

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 810**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2019** **PCT/EP2019/065755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2019** **WO19238954**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2019** **E 19731275 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024** **EP 3806919**

54 Título: **Composición de hidrogel que comprende un polímero reticulado**

30 Prioridad:

15.06.2018 EP 18178097
15.06.2018 EP 18178098
15.06.2018 EP 18178099

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PRINZ, MARTIN;
HOLLAUS, RALPH y
SACHSENHOFER, ROBERT

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 983 810 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

Composición de hidrogel que comprende un polímero reticulado

- 5 La presente invención se refiere a una 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, 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 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.

- 25 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.

- 30 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 (hidrogel) 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 (denominado también "agente de reticulación"). Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen formaldehído, divinil sulfona, biscarbodiimidas y epóxidos.

- 35 Para la producción de rellenos dérmicos, el agente reticulante se elige más comúnmente entre epóxidos, tales como el éter diglicídico 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.

- 40 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 (Dc Bouille, 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 Parte A* (103A): 3072-3080).

- 45 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.

- 50 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 Hialuronic 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. Se analizó adicionalmente la cisteamina HA para la administración del fármaco (*Acta Biomater* 8, 3643-3651; 2012). 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 ácido hialurónico que contiene el grupo tiol 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.

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. Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprenda un polímero reticulado con disulfuro, en donde el polímero reticulado con disulfuro es un producto de oxidación de un hialuronano modificado con tiol (HA-SH) que tiene propiedades mejoradas, especialmente con respecto a la aplicación como relleno de tejidos blandos.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona una 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,

en donde el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol superior a aproximadamente 80 μmol por gramo de polímero, preferiblemente superior a aproximadamente 105 μmol por gramo de polímero, más preferiblemente superior a aproximadamente 120 μmol por gramo de polímero,

en donde el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol de menos de aproximadamente 280 μmol por gramo de polímero, preferiblemente menos de aproximadamente 240 μmol por gramo de polímero, más preferiblemente menos de 200 μmol por gramo de polímero,

- 5 en donde la composición tiene un contenido de tiol residual de menos del 20 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol y

10 el hialuronano modificado con tiol tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 400 kDa y está comprendido en la composición con una concentración de al menos aproximadamente 11 mg/ml hasta como máximo aproximadamente 20 mg/ml.

15 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 hidrogel está libre de cualquier agente reticulante bifuncional externo adicional, tal como la divinil sulfona. La composición de hidrogel se caracteriza por comprender un producto de oxidación de un hialuronano modificado con tiol con un grado inicial de modificación entre aproximadamente 80 μmol de grupos tiol por gramo de polímero y aproximadamente 280 μmol de grupos tiol por gramo de polímero.

20 Los inventores descubrieron que el grado de modificación del hialuronano con grupos tiol es una característica importante para influir en el tiempo de residencia *in vivo* del hidrogel estéril. Para dar volumen a los rellenos de tejidos blandos, se desea que el volumen del hidrogel implantado (volumen de depósito) permanezca constante durante un período de tiempo y, por lo tanto, logre un efecto sostenible debido a la lenta degradación. Además, puede desearse 25 que el hidrogel aplicado muestre algún hinchamiento inicial tras la aplicación, es decir, un aumento de volumen debido a la captación de agua en el depósito del relleno.

30 Los estudios que caracterizan las prestaciones *in vivo* de las composiciones de hidrogel estériles se ilustran en los ejemplos 7 a 9, más adelante. 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 del 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 35 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 determinado punto de tiempo tras la 45 aplicación del hidrogel, por ejemplo, medido en la semana 5 (por ejemplo, en el día 30) o, preferiblemente, en la semana 12 (por ejemplo, en el día 81 al 84) y, eventualmente, incluso en la semana 24 (por ejemplo, medido de 165 a 168 días) tras el implante.

50 Preferiblemente, el volumen de depósito de aproximadamente el 100 % (o más) se detecta durante las primeras 12 semanas o 3 meses o durante las primeras 24 semanas o 6 meses tras la aplicación (tiempo de residencia). Las composiciones de hidrogel según la invención mostraron un efecto voluminizador a las 12 semanas (medido entre los días 81 y 84) tras el implante en las condiciones de estudio ilustradas. Así, las composiciones de hidrogel según la invención muestran el rendimiento *in vivo* deseado, prometedor para su aplicabilidad como relleno de tejidos blandos, por ejemplo, en seres humanos. Además, la naturaleza del polímero reticulado proporciona un perfil de seguridad 55 toxicológica favorable y se pueden aplicar volúmenes más altos en comparación con otros rellenos de hialuronano estabilizados (por encima de 50 ml por aplicación).

60 El parámetro más importante que afecta el efecto voluminizador de la composición de hidrogel es el “grado de modificación con grupos tiol”, que 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 diversos ejemplos, los inventores identificaron un intervalo óptimo para el grado de modificación entre aproximadamente 80 μmol por g de polímero y aproximadamente 280 μmol 65 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. De manera sorprendente,

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 de depósito (por ejemplo, $\geq 335 \mu\text{mol}$ por g de polímero como se muestra en el ejemplo 7). Sin pretender imponer ninguna teoría, se supone que los grados más altos de modificación (y, en consecuencia, las tasas más altas de reticulación) dan como resultado una estructura compacta del hidrogel que evita la incorporación de agua y, por lo tanto, impide el efecto de hinchamiento. Por lo tanto, el grado inicial de modificación del hialuronano modificado con tiol con grupos tiol se identificó como un factor fundamental que altera las propiedades de relleno de tejidos blandos de una composición de hidrogel estéril. El efecto voluminizador deseado para el relleno de tejidos blandos solo se obtuvo con composiciones que comprendían hialuronano modificado con tiol reticulado con un grado inicial de modificación en un intervalo estrecho de 80 a 280, preferiblemente de 100 a 240, más preferiblemente de 120 a 200 μmol de grupos tiol por g de polímero.

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, sometiénolo 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.

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. Como se describe en el ejemplo 17, 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 la etapa de oxidación en el método de producción.

En una realización preferida, la composición de hidrogel según la invención tiene un contenido de tiol residual de menos del 15 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol.

Además del grado de modificación, los parámetros que influyen notablemente en las propiedades reológicas e *in vivo* del hidrogel son la concentración del hialuronano modificado con tiol reticulado, así como la distribución del peso molecular de las cadenas de hialuronano.

Se identificó que las concentraciones adecuadas eran de aproximadamente 11 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml.

Por tanto, la composición de hidrogel comprende el producto de oxidación del hialuronano modificado con tiol en una concentración de aproximadamente 11 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 13 mg/ml a aproximadamente 18 mg/ml.

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. Las concentraciones de 9 mg/ml o inferiores no se consideran adecuadas debido al bajo módulo de elasticidad G' observado para dichas composiciones de hidrogel. Dentro del intervalo de aproximadamente 14 mg/ml a aproximadamente 18 mg/ml, por ejemplo, 15 o 17 mg/ml, se observaron buenas propiedades reológicas.

Además, 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 aproximadamente 600 kDa, tal como aproximadamente 700 kDa.

En otra realización, se prefiere que el polímero reticulado tenga un peso molecular medio reducido tras la esterilización superior a aproximadamente 250 kDa, preferiblemente superior a aproximadamente 300 kDa, más preferiblemente superior a aproximadamente 350 kDa, en donde el peso molecular medio reducido tras la esterilización se define como el peso molecular medio de un hialuronano modificado con tiol reducido de dicha composición de hidrogel estéril tras exponer dicho polímero reticulado a condiciones reductoras. El "peso molecular medio reducido tras la esterilización" del polímero reticulado se identificó como un factor fundamental adicional que alteraba el efecto voluminizador del hidrogel tras el implante y que se abreviará como MRPMW en lo sucesivo. El MRPMW se determina como el peso molecular de un hialuronano modificado con tiol reticulado (polímero reticulado) tras una etapa de preparación, en donde el polímero reticulado de la composición de hidrogel se expone a condiciones reductoras. En el hidrogel, el polímero reticulado representa una red compleja, para la que no se puede determinar el peso molecular. Por lo tanto, es necesario reducir el polímero reticulado, es decir, los enlaces disulfuro reticulantes se escinden antes de determinar

el peso molecular. El MRPMW es un valor que se refiere al peso molecular medio de las cadenas poliméricas del polímero reticulado en la composición de hidrogel. El MRPMW se define como el peso molecular medio (MMW) de un hialuronano modificado con tiol reducido a partir de la composición de hidrogel estéril, es decir, el MMW para la fracción de hialuronano modificado con tiol determinada u obtenible a partir de la composición tras la esterilización y la reducción. Normalmente, el MRPMW determinado para un hialuronano modificado con tiol a partir de la composición de hidrogel estéril es inferior cuando se compara con el peso molecular medio (MMW) de la materia prima, es decir, el hialuronano modificado con tiol que se usa para la producción de las composiciones correspondientes (véase la tabla 1). Se supone que la reducción del MRPMW en comparación con el MMW de la materia prima es consecuencia del procedimiento de producción de hidrogel, incluida la esterilización. Por consiguiente, es más adecuado usar el MRPMW del polímero reticulado para caracterizar la composición de hidrogel que usar el MMW de la materia prima.

Sin embargo, los inventores descubrieron que, cuando se usaba un hialuronano modificado con tiol con un peso molecular medio (MMW) de al menos aproximadamente 400 kDa, preferiblemente al menos aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente al menos aproximadamente 600 kDa, tal como aproximadamente 700 kDa, para la producción de composiciones de hidrogel, el MRPMW del polímero reticulado en la composición de hidrogel era de aproximadamente 250 kDa o más. Por ejemplo, los procedimientos de producción descritos en los ejemplos que parten de un hialuronano modificado con tiol de aproximadamente 600 kDa dieron como resultado composiciones de hidrogel con un MRPMW del polímero reticulado en la región más preferible de aproximadamente 350 kDa o más. Viceversa, un MRPMW de aproximadamente 250 kDa o mayor es prueba de que el hialuronano modificado con tiol respectivo tiene un MMW de al menos aproximadamente 400 kDa, aunque la relación cuantitativa depende del procedimiento de producción.

Como se ha indicado, en una composición según la invención, el MRPMW del polímero reticulado es preferiblemente de aproximadamente 250 kDa o más. Los ejemplos con composiciones que comprenden un polímero reticulado con un MRPMW inferior a 250 kDa, por ejemplo, 200 kDa (ID 10), no mostraron el módulo elástico preferido G' y un volumen de depósito relativo medio superior al 100 % durante un período de tiempo suficientemente largo, mientras que un ejemplo de composición que comprende un polímero reticulado con un MRPMW de 300 kDa mostró un volumen de depósito relativo medio superior al 100 % durante 133 días. Una composición que comprendía un polímero reticulado con un MRPMW de 480 kDa mostró un volumen de depósito relativo medio superior al 100 % durante 188 días. En particular, el MRPMW es preferiblemente superior a 300 kDa, más preferiblemente superior a aproximadamente 350 kDa. Según el conocimiento del inventor, el estado de la técnica no dice nada sobre el MRPMW y su papel para alterar el rendimiento *in vivo* de un hidrogel tras su implante en un tejido blando. El MRPMW caracteriza el polímero reticulado, es decir, una red no uniforme, en la composición de hidrogel mediante una medida bastante indirecta. Por lo tanto, no es sorprendente que los resultados muestren normalmente una desviación de ± 10 % o, a veces, incluso mayor. El ejemplo 5 especifica métodos ilustrativos para determinar el MRPMW. Un experto en la materia reconocerá que otros enfoques pueden llegar a valores comparables para este parámetro. Por ejemplo, se puede usar la electroforesis en gel de agarosa para separar diferentes fracciones de MW de hialuronano en un gel de agarosa usando una cámara de gel horizontal y una escala de peso molecular de HA como marcador. A continuación, los geles teñidos se analizan densitométricamente seguido del cálculo de la masa molecular.

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 3.500 kDa o como máximo 2.000 kDa. Por ejemplo, el peso molecular promedio del hialuronano modificado con tiol puede estar en el intervalo de aproximadamente 700 kDa a aproximadamente 2.000 kDa.

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 tiene un grado de modificación con grupos tiol superior a 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

en donde el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol de menos de aproximadamente 280 μmol por gramo de polímero, preferiblemente menos de aproximadamente 240 μmol por gramo de polímero, más preferiblemente menos de 200 μmol por gramo de polímero, y

en donde el hialuronano modificado con tiol tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 400 kDa, 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,

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,

f) obtener una composición de hidrogel estéril en un recipiente que comprende el polímero reticulado del hialuronano modificado con tiol con una concentración de al menos aproximadamente 11 mg/ml hasta como máximo aproximadamente 20 mg/ml.

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.

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 a 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 ascórbico, 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 gases 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 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.

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.

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, suprapariosteal o subcutánea en un ser humano.

Breve descripción de las figuras

Las figuras muestran:

Figura 1: Presentación esquemática de una subestructura de hialuronano-cisteamina como ejemplo de hialuronano modificado con tiol.

Figura 2: Prestaciones *in vivo* de diferentes composiciones de hidrogel como volumen medio de depósito a lo largo del tiempo, en donde el volumen de depósito tras el implante se indica con respecto al volumen inicial en el día 0 (que corresponde al 100 %): composición ID5 (cuadrados sólidos), composición ID4* (cuadrados vacíos), composición ID6* (triángulos sólidos), composición ID10* (círculos sólidos). Las características de las diferentes composiciones se relacionan en las tablas 1 y 2. De las composiciones de hidrogel mostradas en la figura 2, solamente la composición ID5 es una composición de hidrogel según la invención.

Figura 3: Presentación esquemática de otros ejemplos de hialuronanos modificados con tiol, es decir, una subestructura de hialuronano-homocisteína (A), una subestructura de hialuronano-glicil-cisteamina (B) y una subestructura de N-mercaptop-*n*-butilhialuronamida (C) y una subestructura de HA-DGDTPDH (D).

Descripción detallada de la invención

En una realización, la composición de hidrogel estéril según la invención tiene preferiblemente un módulo elástico G' de al menos aproximadamente 900 Pa, preferiblemente al menos aproximadamente 1000 Pa, medido a 25 °C usando una velocidad de cizallamiento de 1 Hz.

En el contexto de los hidrogeles, el módulo elástico 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' .

Varias composiciones de hidrogel según la invención (con el grado de modificación para el hialuronano modificado con tiol y, opcionalmente, la concentración del polímero como se indica) mostraron un módulo elástico G' de > 1.000 Pa. Los hidrogeles con un módulo elástico G' de menos de 900 Pa no mostraron un volumen de depósito relativo medio superior al 100 % durante un período de tiempo suficientemente largo (composición de hidrogel ID10* en el ejemplo 6), mientras que una composición con un módulo elástico de 1385 Pa (que comprende un polímero reticulado con un MRPMW de 480 kDa, composición de hidrogel ID2) mostró un volumen de depósito relativo medio superior al 100 % durante 188 días. Los estudios anteriores con hidrogeles formados por hialuronano modificado con tiol reticulado no se centraron específicamente en las composiciones de hidrogel estériles ni en su idoneidad como relleno de tejidos blandos. Por consiguiente, el estado de la técnica no menciona su módulo elástico G' ni su papel a la hora de alterar las prestaciones *in vivo* de un hidrogel basado en un polímero reticulado con disulfuro tras su implante en un tejido blando. Además, los datos disponibles sobre los rellenos dérmicos comerciales (Stocks y col., 2011) muestran que el módulo elástico de estos productos, que comprenden al menos 20 mg/ml de hialuronano reticulado con BDDE, estaba en el intervalo de aproximadamente 75 Pa a aproximadamente 660 Pa. Aunque se miden en diferentes condiciones de ensayo, estos valores muestran que los hidrogeles de hialuronano reticulado establecidos tienen un módulo elástico G' muy por debajo de 900 Pa o incluso 1000 Pa y, por lo tanto, por debajo de la preferencia de la presente invención.

Las propiedades de la composición de hidrogel según la invención están alteradas de una forma fundamental por el hialuronano modificado con tiol, especialmente por su grado de modificación. 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-acetil-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 descuida el cambio de peso molecular introducido por la modificación. Por consiguiente, el grado de modificación especificado para el hialuronano modificado con tiol en una composición según la invención puede expresarse en un intervalo entre el 3,2 % y el 12,0 %, preferiblemente entre el 4,0 % o el 11,2 % o el 4,8 % y el 10 %.

El "hialuronano modificado con tiol" (HA-SH) es un derivado de un ácido hialurónico (HA) que contiene un grupo tiol. Se caracteriza por el grado de modificación como se ha especificado anteriormente y es accesible a través de enfoques 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 modificaciones del HA con ligandos que llevan grupos tiol: 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. 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'-ditiobis (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 aminoril) 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 B1 describe un ácido hialurónico modificado soluble en agua, que se produce introduciendo 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 aprótico. 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 cistamina 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'-ditiobis(dihidrazida propanoica) (DTP) o 4,4'-ditiobis(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-DGDTPDH, HA-DPDTPDH, HA-DSCDH).

Según la presente invención, el hialuronano modificado con tiol es preferiblemente un conjugado de un agente de modificación unido al hialuronano.

Se prefiere la introducción del agente de modificación mediante la formación de un enlace éster, un enlace amida o un enlace hidrazida entre el grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico del hialuronano y el agente de modificación. El agente de modificación puede comprender grupos tiol en forma de enlaces disulfuro o como grupos tiol protegidos durante el proceso de síntesis.

En una realización preferida, el agente de modificación está unido al grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico en el hialuronano mediante un enlace amida. Por consiguiente, el agente de modificación comprende 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. Por ejemplo, el hialuronano modificado con tiol es un conjugado de hialuronano-cisteamina, en donde la cisteamina se une al hialuronano mediante un enlace amida (véase la figura 1).

Similarmente, se pueden usar otros agentes de modificación que llevan grupos tiol en la síntesis del hialuronano modificado con tiol mediante la formación de enlaces amida entre un grupo amino (grupo amino primario o secundario, preferiblemente grupo amino primario) del agente de modificación y el grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico en el hialuronano.

Se sintetizó un conjugado de hialuronano-homocisteína (figura 3A) mediante la amidación del hialuronato de sodio con tiolactona homocisteína, aprovechando su protección única contra el tiol como tiolactona.

Los grupos tiol libres se liberaron posteriormente adecuadamente mediante hidrólisis alcalina en presencia de un agente reductor para evitar la gelificación no deseada provocada por la formación de disulfuro.

Otros agentes de modificación incluyen, por ejemplo, derivados de cisteamina, cisteína u homocisteína, en donde el extremo N de la cisteamina, cisteína u homocisteína está acoplado con el grupo carboxilo de un aminoácido. Estos derivados se sintetizan preferiblemente mediante la amidación de aminoácidos N-protegidos con cisteamina, cisteína, homocisteína, usando reactivos de acoplamiento peptídico habituales, preferiblemente aquellos que permiten una purificación fácil del producto, por ejemplo, mediante la eliminación de los reactivos y productos secundarios por extracción acuosa al terminar la reacción (véase el ejemplo 12A: Síntesis de agentes de modificación que llevan grupos tiol). Alternativamente, la cisteamina, la cisteína, o la homocisteína se hacen reaccionar con los correspondientes ésteres activos de aminoácidos N-protegidos en disolventes orgánicos, tales como ésteres de succinimido. Un conjugado de hialuronano-glicil-cisteamina (figura 3B) es un ejemplo del hialuronano modificado con tiol, sintetizado según este enfoque.

Se prefiere un bajo peso molecular del agente de modificación para conservar las propiedades fisicoquímicas únicas del hialuronano tanto como sea posible. Los agentes de modificación de bajo peso molecular adecuados para obtener un hialuronano modificado con tiol reticulable, de utilidad para una composición según la invención, se seleccionan preferiblemente además entre el grupo que comprende glutatión, cisteína, aminoalquiltioles que comprenden una cadena de alquilo C₂-C₆ lineal o ramificada, homocisteína, ésteres carboxilatos de homocisteína (por ejemplo, ésteres de alquilo C₂-C₆ homocisteína, preferiblemente etil homocisteína) y ésteres carboxilatos de cisteína (por ejemplo, ésteres de alquilo C₂-C₆ cisteína, preferiblemente etil cisteína).

Pueden introducirse convenientemente enlazadores de aminoalquiltiol mediante las correspondientes diaminas simétricas, que contienen un enlace disulfuro como una especie de grupo protector inherente, aprovechando la síntesis de amidas con hialuronano. A su vez, se puede acceder a los disulfuros partiendo de aminoalcoholes N-protegidos: Tras introducir un resto de tioéster, por ejemplo siguiendo el protocolo de Mitsunobu, la saponificación del tioéster en condiciones oxidativas proporciona los compuestos diana deseados (por ejemplo, el ejemplo 12C). Una N-mercapto-N-butilhialuronamida (figura 3C) es un ejemplo de hialuronano modificado con tiol sintetizado mediante este enfoque.

En otra realización preferida, el agente de modificación está unido al grupo carboxilo del resto de ácido glucurónico en el hialuronano mediante un enlace hidrazida. Por consiguiente, el agente de modificación comprende al menos un grupo hidrazida que puede 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. Por ejemplo, el hialuronano modificado con tiol es un conjugado de hidrazida y ácido hialuronan-3-mercapto-propiónico (HA-DTPH) o un conjugado de hidrazida y ácido hialuronan-2-mercapto-etil-carbonil-aminoacético (HA-DGDTDPH); véase el ejemplo 12B, figura 3D).

El término “estéril”, tal como se usa en el presente documento, 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 convencionales, 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 el presente documento, 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.

Sin embargo, en una realización preferida, el hidrogel tiene un módulo elástico G' de al menos aproximadamente 900 Pa, preferiblemente al menos de aproximadamente 1000 Pa, medido a 25 °C usando un reómetro con una velocidad de cizallamiento de 1 Hz. El módulo elástico G' del hidrogel está directamente alterado por los siguientes factores

- grado de reticulación (que se define por el grado crítico de modificación, es decir, una característica según la presente invención),
- la concentración del polímero reticulado, y
- el MRPMW (que depende del peso molecular medio del hialuronano modificado con tiol).

La sección ilustrativa proporciona varias composiciones que guían al experto en la materia a variar estos factores para obtener el módulo elástico G' deseado de al menos aproximadamente 1000 Pa. Se entiende que una concentración baja podría compensarse con un peso molecular más alto y viceversa. Sin embargo, las preferencias por la concentración del polímero reticulado y el MPRMW proporcionan una directriz clara sobre cómo el experto en la materia puede obtener un hidrogel con el módulo elástico preferido de al menos aproximadamente 1000 Pa. El módulo elástico G' representa un parámetro valioso para caracterizar los hidrogeles según la invención que puede verificarse basándose en el hidrogel final sin esfuerzos técnicos elaborados.

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 añade comúnmente como lubricante a los rellenos de tejidos blandos para garantizar una fácil 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 hidroxiapatita de calcio), partículas poliméricas, polímeros (tales como polietilenglicol, glucosaminoglicanos, lubricinas, polisacáridos y sus derivados), proteínas (tales como elastina, colágeno, queratina, fibroína de seda), agentes anticelulíticos, agentes anticicatrizantes, 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 antivíricos, agentes antiinfecciosos, agentes antisépticos, agentes quimioterapéuticos, agentes citostáticos, agentes antialérgicos, agentes antivariocósicos, 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 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.

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 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 y ratones. Estos estudios respaldan que el hidrogel es un valioso relleno de tejidos blandos para diversas aplicaciones.

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.

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

- aplicación en el tejido de la vulva y la vagina con fines de rejuvenecimiento genital femenino no quirúrgicos
- aplicación en la dermis, aplicación subdérmica o supraparietal.

A modo de ejemplo, la composición de hidrogel se puede usar (en un método) con fines cosméticos, por ejemplo, para rellenar 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).

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 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,
- 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
- deterioro de las cuerdas vocales,
- 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.

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'-ditiopiridina (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 hidrogel 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

Método A

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

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

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

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.

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).

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

Método C

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.

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).

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 presanan 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 D

5 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 un agente de oxidación y oxígeno.

10 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).

15 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 presan 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

20 Método E

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).

25 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.

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).

30 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 presan a través de una placa de filtro con un tamaño de malla definido (una o varias veces).

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

Método F

40 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.

45 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).

50 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 presan 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

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

60 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.

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).

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

Método H

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

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.

10 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.

15 Método I

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

20 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.

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

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.

30 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.

35 Método J

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.

40 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.

45 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).

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 presanan 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 K

55 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 un agente de oxidación y oxígeno.

60 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).

65 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 presanan 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'

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 27G (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

Para las mediciones se utilizó un sistema SEC multidetector Viscotek TDAmx 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.

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

Las muestras para la determinación del peso molecular medio reducido tras la esterilización (MRPMW) se prepararon dispersando aproximadamente 200 mg de la composición de hidrogel estéril investigada en 1,8 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) e incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. El hialuronano modificado con tiol reticulado se separó del hialuronano libre mediante centrifugación. El precipitado se volvió a dispersar en PBS. Tras repetidas etapas de extracción/centrifugación, el gel residual se trató con un agente reductor (TCEP.HCl (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina)) durante 3 horas para escindir los puentes disulfuro, seguido de la acidificación de la solución resultante con HCl 5 N (reducción). El hialuronano modificado con tiol reducido se precipitó con etanol y se recuperó mediante centrifugación (un hialuronano modificado con tiol de la composición de hidrogel estéril). El precipitado se disolvió en 4 ml de una solución acuosa que contenía un agente de protección para los restos de tiol libres (ácido 2-(2-aminoetildisulfanil)piridin-3-carboxílico) en una concentración de 2 mg/ml. Tras 3 h de incubación a temperatura ambiente, la muestra se diluyó adicionalmente con PBS.

Alternativamente, se determinó el MRPMW del polímero reticulado mediante un método de sustracción. Ambos enfoques dan como resultado valores similares. Tras la esterilización de una composición de hidrogel que comprendía polímero reticulado y hialuronano libre, se añadió un agente reductor al hidrogel para escindir cuantitativamente los enlaces disulfuro. Se determinó simultáneamente a continuación la distribución de MW del hialuronano modificado con tiol en su forma reducida y del hialuronano libre ($M_w(\text{total})$). Además, se determinó el MW del hialuronano libre: Se dispersaron 200 mg de la composición de hidrogel estéril investigada en 1,8 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se usó el sobrenadante para el análisis SEC del MW del hialuronano libre ($M_w(\text{HA})$).

Al determinar el peso molecular del hialuronano libre ($M_w(\text{HA})$) y el peso molecular combinado del hialuronano libre y el hialuronano modificado con tiol reducido ($M_w(\text{total})$), el MRPMW (aquí $M_w(\text{HA-SH})$) se puede calcular según la ecuación (I), en donde C_{HA} y $C_{\text{HA-SH}}$ representan la fracción de hialuronano libre y de hialuronano modificado con tiol reducido, respectivamente:

$$M_w(\text{HA-SH}) = \frac{M_w(\text{total}) - M_w(\text{HA}) \frac{C_{\text{HA}}}{C_{\text{HA}} + C_{\text{HA-SH}}}}{\frac{C_{\text{HA-SH}}}{C_{\text{HA}} + C_{\text{HA-SH}}}} \quad (I)$$

En la tabla 1 se muestran los resultados comparativos con el correspondiente peso molecular medio (MMW) de la materia prima de HA-SH usada para la producción de hidrogel. Normalmente, el MRPMW es inferior al MMW. La producción de la composición de hidrogel influye en la distribución del peso molecular.

Ejemplo 6 - Formulación de composiciones

En la tabla 1 se relacionan varias composiciones de hidrogel estériles, en donde la principal diferencia entre las composiciones radica en las características del polímero reticulado, que es un producto de oxidación del hialuronano modificado con tiol (HA-cisteamina). Los hidrogeles que comprendían 17 mg/ml de cisteamina HA reticulada, 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado y 3 mg/ml de HCl de lidocaína se produjeron por un método similar (se puede comparar con los métodos B y H anteriores). Se determinaron el MMW y el grado de modificación (DoM) como propiedades de la materia prima de hialuronano modificado con tiol (HA-SH), así como el MRPMW, el módulo elástico G' y el contenido de tiol residual como propiedades del polímero reticulado como se ha descrito anteriormente.

Tabla 1: Lista de 10 composiciones de hidrogel estériles, cada una de las cuales comprende un polímero reticulado diferente

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]		MRPMW de HA-SH oxidado [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]	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	Media	Media	S.D.
1*	576	24	430	28	48	0,26	663.438	20.446
2	628	8	480	10	119	0,88	1.384.803	25.982
3*	547	5	520	42	335	5,92	2.172.653	185.608
4*	1201	15	610	16	43	0,32	714.068	41.655
5	1335	18	710	70	130	1,06	1.543.920	59.579
6*	957	13	560	19	350	4,4	2.408.693	117.637
7*	1614	15	1000	40	51	0,50	1.126.583	41.929
8	1625	25	937	92	141	1,48	2.045.747	163.765
9*	1177	25	680	5	367	3,99	2.224.367	13.824
10*	277	12	200	20	150	0	896.276	n.d.

Un asterisco (*) indica aquellos ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones, pero que se incluyen con fines comparativos. S.D. es abreviatura de la desviación estándar.

Se controló la formación de enlaces disulfuro midiendo el contenido de tiol residual de los polímeros reticulados y comparándolo con el grado inicial de modificación de las materias primas de polímero de hialuronano modificado con tiol. Se descubrió que en las 10 composiciones más del 98 % de los grupos tiol del polímero disponibles inicialmente se oxidaron durante la producción.

Tanto el MRPMW del polímero reticulado como el grado inicial de modificación con los grupos tiol de la materia prima de hialuronano modificado con tiol alteraron las propiedades de elasticidad de los hidrogeles con la misma concentración de hialuronano reticulado. El uso de polímeros de hialuronano modificados con tiol con un mayor grado de modificación para la producción de las composiciones de hidrogel dio como resultado velocidades de reticulación más altas, como lo demuestra claramente el aumento de las propiedades de elasticidad de los hidrogeles. Cuando se comparan las composiciones de hidrogel preparadas con hialuronano modificado con tiol con un grado medio de modificación con grupos tiol en el intervalo de 119 μmol a 150 μmol por gramo de polímero (composiciones de hidrogel ID2, ID5, ID8 e ID10*), la influencia del MRPMW sobre las propiedades de elasticidad de los hidrogeles es claramente evidente. El módulo elástico de las composiciones de hidrogel ID2, ID5 e ID8 estaba por encima de 1000 Pa. Se observó el mismo efecto al comparar las composiciones de hidrogel preparadas con hialuronano modificado con tiol con un bajo grado de modificación (composiciones de hidrogel ID1*, ID4* e ID7*). Para las composiciones de hidrogel preparadas con hialuronano modificado con tiol con un alto grado de modificación (composiciones de hidrogel ID3*, ID6* e ID9*), la influencia del MRPMW del polímero sobre las propiedades de elasticidad fue menos pronunciada.

Ejemplo 7 - Caracterización *in vivo* de composiciones de hidrogel implantadas

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 tras el implante mediante inyección. Se probaron diez composiciones diferentes de hidrogeles resumidas en la tabla 1.

Las composiciones se inyectaron por vía intradérmica en la piel del lomo de ratas Sprague Dawley hembra utilizando 16 animales de ensayo con un promedio de 12 aplicaciones por composición. Se aplicaron ocho depósitos por rata. Se inyectaron 50 μE de la composición respectiva por depósito utilizando una aguja de 25G y el volumen de los depósitos generados se monitorizó mediante IRM (dispositivo de MRT Siemens Espree 1.5 T) en distintos puntos temporales durante un período de tiempo total de 188 días.

Se calcularon los volúmenes de depósito de hidrogel individuales (mm^3) 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 (%). La figura 2 muestra el desarrollo del volumen de depósito para cuatro composiciones ilustrativas. Los volúmenes relativos medios de depósito en el día 84 y el día 188 de las diferentes composiciones se relacionan en la tabla 2 para las 10 composiciones.

Tabla 2: Volumen relativo medio de depósito medido el día 84 y el día 188 en porcentaje.

ID	Volumen relativo medio de depósito [%] en el día 84	Volumen relativo medio de depósito [%] en el día 188
1*	0,0	0,0

ID	Volumen relativo medio de depósito [%] en el día 84	Volumen relativo medio de depósito [%] en el día 188
2	151,5	110,3
3*	51,9	48,1
4*	5,0	0,0
5	184,7	160,9
6*	37,2	24,8
7*	41,4	18,0
8	165,9	136,1
9*	51,5	37,6
10*	65,9	37,3
Un asterisco (*) indica aquellos ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones, pero que se incluyen con fines comparativos.		

Con la excepción de dos composiciones que comprendían hialuronano modificado con tiol reticulado con un grado inicial de modificación inferior a 50 μmol de grupos tiol por gramo de polímero (composiciones de hidrogel ID1* e ID4*), todos los depósitos de hidrogel se detectaron al menos durante 6 meses. Sin embargo, solo tres composiciones que comprendían un hialuronano modificado con tiol reticulado con un grado medio de modificación con tiol (composiciones de hidrogel ID2, ID5 e ID8) y un módulo elástico de más de 1000 Pa (un MPRMW de más de 200 kDa) mostraron un efecto voluminizador durante los 6 meses de duración del estudio. Los volúmenes de depósito de todas las demás composiciones se redujeron en un 50 % y más durante este período de tiempo.

Ejemplo 8 - Formulación y caracterización de las composiciones de hidrogel ID11 a ID15 que comprenden un hialuronano modificado con tiol reticulado con un DoM de 151 μmol por g de polímero

Se produjo una composición de hidrogel estéril que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de HA-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de HCl de lidocaína y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método G. En resumen, 3580 mg de sal sódica de HA-cisteamina (peso seco, MMW 730 kDa, grado de modificación de 151 $\mu\text{mol/g}$ de polímero), 600 mg de HCl de lidocaína (peso seco) y 1160 mg de NaCl se disolvieron en 185 g de agua para inyección con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. A continuación, se añadieron 1000 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MW 2400 kDa) a la solución con agitación continua a temperatura ambiente durante aproximadamente otras 3 horas. A continuación, se añadió un tampón fosfato a pH 11 a una cantidad final de 200 g de composición. La solución se homogeneizó durante aproximadamente 15 min. Tras la incubación durante una noche a temperatura ambiente, el hidrogel ahora reticulado se presionó a través de una placa de filtro con un tamaño de malla de 200 μm . A continuación se introdujo el hidrogel en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó en autoclave (121 °C/15 min). Se determinó el módulo elástico de forma análoga al ejemplo 4. El hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin colocar la aguja) y se determinó que G' era de 1619 ± 143 Pa. El hidrogel estéril tenía un pH de 7,34 y una osmolalidad de 337 mOsmol/kg (hidrogel ID11).

Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MRPMW, y el contenido de tiol residual como se ha descrito anteriormente y se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	MRPMW de HA- SH oxidado [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]	Método de producción	pH
	Media	Media	Media	Media	Media (S.D.)		
11	730	406	151	17	1.619.000 (143.000)	A (tamizado)	7,34
12	730	528	151	2	1.965.900	A (sin tamizar)	7,66
13	730	595	151	n.d.	1.536.200	B (sin tamizar)	7,08
14	730	n.d.	151	n.d.	1.713.567	A (tamizado)	7,70
15	730	430	151	12	1.532.167	E (tamizado)	7,39
La abreviatura S.D. significa desviación estándar.							

El mismo hialuronano modificado con tiol (MMW 730 kDa, grado de modificación 151 $\mu\text{mol/g}$ de polímero) se usó para producir cuatro composiciones de hidrogel estériles que comprendían 17,9 mg/ml de sal sódica de HA-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de HCl de lidocaína y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método A (sin

tamizado), el método A (con tamizado), el método B (sin tamizado) y el método E (con tamizado), respectivamente, como se describe en el ejemplo 4.

Todas las composiciones tenían una osmolalidad en el intervalo de 270 a 330 mOsmol/kg y un pH fisiológicamente aceptable (véase la tabla 4). Se determinaron el módulo elástico G' de las composiciones (determinado tras la inyección mediante una aguja 27G), el MRPMW y el contenido de tiol residual del polímero reticulado en el hidrogel como se ha descrito anteriormente. No se determinaron el contenido de grupos tiol residuales ni el MRPMW del polímero reticulado en la composición ID14. Las composiciones ID12 e ID14 se produjeron a partir del mismo lote de hidrogel, siendo la única diferencia la etapa de tamizado. Dado que no se espera que el tamizado altere el MRPMW y el contenido de tiol residual del polímero reticulado, se pueden suponer valores idénticos a los obtenidos con la composición ID12 para la composición ID14. En la tabla 4 se enumeran los resultados.

Estas composiciones se probaron *in vivo* de manera similar a la configuración de prueba descrita en el ejemplo 7 con 12 aplicaciones intradérmicas por composición. Todas las composiciones tuvieron un efecto voluminizador durante los primeros 142 días del estudio (datos no mostrados), como lo demuestra un volumen de depósito relativo medio del 100 % o más medido en este punto temporal y en todos los puntos temporales anteriores (día 28, día 61, día 84, día 114). Tras 168 días de duración del estudio, se midió un volumen de depósito relativo medio de las composiciones ID 14 e ID 15 inferior al 100 %. Después de un cierto tiempo, es de esperar una reducción del volumen de depósito, ya que las composiciones son biodegradables. En la tabla 4 se muestra una comparación del volumen medio relativo del depósito en el día 84 y en el día 168.

Tabla 4: Volumen medio de depósito relativo medido el día 84 y el día 168 en porcentaje.

ID	Volumen relativo medio de depósito [%] en el día 84		Volumen medio de depósito relativo [%] en el día 168	
	media	S.D.	media	S.D.
12	130,15	48,48	111,29	46,47
13	140,74	42,90	126,01	54,22
14	121,51	21,89	95,64	23,67
15	112,14	24,48	95,81	26,23

La abreviatura S.D. significa desviación estándar.

Ejemplo 9 - Formulación y caracterización de una composición de hidrogel ID16 que comprende un hialuronano modificado con tiol reticulado con un DoM de 176 μ mol de grupos tiol por g de polímero

Se usó un hialuronano modificado con tiol con un grado de modificación de 176 μ mol de grupos tiol por g de polímero (MMW 750 kDa) para producir una composición de hidrogel estéril que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de HA-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de HCl de lidocaína y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado. La composición de hidrogel ID16 se produjo según el método A con una etapa de tamizado. El peso molecular medio reducido tras la esterilización (MRPMW) del polímero reticulado en la composición fue de 408 kDa. Se determinó el módulo elástico de forma análoga al ejemplo 6. El hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin colocar la aguja) y se determinó que G' era de 2.052.100 mPa. El hidrogel estéril tenía un pH de 7,17 y una osmolalidad de 316 mOsmol/kg.

Se probó la composición *in vivo* de manera similar a la configuración de prueba descrita anteriormente en el ejemplo 7 con 12 aplicaciones intradérmicas. La composición tuvo un efecto voluminizador durante 81 días de la duración del estudio (datos no mostrados), como lo demuestra un volumen de depósito relativo medio del 100 % o más medido en este punto temporal y en todos los puntos temporales anteriores (día 23, día 53).

Ejemplo 10 - Formulación y caracterización de una composición de hidrogel ID17 que comprende un hialuronano modificado con tiol con un MRPMW de 300 kDa

Se usó un hialuronano modificado con tiol con un grado de modificación de 142 μ mol de grupos tiol por g de polímero (MMW 710 kDa) para producir una composición de hidrogel estéril que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de HA-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de HCl de lidocaína y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado. La composición de hidrogel ID17 se produjo según el método A con una etapa de tamizado. El peso molecular medio reducido tras la esterilización (MRPMW) del polímero reticulado en la composición fue de 300 kDa. Se determinó el módulo elástico de forma análoga al ejemplo 4. El hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin colocar la aguja) y se determinó que G' era de 1.243.500 mPa. El hidrogel estéril tenía un pH de 7,65 y una osmolalidad de 287 mOsmol/kg. Se probó la composición *in vivo* de manera similar a la configuración de prueba descrita anteriormente en el ejemplo 7 con 12 aplicaciones intradérmicas. La composición tuvo un efecto voluminizador durante 133 días de la duración del estudio (datos no mostrados), como lo demuestra un volumen de depósito relativo medio del 100 % o más medido en este punto temporal y en todos los puntos temporales anteriores (día 23, día 53, día 81, día 107).

Ejemplo 11: Formulación y caracterización de una composición de hidrogel estéril ID18

Se produjo una composición de hidrogel estéril (ID18) que comprendía 14 mg/ml de HA-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de HCl de lidocaína y 7 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método B. En resumen, 2100 mg de HA-cisteamina (peso seco, MMW 700 kDa, grado de modificación 131 $\mu\text{mol/g}$ de polímero), 450 mg de HCl de lidocaína (peso seco) y 1050 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW (2238 kDa) se disolvieron en 130 g de tampón de fosfato 10 mM, pH 7,1 (que comprendía NaCl 88 mM) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 17 horas. Tras ajustar el pH a aproximadamente pH 7,1 con una solución de hidróxido de sodio 1 M, se añadió un tampón fosfato 10 mM a pH 7,1 (que comprendía NaCl 88 mM) en una cantidad final de 150 g de la composición. La solución se homogeneizó durante aproximadamente 60 min. A continuación, se añadieron 1,6 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 0,307 % (v/v). Tras la incubación durante una noche a temperatura ambiente, el hidrogel reticulado se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El hidrogel estéril tenía un pH de aproximadamente 7 y una osmolalidad de aproximadamente 270 mOsm/kg.

Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MMW, el MRPMW y el módulo elástico G' como se ha descrito anteriormente y se resumen en la tabla 5. Para la determinación del módulo elástico G' , el hidrogel se aplicó al reómetro directamente desde la jeringa (sin necesidad de colocar la aguja)

Tabla 5: Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	MRPMW de HA-SH oxidado [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [$\mu\text{mol/g}$]	Módulo de elasticidad G' [mPa]
	Media	Media	Media	Media
18	700	618	131	1.162.567

Ejemplo 12 - Síntesis de agentes de modificación que contienen grupos tiol

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

A una mezcla de diclorhidrato de cistamina (1 g, 4,44 mmol) y *N*-(terc-butoxicarbonil)glicina (1,59 g, 9,10 mmol) en diclorometano seco: THF = 1:1 (20 ml) se añadió primero trietilamina (1270 μl , 9,16 mmol), seguido de la adición de una solución de EDC $\cdot$ HCl (1,75 g, 9,10 mmol) en diclorometano. La solución de reacción se agitó durante 5 h a temperatura ambiente, a continuación se evaporaron los compuestos volátiles a presión reducida. El residuo se capturó en acetato de etilo (250 ml) y se lavó con HCl 1 N (2 x 50 ml), NaHCO₃ semisaturado (50 ml) y agua (50 ml). Se secó la capa orgánica con Na₂SO₄, se evaporaron los compuestos volátiles a presión reducida para dar la *bis*(glicil)-cistamina protegida con N Boc en forma de un aceite incoloro. Rendimiento: 1,575 g (88 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,97 (s, 1H, NH), 5,53 (s, 1H, NH), 3,81 (d, $J=5,8$ Hz, 2H, α -CH₂), 3,58 (ac, $J=6,3$ Hz, 2H, -CH₂-NH-), 2,82 (t, 2H, -CH₂-S-), 1,45 (s, 9H, -CH₃ *t*-Bu); m/z = 467,1 [M+H]⁺, 489,1 [M+Na]⁺.

A una solución de la *bis*(glicil)-cistamina protegida con *N*-Boc (300 mg, 0,64 mmol) en MeOH (5 ml) se añadió cloruro de acetilo (300 μl , 4,20 mmol). Una vez cesada la reacción exotérmica, la mezcla se agitó en un matraz sellado durante 5 h a temperatura ambiente, a continuación se añadió tolueno (2 ml) y se evaporaron los compuestos volátiles hasta que el producto precipitó. El sólido de color blanco se aisló mediante filtración por succión y se lavó con *n*-pentano (2 x 5 ml). Rendimiento: 146 mg (67 %). p.f. = 184 °C (descomposición); RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 3,81 (s, 2H, α -CH₂), 3,59 (at, $J=6,3$ Hz, 2H, -CH₂-NH), 2,88 (at, 2H, -CH₂-S-); m/z = 266,9 [M+H]⁺, 288,9 [M+Na]⁺.

Este agente de modificación permite la preparación de un conjugado de hialuronano-glicil-cisteamina (figura 3B).

B. Preparación de dihidrazida del ácido ditiodietanodiildicarbonildiaminodiacético (DGDTPDH):

A una mezcla de ácido 3,3'-ditiodipropiónico (2 g, 9,5 mmol) y clorhidrato de éster etílico de glicina (2,66 g, 19,0 mmol) en diclorometano seco: THF = 1:1 (20 ml) se añadió trietilamina (2,78 μl , 20,0 mmol), seguido de la adición de una solución de EDC $\cdot$ HCl (3,83 g, 20,0 mmol) en diclorometano. La reacción se agitó durante 5 h a temperatura ambiente, a continuación se diluyó con acetato de etilo (400 ml). Se lavó la capa orgánica con HCl 1 N (2 x 50 ml), NaHCO₃ semisaturado (50 ml) y agua (50 ml), a continuación se secó con Na₂SO₄ y se evaporaron los compuestos volátiles a presión reducida para dar el dietiléster del ácido ditiodietanodiildicarbonildiamino diacético como un sólido de color blanco. Rendimiento: 1,69 g (47 %); p.f. = 121 °C; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,50 (s, 1H, NH), 4,21 (q, $J=7,1$ Hz, 2H, -O-CH₂-), 4,04 (d, $J=5,3$ Hz, 2H, α -CH₂-N), 2,99 (t, $J=7,0$ Hz, 2H, -CH₂-S-), 2,67 (t, 2H, α -CH₂-CH₂-), 1,28 (t, 3H, -CH₃); m/z = 381,0 [M+H]⁺, 403,0 [M+Na]⁺.

Una mezcla de éster dietílico (500 mg, 1,32 mmol) y una solución acuosa de hidrato de hidrazina al 80 % (0,5 ml, 12,7 mmol) en EtOH al 96 % se calentó a reflujo durante 5 h. El producto cristalizó al enfriarse a temperatura ambiente y se recogió mediante filtración por succión y se lavó minuciosamente con EtOH frío (2 x 15 ml). Rendimiento: 335 mg (72 %), agujas blancas. p.f. = 197 °C (descomposición) RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,02 (s, 1 H, -NH), 8,20 (t,

$J=5,7$ Hz, 1 H, -NH), 4,19 (s, 2H, -NH₂), 3,64 (d, $J=5,8$ Hz, 2H, α -CH₂-N), 2,87 (t, $J=7,2$ Hz, 2H, -CH₂-S-), 2,53 (t, 2H, α -CH₂-CH₂-); m/z = 353,1 [M+H]⁺, 375,1 [M+Na]⁺.

Este agente de modificación permite la preparación de un conjugado de hidrazida de ácido hialuronano-2-mercapto-etil-carbonilaminoacético (figura 3D).

C. Preparación de diclorhidrato de 4,4'-ditiobis[1-butanamina]

Se preparó el diclorhidrato de 4,4'-ditiobis[1-butanamina] a partir del 4-aminobutan-1-ol siguiendo los protocolos descritos en la bibliografía (Aufort, M. y col., ChemBioChem, 12(4), 583-592, 2011), se adoptó la desprotección final con N-Boc y se llevó a cabo con MeOH/HCl para obtener el producto en forma de sal de diclorhidrato: A una solución de dicarbamato (550 mg, 1,35 mmol) en metanol (6 ml) se añadió cloruro de acetilo (0,6 ml, 8,4 mmol) gota a gota. Cuando cesó la reacción exotérmica, la mezcla se calentó a reflujo durante 5 h. A continuación se añadió tolueno (6 ml) y se concentró la mezcla a presión reducida. Se destiló azeotrópicamente el producto bruto de manera repetida con tolueno (6 ml), a continuación se aisló mediante filtración por succión y se lavó con n-pentano (2 x 6 ml). Rendimiento: 340 mg (90 %), sólido de color blanco. p.f. = 249 °C (descomposición); RMN ¹H (400 MHz, D₂O+DSS) δ 3,02 (t, $J=7,1$ Hz, 4H, CH₂-N), 2,78 (t, $J=6,7$ Hz, 4H, -CH₂-S-), 1,83-1,71 (m, 8H, C-CH₂-CH₂-C); m/z = 209,0 [M+H]⁺.

Este agente de modificación permite la preparación de una N-mercapto-*n*-butilhialuronamida (figura 3C).

Ejemplo 13 - Formulación y caracterización de una composición de hidrogel que comprende hialuronano-glicil-cisteamina reticulado

Se produjo una composición de hidrogel (ID19) que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de hialuronano-glicil-cisteamina reticulada (HA-GLYC) y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método B sin la adición de HCl de lidocaína. En resumen, se disolvieron 537 mg de HA-GLYC (peso seco, MMW 610 kDa, grado de modificación 162 μ mol/g de polímero, figura 3B) y 150 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW 2,4 MDa) en 26 g de HCl 0,01 M (que comprendía NaCl) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 horas. A 19,02 g de esta solución, se añadieron 2,115 ml de tampón fosfato 100 mM, pH 11,85, lo que dio como resultado un ajuste del pH a aproximadamente un pH de 7,4. A continuación, se añadieron 273 μ l de una solución de H₂O₂ al 0,3 % y la mezcla se homogeneizó durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se dejó una noche para que se reticulara. El hidrogel reticulado se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El hidrogel estéril tenía un pH de aproximadamente 7,2.

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 6. 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 6: Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [μ mol/g]	Contenido de tiol residual [μ mol/g]	Módulo de elasticidad G' [mPa]
	Media	Media	Media	Media
19	610	162	0	1.260.467

Ejemplo 14 - Formulación y caracterización de una composición de hidrogel estéril que comprende hialuronano-homocisteína reticulada

Se produjo una composición de hidrogel (ID20) que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de hialuronano-homocisteína reticulada (HA-HCYS) y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método A sin la adición de HCl de lidocaína. En resumen, se disolvieron 537 mg de HA-HCYS (figura 3A, peso seco, MMW 610 kDa, grado de modificación 136 μ mol/g de polímero, figura 3A) y 150 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW 2,4 MDa) en 26 g de HCl 0,01 M (que comprendía NaCl) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 horas seguido por 1 hora de tiempo de reposo restante para eliminar las burbujas de aire. A 23,68 g de la solución se añadieron 2,63 ml de tampón de fosfato 100 mM a pH 12,04, lo que dio como resultado un ajuste del pH de la solución a aproximadamente un pH de 7,2. Se mantuvo la mezcla durante 48 h a temperatura ambiente para su reticulación, a continuación, el hidrogel reticulado se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El hidrogel estéril tenía un pH de aproximadamente 7,0.

Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MMW, el contenido de tiol residual y el módulo elástico G' como se ha descrito anteriormente y se resumen en la tabla 7. 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 7: Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [μmol/g]	Contenido de tiol residual [μmol/g]	Módulo de elasticidad G' [mPa]
	Media	Media	Media	Media
20	610	136	0	1.759.900

Ejemplo 15 - Formulación y caracterización de una composición de hidrogel estéril que comprende hidrazida reticulada del ácido hialuronano-2-mercapto-etil-carbonil-aminoacético

Se produjo una composición de hidrogel estéril (ID21) que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de hidrazida reticulada del ácido hialuronano-2-mercapto-etil-carbonil-aminoacético (HA-DGDTPDH) y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método B sin adición de HCl de lidocaína. En resumen, 537 mg de HA-DGDTPDH (figura 3 D, peso seco, MMW 770 kDa, grado de modificación 134 μmol/g de polímero) y 150 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW 2,4 MDa) se disolvieron en 26 g de HCl 0,01 M (que comprendía 192 mg de NaCl) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 h. A 20,20 g de esta solución, se añadieron 2,25 ml de tampón fosfato 100 mM, pH 12,07, que contenían 0,041 % de H₂O₂, lo que dio como resultado un ajuste del pH de la solución a aproximadamente un pH de 7,0. La mezcla se mantuvo durante 18 h a temperatura ambiente para la reticulación. El hidrogel reticulado se introdujo a continuación en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El hidrogel estéril tenía un pH de aproximadamente 7,0 y una osmolalidad de 326 mOsmol/kg.

Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MMW, el contenido de tiol residual y el módulo elástico G' como se ha descrito anteriormente y se resumen en la tabla 8. 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 8: Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [μmol/g]	Contenido de tiol residual [μmol/g]	Módulo de elasticidad G' [mPa]
	Media	Media	Media	Media
21	770	134	0	698.860

Ejemplo 16 - Formulación y caracterización de una composición de hidrogel que comprende *N*-mercapto-*n*-butilhialuronamida reticulada

Se produjo una composición de hidrogel estéril (ID22) que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de *N*-mercapto-*n*-butilhialuronamida reticulada y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado según el método B sin adición de HCl de lidocaína. En resumen, se disolvieron 537 mg de la sal sódica *N*-mercapto-*n*-butilhialuronamida (figura 3 C, peso seco, MMW 767 kDa, grado de modificación 98 μmol/g de polímero) y 150 mg de hialuronato de sodio (peso seco, MMW 2,4 MDa) en 26 g de HCl 0,01 M (que comprendía NaCl) con agitación mecánica a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 horas. A 23,48 g de esta solución, se añadieron 2,609 ml de tampón fosfato 100 mM, pH 11,81, que contenía 0,029 % de H₂O₂ lo que dio como resultado un ajuste del pH a aproximadamente un pH de 7,1. La mezcla se homogeneizó durante 15 min a temperatura ambiente y a continuación se dejó durante una noche para completar la reticulación. El hidrogel reticulado se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml y se esterilizó mediante autoclave. El hidrogel estéril tenía un pH de aproximadamente 7,0 y una osmolalidad de 351 mOsmol/kg.

Se determinaron el grado de modificación (DoM), el MMW, el contenido de tiol residual y el módulo elástico G' como se ha descrito anteriormente y los valores medios se resumen en la tabla 9. 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 9: Características de una composición de hidrogel

ID	MMW de la materia prima HA-SH [kDa]	DoM de la materia prima HA-SH [μmol/g]	Contenido de tiol residual [μmol/g]	Módulo de elasticidad G' [mPa]
	Media	Media	Media	Media
22	767	98	1	839.510

Ejemplo 17 - Optimización de las condiciones para la reticulación del hialuronano modificado con tiol a escala industrial

Se usó un hialuronano modificado con tiol con un grado de modificación de 140 μmol de grupos tiol por g de polímero (MMW 820 kDa) para producir una composición de hidrogel que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de HA-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de HCl de lidocaína y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado a escala industrial (tamaño de lote 17,5 kg). Tras disolver la sal sódica de HA-cisteamina, el HCl de lidocaína, el hialuronato de sodio no

modificado y el cloruro de sodio en HCl 0,01 M mediante agitación durante aproximadamente 8 h a temperatura ambiente, la solución se dividió en dos porciones.

Una porción (7560 g) de la solución se incubó durante una noche a vacío en el recipiente B. La reticulación se inició mediante adición de una parte de una solución de tampón fosfato 100 mM pH 12,3 a 9 partes, seguida de la adición de una solución que comprendía peróxido de hidrógeno, de modo que la relación molar de grupos tiol libres del hialuronano modificado con tiol con respecto al peróxido de hidrógeno fue de 2:1 (se debe comparar con el método B). El pH resultante de la solución en el recipiente B fue de 7,7 y la osmolalidad fue de 316 mOsmol/kg.

La segunda porción (5800 g) de la solución se incubó también durante una noche al vacío en el recipiente A, seguida de la reticulación mediante la adición de una parte de una solución de tampón fosfato 100 mM de pH 12,3 a 9 partes (se debe comparar con el método A; recipiente A). En lugar de una solución que comprendía peróxido de hidrógeno, se añadió agua para inyección a la masa en una cantidad correspondiente. El pH resultante de la solución en el recipiente A fue de 7,7 y la osmolalidad fue de 312 mOsmol/kg.

Tras una breve homogeneización mediante agitación durante 10 minutos, ambos recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente. Para proporcionar oxígeno para la reticulación, se aplicó una presión de aire en exceso de +1 bar al recipiente A durante todo el período de reticulación de 10 días (una breve interrupción en el período de 72 h a 96 h tras el inicio de la reticulación se debió a problemas técnicos). Las muestras se extrajeron en los puntos y ubicaciones temporales que se enumeran en la tabla siguiente. La muestra de la superficie se tomó del hidrogel en el recipiente cerca de la superficie, mientras que la muestra del fondo se tomó de la parte inferior del hidrogel cerca del fondo del recipiente. El módulo elástico se midió como se describe en el ejemplo 4 (las muestras no se introdujeron en jeringas).

Tabla 10: Comparación de las propiedades elásticas de los hidrogeles producidos en diferentes condiciones de reticulación

	método A / recipiente A		método B / recipiente B	
Días de reticulación	Muestra de superficie G' [mPa]	Muestra de la parte inferior G' [mPa]	Muestra de superficie G' [mPa]	Muestra de la parte inferior G' [mPa]
3	531.255	313.810	2.670.550	2.657.800
4	1.500.200	425.365	n. d.	n. d.
5	1.685.750	491.345	n. d.	n. d.
6	n. d.	n. d.	2.548.750	2.546.000
10	2.269.100	762.660	n. d.	n. d.

El módulo elástico se usó como parámetro para controlar la firmeza de los hidrogeles, que se sabe que aumenta mediante la reticulación. La primera muestra se obtuvo directamente tras el inicio de la reticulación. El módulo elástico G' de la muestra obtenida del recipiente A fue de 33.729 mPa. Por el contrario, el módulo elástico de la muestra obtenida del recipiente B es de 2.475.700 mPa, lo que indica que la reticulación se había producido mucho más rápido en presencia del agente oxidante peróxido de hidrógeno. Los datos relacionados en la tabla 10 demuestran además que la reacción de reticulación no transcurrió de manera homogénea en toda la masa durante un tiempo de incubación de 10 días cuando se usó el método de producción A a escala industrial. La aplicación de un exceso de presión de aire al recipiente dio como resultado una reticulación más eficaz solo en la superficie de la masa del recipiente A. Por el contrario, el suministro de oxígeno en una cantidad suficiente mediante la adición de peróxido de hidrógeno dio como resultado una reacción de reticulación casi instantánea y homogénea (método B; recipiente B).

Ejemplo 18 - Monitorización de la formación de enlaces disulfuro durante la reticulación mediante la determinación del contenido de grupos tiol residuales

Se usó un hialuronano modificado con tiol con un grado de modificación de 140 μ mol de grupos tiol por g de polímero (MMW 820 kDa) para producir una composición de hidrogel que comprendía 17,9 mg/ml de sal sódica de HA-cisteamina reticulada, 3 mg/ml de HCl de lidocaína y 5 mg/ml de hialuronato de sodio no modificado. Tras disolver la sal sódica de HA-cisteamina, el HCl de lidocaína, el hialuronato de sodio no modificado y el cloruro de sodio en HCl 0,01 M mediante agitación durante aproximadamente 16 h a temperatura ambiente, la solución se dividió en cuatro porciones iguales de aproximadamente 160 g cada una. A cada solución se añadieron aproximadamente 20 g de tampón fosfato 100 mM a pH 12 con agitación. Después de 15 minutos de homogeneización, se añadieron 20 g de solución diluida de peróxido de hidrógeno a cada una de las cuatro soluciones, de modo que para producir el hidrogel E100, la relación molar de grupos tiol libres del hialuronano modificado con tiol y peróxido de hidrógeno fue de 2:1; durante la producción del hidrogel E50 (que comprendía el 50 % de la concentración de peróxido de hidrógeno de E100), la relación molar entre los grupos tiol libres del hialuronano modificado con tiol y el peróxido de hidrógeno fue de 4:1; durante la producción del hidrogel E30 (que comprendía el 30 % de la concentración de peróxido de hidrógeno de E100), la relación molar entre los grupos tiol libres del hialuronano modificado con tiol y el peróxido de hidrógeno fue de aproximadamente 7:1; durante la producción del hidrogel E10 (que comprendía el 10 % de la concentración de peróxido de hidrógeno de E100), la relación molar entre los grupos tiol libres del hialuronano modificado con tiol y el

peróxido de hidrógeno fue de 20:1. Tras una breve homogeneización, se llevó a cabo la reacción de reticulación a temperatura ambiente sin agitación adicional.

Se extrajeron las muestras en los puntos temporales enumerados en la tabla siguiente. Se midieron el contenido de grupos tiol residuales y el módulo elástico como se ha descrito anteriormente (las muestras no se introdujeron en jeringas). Se calculó el contenido de tiol residual en % a partir del grado inicial de modificación del hialuronano modificado con tiol (140 μmol de grupos tiol por g de polímero).

Tabla 11: Monitorización de la eficiencia de la reticulación mediante la medición del contenido de grupos tiol residuales y el módulo elástico G' de las muestras

Hidrogel E100			
Días de reticulación	G' [mPa]	Contenido de tiol residual [$\mu\text{mol/g}$]	Contenido de tiol residual [%]
0	1.703.300	n. d.	n. d.
1	2.928.500	0	0
2	3.055.900	0	0
3	n. d.	n. d.	n. d.
7	n. d.	n. d.	n. d.
Hidrogel E50			
Días de reticulación	G' [mPa]	Contenido de tiol residual [$\mu\text{mol/g}$]	Contenido de tiol residual [%]
0	947.745	n. d.	n. d.
1	2.191.950	43,9	31
2	2.217.000	31,8	23
3	2.415.800	17,7	13
7	2.642.350	n.d.	n. d.
Hidrogel E30			
Días de reticulación	G' [mPa]	Contenido de tiol residual [$\mu\text{mol/g}$]	Contenido de tiol residual [%]
0	707.515	n. d.	n. d.
1	1.514.500	115,5	83
2	1.795.300	53,2	38
3	1.975.100	32,4	23
7	2.415.700	n.d.	n. d.
Hidrogel E10			
Días de reticulación	G' [mPa]	Contenido de tiol residual [$\mu\text{mol/g}$]	Contenido de tiol residual [%]
0	321.695	n. d.	n. d.
1	512.500	122,7	88
2	827.810	88,7	63
3	1.326.400	47,2	33
7	2.023.800	n.d.	n. d.

Se observó que el módulo elástico G' de las muestras alcanzaba una meseta (G' en el intervalo de 2400 Pa a 3000 Pa) cuando el contenido de tiol residual en el hidrogel era inferior al 20 %. La reticulación del hidrogel E100 se completó en 2 días. Cuando se usó una concentración un 50 % menor de peróxido de hidrógeno para la reticulación (hidrogel E50), la reacción de reticulación duró aproximadamente 3 días. Usando una concentración de peróxido de hidrógeno un 90 % inferior para la reticulación (hidrogel E10), la reticulación no se completó incluso después de 7 días.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de hidrogel estéril que comprende un polímero reticulado,
 - 5 en donde el polímero reticulado es un producto de oxidación de un hialuronano modificado con tiol, el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol superior a 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
 - 10 el hialuronano modificado con tiol tiene un grado de modificación con grupos tiol de menos de aproximadamente 280 μmol por gramo de polímero, preferiblemente menos de aproximadamente 240 μmol por gramo de polímero, más preferiblemente menos de 200 μmol por gramo de polímero **caracterizada por que**
 - 15 la composición tiene un contenido de tiol residual de menos del 20 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol y el hialuronano modificado con tiol tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 400 kDa y está comprendido en la composición con una concentración de al menos aproximadamente 11 mg/ml hasta como máximo aproximadamente 20 mg/ml.
- 20 2. Composición según la reivindicación 1, en donde la composición tiene un contenido de tiol residual inferior al 15 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tiol.
3. Composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el hialuronano modificado con tiol está comprendido en la composición con una concentración de al menos 13 mg/ml a como máximo 18 mg/ml.
- 25 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el hialuronano modificado con tiol tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente de al menos aproximadamente 600 kDa.
- 30 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el hialuronano modificado con tiol es un conjugado de un agente de modificación unido al hialuronano mediante un enlace amida, en donde el agente se selecciona del grupo que comprende glutatión, aminoalquiltioles que comprenden una cadena de alquilo C₂-C₈ lineal o ramificada, cisteína, homocisteína, derivados de aminoácidos de cisteamina, cisteína y homocisteína, ésteres carboxilatos de homocisteína y ésteres carboxilatos de cisteína, preferiblemente la aminoalquiltiol cisteamina.
- 35 6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición comprende además un polímero no modificado seleccionado del grupo de polisacáridos biocompatibles, preferiblemente un hialuronano no modificado.
- 40 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición tiene un módulo elástico G' de al menos aproximadamente 900 Pa, preferiblemente de al menos aproximadamente 1000 Pa, medido a 25 °C usando una velocidad de cizallamiento de 1 Hz.
- 45 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento.
9. Composición para su uso según la reivindicación 8, en donde la composición se aplica como relleno de tejidos blandos o para aumentar el tejido.
- 50 10. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en metatarsalgia, incontinencia urinaria o fecal, atrofia vulvovaginal, deterioro de las cuerdas vocales, insuficiencia valvular venosa, lipoatrofia facial, cicatrices debilitantes o asimetría o deformación morfológica.
- 55 11. Uso cosmético de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Uso cosmético de una composición según la reivindicación 11, en donde la composición se aplica como relleno de tejidos blandos, preferiblemente para rellenar arrugas y defectos cutáneos, para restaurar el volumen perdido del rostro o el cuerpo, para reducir los hoyuelos en la celulitis, para dar forma a los contornos del rostro o el cuerpo.
- 60 13. Método para producir una composición de hidrogel estéril que comprende las etapas de
 - a) proporcionar un hialuronano modificado con tiol,
- 65

- 5 en donde el hialuronano modificado con tior tiene un grado de modificación con grupos tior superior a aproximadamente 80 μmol por gramo de polímero, preferiblemente superior a aproximadamente 105 μmol por gramo de polímero, más preferiblemente superior a aproximadamente 120 μmol por gramo de polímero,
- 10 en donde el hialuronano modificado con tior tiene un grado de modificación con grupos tior de menos de aproximadamente 280 μmol por gramo de polímero, preferiblemente menos de aproximadamente 240 μmol por gramo de polímero, más preferiblemente menos de 200 μmol por gramo de polímero, y
- 15 en donde el hialuronano modificado con tior tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 400 kDa, en una solución acuosa
- 20 b) oxidar el hialuronano modificado con tior exponiendo la solución acuosa obtenida previamente a condiciones que permitan que el hialuronano modificado con tior forme un polímero reticulado, en donde la solución acuosa se convierte en un hidrogel, hidrogel que tiene un contenido de tior residual de menos del 20 % con respecto al grado de modificación del hialuronano modificado con tior,
- 25 opcionalmente c) añadir un polímero no modificado seleccionado del grupo de polisacáridos biocompatibles al hidrogel obtenido previamente o a la solución obtenida previamente, opcionalmente d) tamizar el hidrogel obtenido previamente para obtener un hidrogel con un tamaño de partículas en particular,
- 30 e) rellenar un recipiente con el hidrogel obtenido anteriormente, en particular, una jeringa, y exponer el recipiente lleno a condiciones que permitan la esterilización del hidrogel,
- 35 f) obtener una composición de hidrogel estéril en un recipiente que comprende el polímero reticulado del hialuronano modificado con tior con una concentración de al menos aproximadamente 11 mg/ml hasta como máximo aproximadamente 20 mg/ml.
14. Método para producir una composición de hidrogel según la reivindicación 13, en donde las etapas se llevan a cabo según una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 -a), b), c), d), e) y f)
 -a), b), d), c), e) y f)
 -a), b), c), e) y f)
 -a), b), d), e) y f)
 -a), c), b), d), e) y f) y
 35 -a), c), b), e) y f),
- preferiblemente a), c), b), d), e) y f).
15. Método para producir una composición de hidrogel según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde en la etapa b) se añade un agente de oxidación a la solución acuosa obtenida previamente.
- 40

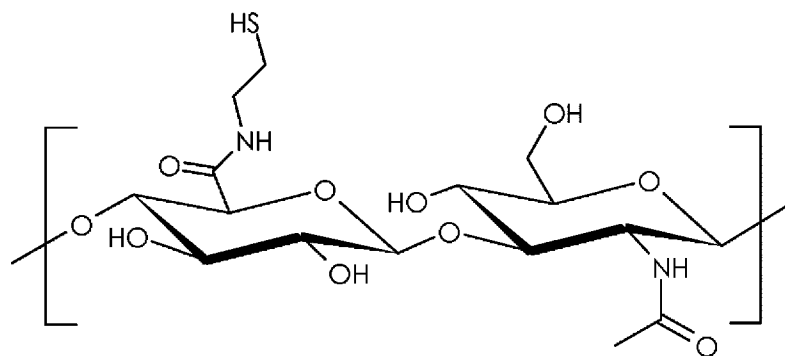


Figura 1

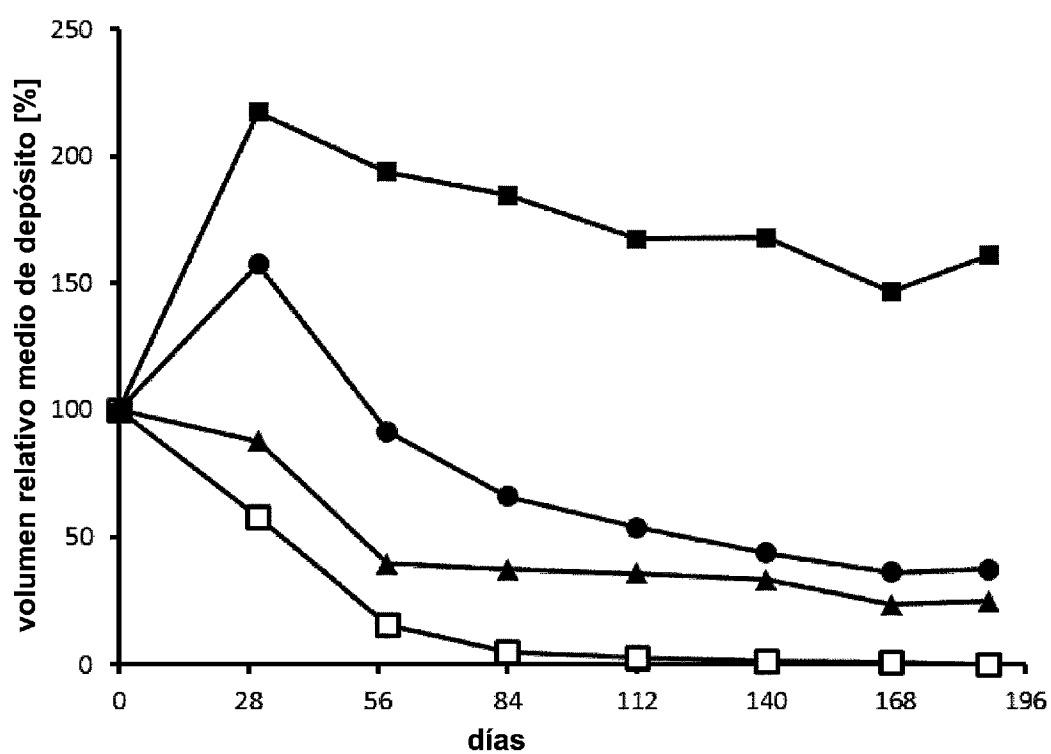


Figura 2

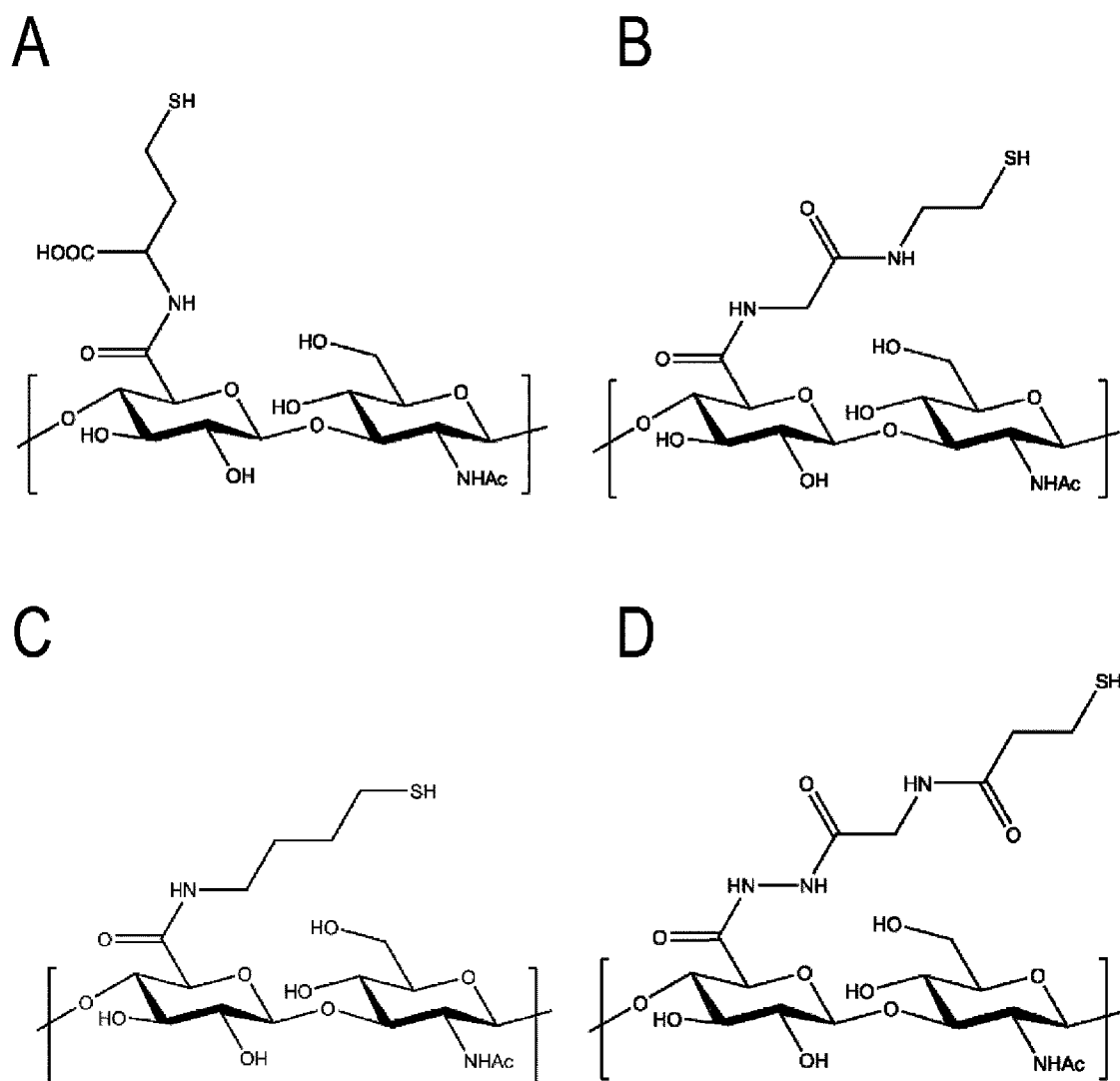


Figura 3