	14,8	7,6	1,7	2,0	1,6
INVENT2	145,3	145,8	n.d.	123,5	86,1	75,11	62,1	55,9	49,5
ID 9*	130,9	149,4	n.d.	148,9	137,6	125,0	123,2	115,6	105,6

Un asterisco (*) indica aquellos ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones, pero que se incluyen con fines comparativos. La abreviatura n.d. significa "no determinado".

Las composiciones comparativas de hidrogel ID 1* a ID 4*, así como COMP1* y COMP2*, se degradaron muy rápidamente en menos de 2 meses tras la aplicación. En algunos casos, los depósitos de hidrogel no fueron detectables 2 semanas (COMP1* y la composición ID 1*) y aproximadamente 3 semanas (COMP2* y la composición ID 2*) tras el implante. Las composiciones de hidrogel ID 5*, ID 6*, ID 7* e ID 8*, que se prepararon reticulando hialuronano modificado con tiol con un MMW inicial en el intervalo de 730 a 780 kDa, mostraron un tiempo de residencia prolongado de más de 1 mes y hasta 5 meses. La comparación del tiempo de residencia de las composiciones de hidrogel ID 3* e ID 8* muestra que el MMW del hialuronano modificado con tiol usado para la reticulación tuvo una influencia positiva en el tiempo de residencia de la composición estéril. El hialuronano modificado con tiol de la composición de hidrogel ID 3* tenía un MMW de 150 kDa y los depósitos de la composición de hidrogel ID 3* no fueron detectables 3 meses después del implante. El hialuronano modificado con tiol de la composición ID 8* tenía un MMW de 780 kDa y se detectaron depósitos de composición de hidrogel ID 8* durante todo el período de estudio. Ambas composiciones de hidrogel eran por lo demás comparables; comprendían 13 mg/ml de hialuronano-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado y 3 mg/ml de HCl de lidocaína, y ambas composiciones se produjeron mediante el mismo método de producción.

La comparación del volumen de depósito relativo medio de la composición de hidrogel ID 7* e INVENT1 muestra que la composición que comprende hialuronano-lisil-cisteamina reticulada a una concentración relativamente baja de 7 mg/ml muestra una disminución del volumen de depósito medio más rápida que la composición que comprende hialuronano-cisteamina reticulada a la misma concentración. Ambas composiciones de hidrogel comprendían 7 mg/ml de hialuronano modificado con tiol reticulado y 3 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado, y ambas composiciones de hidrogel se produjeron mediante el mismo método de producción (B).

La misma observación se hizo al comparar una composición de hidrogel que comprendía hialuronano-lisil-cisteamina reticulada (INVENT2) en una concentración de 17,9 mg/ml con composiciones de hidrogel que comprenden hialuronano-cisteamina reticulada en la misma concentración de 17,9 mg/ml (ID 9*). Tras 24 semanas, el volumen medio de depósito relativo de la composición de hidrogel INVENT2 fue de aproximadamente el 50 %.

Las composiciones de hidrogel según la invención muestran el rendimiento *in vivo* deseado, prometedor para su aplicabilidad como relleno biodegradable de tejidos blandos, por ejemplo, en seres humanos. Además, la naturaleza del polímero reticulado proporciona un perfil de seguridad toxicológica favorable y se pueden aplicar volúmenes más altos en comparación con otros rellenos de hialuronano estabilizados (por encima de 50 ml por aplicación).

Ejemplo 13 - Estudios de biocompatibilidad en composiciones de hidrogel implantadas

Para estudiar la biocompatibilidad de las composiciones, se investigaron histológicamente las muestras de los sitios de implante de hidrogel.

Se prepararon secciones de tejido teñidas con hematoxilina y eosina (H y E) a partir de los sitios de implante de dos hidrogeles diferentes de la invención (INVENT1 e INVENT2) 28 días después del implante. La evaluación histológica reveló que los implantes estaban localizados en tejidos de la zona dérmica (intradérmicos; i.d.), del músculo (intramusculares; i.m.) o subcutáneos (subcutáneos; s.c.).

Cualitativamente, en todos los sitios de implante examinados, el material implantado (elemento de ensayo) se presentó como una masa amorfá ligeramente azulada, teñida de forma homogénea, que formaba una red dentro de los tejidos dérmicos, musculares o subcutáneos. Las reacciones locales del huésped pueden describirse en términos de un grado variable de infiltración de células polimorfonucleares, linfocitos y/o macrófagos con/sin células gigantes multinucleadas, así como de fibrosis (incluida la proliferación de fibroblastos o fibrocitos). Las reacciones del hospedador local fueron un poco más notables en el sitio s.c. en comparación con las de los sitios i.d. e i.m., aunque las reacciones generales no fueron cualitativamente diferentes entre los lugares. No hubo reacciones inesperadas del huésped en ninguno de los sitios de implante examinados en las condiciones de este experimento.

Para cuantificar los efectos en los sitios de implante, se aplicó un sistema de puntuación descrito en la norma ISO 10993-6:2016 (E), en el que una puntuación más alta indica una reacción del huésped más pronunciada. Basándose en las puntuaciones de reacción del huésped determinadas según el sistema de puntuación ISO 10993-6:2016 (E) adaptado, la composición INVENT1 tuvo una puntuación media de reacción del huésped para los tejidos combinados (i.d., i.m. y s.c.) de 9,6 y la composición INVENT2 tuvo una puntuación media de reacción del huésped de 12,3.

En las condiciones de este estudio, se consideró que los implantes de hidrogel de la composición INVENT2 que comprendían hialuronano-lisil-cisteamina en una concentración 2,5 veces mayor demostraban una diferencia mínima o nula en la reacción con el tejido en comparación con los implantes de hidrogel de la composición INVENT1.

Ejemplo 14 - Caracterización reológica de diferentes hialuronanos modificados con tiol

Se produjeron tres hialuronanos modificados con tiol diferentes usando diferentes agentes de modificación que contienen grupos tiol. El agente de modificación para la HA-lisil-cisteamina se preparó según el ejemplo 15 A (véase a continuación). La cisteamina HA se preparó como se ha descrito anteriormente y el agente de modificación de la

DGDTPDH se preparó según el documento PCT/EP2019/065755, ejemplo 12 incorporado en la presente memoria como referencia.

Se evaluaron las propiedades reológicas de los hialuronanos modificados con tiol en solución (sin reticulación previa).

5 En primer lugar, se preparó una solución al 1,2 % (m/m) del hialuronano modificado con tiol en HCl 0,01 N mediante agitación continua durante 2 a 4 horas, seguida de filtración (10 µm). Se determinó la viscosidad dinámica 30 minutos después de la filtración usando un reómetro Anton Paar MCR 102 con un sistema de placa cónica a una temperatura de 25 °C y una velocidad de cizallamiento constante de 5/s.

10 Tabla 7: Viscosidad dinámica de soluciones de diferentes hialuronanos modificados con tiol

Hialuronano modificado con tiol	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [µmol/g]	Viscosidad de la solución al 1,2 % tasa de compartición 5 s-1 [mPa*s]
Hialuronano-cisteamina	730	150	961
HADGDPH	767	134	814
Hialuronano-lisil cisteamina	500	210	124
Hialuronano-lisil cisteamina	500	158	114
Hialuronano-lisil cisteamina	590	149	273

25 Ejemplo 15 - Síntesis de agentes de modificación portadores de grupos tiol con cadena lateral básica

A. Preparación de diclorhidrato de bis(lisil)-cistamina:

30 A una mezcla de diclorhidrato de cistamina (842 mg, 3,74 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA, 1,36 ml, 7,85 mmol) en THF seco (10 ml) se añadió gota a gota una solución de éster de hidroxisuccinimida de N_{α},N_{ϵ} -di-Boc-L-lisina (3,32 g, 7,48 mmol) en THF seco (10 ml). Se agitó la reacción durante 18 h a temperatura ambiente, después se añadieron otros 0,7 ml de DIPEA, seguidos de agua (1 ml) y la agitación continuó durante 24 h.

35 Se vertió la mezcla en 200 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (500 ml). Se lavó la capa orgánica con HCl 1 N (100 ml), NaHCO₃ semisaturado (100 ml) y agua (50 ml), después se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporaron los compuestos volátiles a presión reducida para dar la bis(lisil)-cistamina protegida con N-Boc en forma de una espuma incolora.

40 Rendimiento: 2,2 g (73 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,11 (br, 1H, -NH), 5,53 (br, 1H, -NH), 4,74 (br, 1H, -NH), 4,15 (br, 1H, α-CH-NH), 3,70-3,45 (m, 2H, CH₂-NH-), 3,17-3,03 (m, 2H, ε-CH₂-NH), 2,80 (t, J=6,6 Hz, 2 H, -CH₂-S-), 1,94-1,21 (m, 24H, β, γ, δ-CH₂, 2 x t-Bu), 1,77-1,67 (m, 2H, -CH₂), 1,52-1,42 (m, 2H, -CH₂). m/z = 809,4 [M+H]⁺, 831,3 [M+Na]⁺.

45 A una solución de la bis(lisil)-cistamina N-protectora (1,03 g, 1,273 mmol) en MeOH (25 ml) se añadió cloruro de acetilo (500 µl, 7 mmol). Se agitó la reacción en un matraz equipado con un condensador de refluxo durante 5 h a 70 °C, después, se evaporaron los compuestos volátiles a presión reducida y se retiró el ácido clorhídrico residual por coevaporación con tolueno (2 x ml). Se suspendió el producto bruto en agua (10 ml), se lavó con tolueno (5 ml) y se liofilizó la capa acuosa para dar el compuesto del título en forma de una espuma incolora.

50 Rendimiento: 669 mg (95 %). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 3,99 (t, J=6,3 Hz, 1H, α-CH-NH₃), 3,72-3,62 (m, 1H, -NH-CH_{2A}), 3,59-3,50 (m, 1H, -NH-CH_{2B}), 3,01 (t, J=8,0 Hz, 2H, ε-CH₂-NH₃), 2,97-2,83 (m, 2H, -CH₂-S-), 1,97-1,87 (m, 2H, β-CH₂), 1,77-1,67 (m, 2H, δ-CH₂), 1,52-1,42 (m, 2H, γ-CH₂).

B. Preparación de diclorhidrato de bis(épsilon-azido-L-lisinil)-cistamina:

55 A una mezcla de diclorhidrato de cistamina (591 mg, 2,62 mmol) y N-alfa-T-butiloxicarbonil-épsilon-azido-L-lisina (1,5 g, 5,50 mmol) en diclorometano seco: DMF = 1:1 (20 ml), se añadió DIPEA (914 µl, 5,25 mmol), seguido de una solución de EDC*HCl (1,06 g, 5,50 mmol) en diclorometano enfriando con hielo durante un período de 15 min. La reacción se agitó durante 5 días a temperatura ambiente; a continuación, se evaporaron los compuestos volátiles a presión reducida. El residuo se capturó en acetato de etilo (150 ml) y se lavó con HCl 1 N (50 ml) y posteriormente con NaHCO₃ semisaturado (50 ml). Se secó la capa orgánica con Na₂SO₄ y se evaporaron los compuestos volátiles a presión reducida. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice: Ciclohexano/acetato de etilo = 70:30 a 50:50. Se obtuvo el compuesto en forma de un aceite incoloro que cristalizó tras reposar.

Rendimiento: 125 mg (7 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,20 (br, 1H, NH), 5,54 (br, 1H, NH), 4,21 (br, 1H, α -CH), 3,74 - 3,43 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{NH}-$), 3,28 (t, $J=6,8$ Hz, 2H, ϵ - $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2,80 (at, $J=6,3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 1,9 - 1,39 (m, 15H, $-\text{CH}_2\text{, CH}_3$ $t\text{-Bu}$). $m/z = 661,3$ [M+H] $^+$, 683,3 [M+Na] $^+$.

5 A una solución de bis(N-alfa-t-butiloxicarbonil-épsilon-azido-L-lisinil)-cistamina preparada (256 mg, 0,39 mmol) en MeOH (5 ml) se añadió cloruro de acetilo (250 μl , 3,5 mmol). Se agitó la reacción en un matraz equipado con un condensador de refluxo durante 3 h a 70 °C; a continuación, se evaporaron los compuestos volátiles a presión reducida. Se suspendió el producto bruto en agua (15 ml), se lavó con EtOAc (5 ml) y se liofilizó la capa acuosa para dar el compuesto (12) en forma de una espuma incolora.

10 Rendimiento: 174 mg (84 %). ^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ 3,97 (t, $J=6,6$ Hz, 1H, α -CH-NH $_3$), 3,75 (ddd, $J_{gem}=14,1$ Hz, $J_{vic1}=7,4$ Hz, $J_{vic2}=5,5$ Hz, 1H, $-\text{NH-CH}_{2A}$), 3,48 (dt, $J_{vic}=5,8$ Hz 1H, $-\text{NH-CH}_{2B}$), 3,35 (t, $J=6,6$ Hz, 2H, ϵ - $\text{CH}_2\text{-NH}_3$), 2,97-2,81 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-S-}$), 1,95-1,85 (m, 2H, β -CH $_2$), 1,69-1,59 (m, 2H, δ -CH $_2$), 1,55-1,38 (m, 2H, γ -CH $_2$) $m/z = 461,2$ [M+H] $^+$, 483,2 [M+Na] $^+$.

15 Ejemplo 16 - Determinación de la realización de unión de un grupo de modificación de lisina en hialuronano modificado con tiol

20 Como la lisina tiene dos grupos amino, son posibles dos realizaciones de unión alternativas para el acoplamiento de la amida con el carboxilato del hialuronano (es decir, la subestructura según la Fórmula (I) o la Fórmula (II) como se ha descrito anteriormente). La realización de unión se puede determinar mediante RMN de ^1H y ^{13}C , así como mediante técnicas de RMN 2D combinadas (HSQC, HMBC).

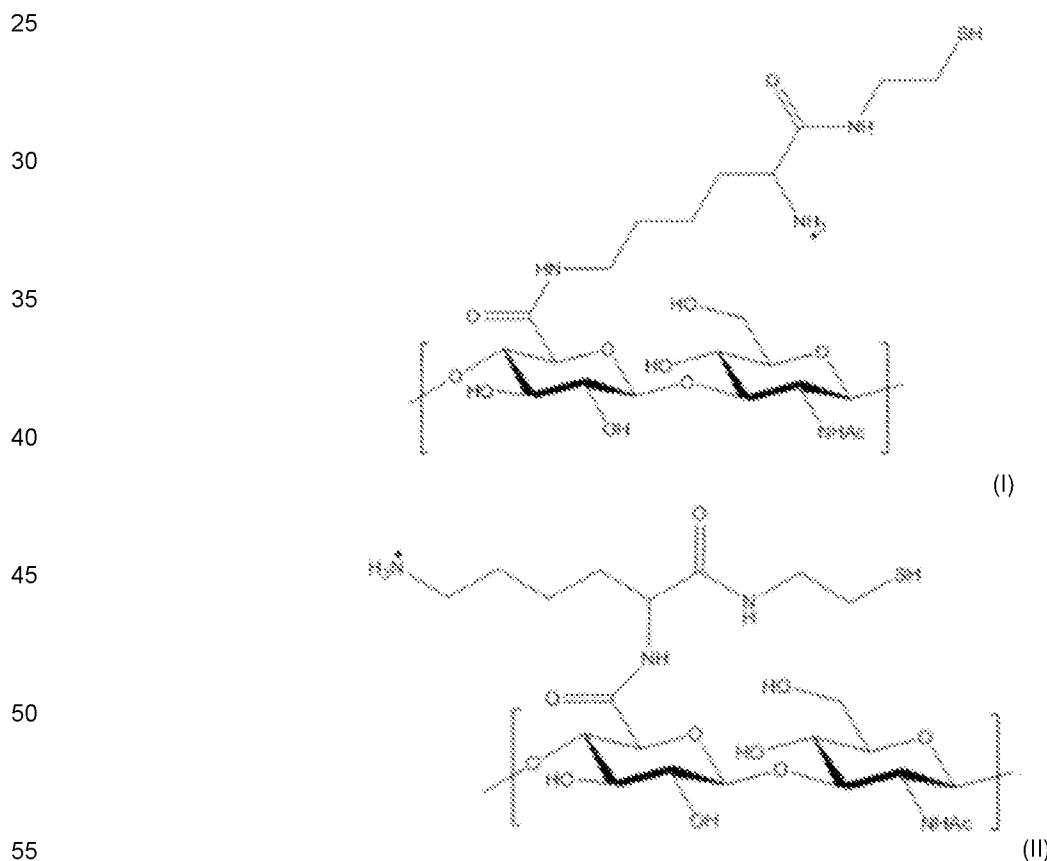
25 Los grupos CH $_2$ adyacentes a los grupos amino alfa o épsilon en los derivados de lisina sintetizados se pueden distinguir claramente por diferentes cambios químicos en los espectros de ^1H -RMN. Si los grupos amino están acilados, la señal de los grupos -CH $_2$ adyacentes se desplaza hacia abajo en el orden de 0,1-0,2 ppm debido al resto acilo aceptor de electrones. En la bis(lisil)-cistamina libre, las señales de los grupos alfa amino se encuentran en $\delta = 3,99$ ppm y las señales de los grupos amino épsilon se encuentran en $\delta = 3,01$ ppm. En un derivado, en donde ambos grupos amino están protegidos por BOC (t-butiloxicarbonilo), estas señales se desplazan a 4,15 ppm y a 3,10 ppm, respectivamente.

30 También se observa un desplazamiento descendente similar para las señales ^{13}C correspondientes (grupo alfa-CH: $\delta = 53,19$ a 54,40 ppm; grupo épsilon-CH $_2$: $\delta = 39,06$ a 40,09 ppm).

35 El espectro HSQC del hialuronano modificado con tiol de la hialuronano-lisil-cisteamina utilizada para la preparación de las composiciones de hidrogel INVENT1, INVENT2 e INVENT4 mostró un pico cruzado $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para el grupo alfa-CH de $\delta = 4,24 /57,45$ ppm, mientras que el grupo épsilon-CH $_2$ se descubrió a $\delta = 3,00 /41,62$ ppm. Se encontró un cambio descendente en el grupo alfa-CH, pero no en el grupo épsilon-CH $_2$. Por lo tanto, los datos de RMN indican que el conector de lisina se unió mediante el grupo alfa-CH al hialuronano y no mediante el grupo épsilon-CH $_2$.

REIVINDICACIONES

1. Hialuronano modificado con tiol, en donde el hialuronano modificado con tiol comprende una pluralidad de grupos de modificación con un grupo tiol en las cadenas laterales del hialuronano, **caracterizado porque** el grupo de modificación comprende un residuo de aminoácido con una cadena lateral básica y un aminotiol de origen natural terminal conjugado, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en cisteamina, cisteína, homocisteína y ésteres de cisteína u homocisteína.
2. Hialuronano modificado con tiol según la reivindicación 1, en donde el grupo de modificación está unido al hialuronano mediante una carboxamida, en donde el grupo acilo de la carboxamida se origina en el grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico del hialuronano y, preferiblemente, el grupo amino de la carboxamida se origina en un grupo amino del residuo de aminoácido.
3. Hialuronano modificado con tiol según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el grupo amino del aminotiol se conjuga con el grupo carboxilo del residuo de aminoácido para formar una carboxamida.
4. Hialuronano modificado con tiol según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el grupo de modificación comprende un residuo de aminoácido derivado del aminoácido lisina y del aminotiol cisteamina, en donde el grupo amino de la cisteamina está conjugado con el grupo carboxilo de la lisina.
5. Hialuronano modificado con tiol según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el hialuronano modificado con tiol tiene una subestructura según la Fórmula (I) o la Fórmula (II) o ambas



6. Hialuronano modificado con tiol según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol de más de aproximadamente 80 µmol por gramo de polímero, preferiblemente más de aproximadamente 105 µmol por gramo de polímero, más preferiblemente más de aproximadamente 120 µmol por gramo de polímero, y el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol de menos de aproximadamente 320 µmol por gramo de polímero, preferiblemente menos de 250 µmol por gramo de polímero.

7. Hialuronano modificado con tiol según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el hialuronano modificado con tiol tiene un peso molecular promedio de al menos 400 kDa, preferiblemente de al menos 500 kDa, más preferiblemente de al menos 600 kDa.
- 5 8. Composición de hidrogel estéril que comprende un polímero reticulado, en donde el polímero reticulado es un producto de oxidación de un hialuronano modificado con tiol según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10 9. Composición según la reivindicación 8, en donde la composición tiene un contenido de tiol residual inferior al 20 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol, preferiblemente inferior al 15 %.
- 15 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en donde el hialuronano modificado con tiol está comprendido en la composición con una concentración de al menos 4 mg/ml hasta un máximo de 50 mg/ml, preferiblemente de al menos 5 mg/ml hasta un máximo de 35 mg/ml, más preferiblemente de al menos 7 mg/ml hasta un máximo de 25 mg/ml, e incluso más preferiblemente como máximo 18 mg/ml.
- 20 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la composición comprende además un agente anestésico local, preferiblemente lidocaína.
- 25 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde la composición comprende además un polímero no modificado seleccionado del grupo de polisacáridos biocompatibles, preferiblemente un hialuronano no modificado.
- 30 13. Uso cosmético de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.
14. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para su uso como medicamento.
15. Composición para uso según la reivindicación 14 o uso cosmético según la reivindicación 13, en donde la composición se aplica como relleno de tejidos blandos.