

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 135**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2011** **PCT/IB2011/055495**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012** **WO12077054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2011** **E 11799874 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021** **EP 2649101**

54 Título: **Proceso para preparar un gel reticulado**

30 Prioridad:

06.12.2010 FR 1060135

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

07.12.2021

73 Titular/es:

TEOXANE (100.0%)
Les Charmilles Rue de Lyon 105
1203 Geneva, CH

72 Inventor/es:

MEUNIER, STÉPHANE y
BOURDON, FRANÇOIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 883 135 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

Proceso para preparar un gel reticulado

El objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para preparar hidrogeles basados en un polisacárido reticulado y, preferiblemente, basados en ácido hialurónico, o una de sus sales.

5 El ácido hialurónico, que está naturalmente presente en la piel, es conocido por sus propiedades viscoelásticas y también por su gran propensión a absorber agua. Sus propiedades explican en gran medida la elasticidad de la piel. Su biocompatibilidad, tolerancia y carencia de toxicidad son tal que, durante más de una década, esta molécula se ha aplicado en los campos médico y cosmético y, en particular, para rellenar arrugas. Por lo tanto, la inyección de un hidrogel de polisacárido reticulado en la dermis en las arrugas que se van a tratar ayuda a reducir, o incluso eliminar, el hundimiento local en la estructura de la dermis que es una arruga.

En general, el polisacárido y, más particularmente, el ácido hialurónico, se usa en forma reticulada debido a la mayor resistencia de esta forma particular a la degradación y al calor.

15 Estos geles de polisacárido reticulados pueden obtenerse mediante varios métodos de preparación. Estos métodos generalmente requieren dos etapas principales, la primera consiste en hidratar el polisacárido en cuestión, para convertirlo en un gel acuoso, y la segunda tiene como fin reticular dicho gel acuoso en presencia de un agente típico que causa la reticulación de este.

20 Los métodos de reticulación convencionales para el ácido hialurónico habitualmente se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 40 °C, o incluso 50 °C, durante un tiempo menor que 3 horas, lo que posibilita que el gel de polisacárido se reticule de manera satisfactoria. Por este motivo este método de preparación se usa ampliamente en la industria.

25 Como ilustraciones de estos procesos, se pueden mencionar especialmente los procesos descritos en la patente estadounidense núm. US 2006/0105022, que comprende el uso de una mezcla que comprende al menos 10 % de ácido hialurónico, un agente de reticulación y agua en condiciones ácidas o básicas, en la publicación internacional núm. WO 2006/056204, que comprende una etapa para tratar el gel de ácido hialurónico reticulado con divinil sulfona y en la patente estadounidense núm. US 2007/0036745, que da como resultado un gel cohesivo a partir de un polímero de hialuronano reticulado con divinil sulfona (DVS).

Por motivos obvios, mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles para aplicaciones en los campos médico y cosmético constituye un objetivo constante.

30 La finalidad de la presente invención es proporcionar específicamente un proceso para obtener geles reticulados que tienen particularmente propiedades mecánicas ventajosos.

A pesar de las previsiones, los inventores hallaron que un nuevo método para preparar los geles reticulados permite mejorar significativamente las propiedades de dichos geles en comparación con las propiedades manifestadas por aquellos obtenidos por medio de un proceso convencional.

35 Por lo tanto, la presente invención se relaciona, según un primero de sus aspectos, con un proceso para preparar un gel reticulado de al menos un ácido hialurónico o una de sus sales, que comprende al menos las etapas que consisten en:

a) proporcionar, a una temperatura menor que 35 °C, un gel acuoso que comprende al menos un ácido hialurónico en una forma no reticulada junto con al menos un agente de reticulación de epoxi difuncional o multifuncional;

b) mantener la mezcla de la etapa a) a una temperatura menor que 35 °C durante al menos una hora;

40 c) estimular la reacción de reticulación de la mezcla obtenida después de la etapa b), y si es necesario;

d) recuperar dicho gel reticulado formado.

45 Más precisamente, la invención se relaciona con la inesperada observación de los inventores de que el uso de dos velocidades de reticulación diferentes una después de la otra, la primera que es particularmente lenta y la segunda que es significativamente más rápida, posibilita obtener geles de polisacárido reticulados que tienen propiedades viscoelásticas que son significativamente mejores en comparación con los geles obtenidos por medio de procesos convencionales que emplean una única velocidad de reticulación.

50 Como es evidente a partir del Ejemplo 3 más adelante, las nuevas propiedades viscoelásticas manifestadas por los geles reticulados obtenidos a través de la implementación de un proceso de la invención no se pueden reproducir de ningún modo con un gel obtenido según un proceso de reticulación convencional, es decir, que emplea para llevar a cabo dicha reacción de reticulación, una velocidad única aplicada a una temperatura mayor que 40 °C, incluso cuando esta velocidad de reacción única se aplica durante períodos de tiempo prolongados.

Según una realización particular, un proceso de la invención puede incluir, además, una etapa e) de detener la reticulación, que consiste en exponer el gel reticulado a condiciones propicias para detener la reticulación de este, esta etapa posiblemente se lleva a cabo antes, durante o después de la etapa de recuperación d).

Según una realización preferida, la etapa e) se lleva a cabo antes de la etapa d).

- 5 De manera ventajosa, el gel reticulado obtenido después de implementar un proceso de acuerdo con la invención es un gel de fase simple y, más particularmente, un gel viscoelástico predominantemente elástico, es decir, con escasa o incluso nula capacidad para fluir en ausencia de tensiones distintas que su propio peso.

10 Según otro aspecto de la presente invención, esto se relaciona con el uso de un gel reticulado obtenido al implementar un proceso como se definió anteriormente para rellenar de forma duradera los defectos de volumen de la piel y, especialmente, para rellenar las arrugas.

I) Proceso

Un proceso de la invención comprende, en una primera etapa, proporcionar un gel acuoso que comprende al menos un ácido hialurónico en una forma no reticulada junto con un agente de reticulación de epoxi difuncional o multifuncional

15 El término "no reticulado" se entiende en el contexto de la presente invención que significa que un gel de polisacárido acuoso no está reticulado o está ligeramente reticulado, es decir, un gel que tiene un ángulo de desplazamiento de fase δ , medido en condiciones de reología dinámica a 1 Hz, que es mayor que 40° cuando se somete a una tensión mayor que 1 Pa.

Más precisamente, el gel acuoso considerado en la etapa a) se puede obtener de antemano al combinar, en un recipiente apropiado:

20 (i) un medio acuoso;

(ii) al menos un ácido hialurónico o una de sus sales, en una forma no reticulada; y

(iii) al menos un agente de reticulación de epoxi difuncional o multifuncional,

y homogeneizar la mezcla obtenida de este modo, el orden de la adición de dichos compuestos (i), (ii) y (iii) al recipiente es indiferente.

25 Según una primera variante de realización, este gel acuoso se puede formar al introducir, en el recipiente, el medio acuoso y el ácido hialurónico, la mezcla formada de este modo se homogeneiza simultáneamente y/o posteriormente, y después al agregar el agente de reticulación con homogeneización simultánea y/o posterior.

30 Según una segunda variante de realización, este gel acuoso se puede obtener al introducir, en el recipiente, el medio acuoso, el ácido hialurónico y el agente de reticulación, y la mezcla formada de este modo se homogeneiza simultáneamente y/o posteriormente.

Esta segunda variante de realización es ventajosa en el sentido de que se lleva a cabo una única etapa de homogeneización.

De manera ventajosa, esta etapa de formar el gel acuoso se puede llevar a cabo a una temperatura menor que 35°C , preferiblemente, a una temperatura que varía de 15 a 25°C , e incluso mejor, a temperatura ambiente.

35 Independientemente de la realización en cuestión, la formación de un gel acuoso como se considera en la etapa a) implica al menos una operación de homogeneización.

40 El propósito de esta operación, ya sea que se lleve a cabo o no en presencia del agente de reticulación, es más particularmente para el ácido hialurónico en el medio acuoso y, si es necesario, el agente de reticulación, para que se hidrate y homogeneice perfectamente y, por lo tanto, para ayudar a optimizar las propiedades del gel reticulado esperado.

Por estos motivos, la homogeneidad del gel reticulado depende estrechamente de la homogeneidad del gel antes de la reticulación.

45 La homogeneización se considera satisfactoria cuando la disolución obtenida está coloreada de manera uniforme, no tiene aglomerados y tiene una viscosidad uniforme. La homogeneización se puede llevar a cabo, de manera ventajosa, en condiciones de operación leves para prevenir la degradación de las cadenas del polisacárido.

Esta etapa es más importante cuando el polisacárido tiene un peso molecular alto, debido a que la hidratación de dicho compuesto tiende a provocar la formación de una disolución de viscosidad alta dentro de la cual se observa comúnmente la aparición de aglomerados.

La duración de esta etapa de homogeneización depende de la naturaleza del polisacárido y, más particularmente, del peso molecular y la concentración de este, de las condiciones de operación dentro del medio acuoso y del dispositivo de homogeneización usado.

5 Ajustar el tiempo de homogeneización adecuado para obtener un gel de polisacárido acuoso suficientemente homogéneo está dentro del conocimiento general de un experto en la técnica.

Preferiblemente, una etapa de homogeneización según la presente invención puede producirse durante un tiempo menor que 200 minutos, preferiblemente, menor que 150 minutos, o incluso entre 15 y 100 minutos.

10 Como se desprende de lo mencionado anteriormente, se aplican dos velocidades de reticulación diferentes, una después de la otra, al gel acuoso de la etapa a), estas se ilustran en las etapas b) y c) del proceso de la invención, respectivamente.

El propósito de la reticulación es crear puentes entre las cadenas de ácido hialurónico, posibilitando la obtención de una red tridimensional sólida densa a partir de una disolución viscosa.

i) Condiciones para llevar a cabo la etapa b)

15 La etapa b) implica mantener la mezcla de la etapa a) a una temperatura menor que 35 °C durante un tiempo de al menos una hora.

Por lo tanto, la etapa b), en las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo, es compatible solo con una velocidad de reticulación lenta.

Preferiblemente, la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura que varía de 15 a 25 °C, e incluso mejor, a temperatura ambiente.

20 La velocidad de reticulación lenta considerada en la etapa b) se puede caracterizar especialmente por la velocidad de desaparición, dentro de la mezcla obtenida después de la etapa a), del agente de reticulación de epoxi.

Por lo tanto, la velocidad promedio de desaparición del agente de reticulación de epoxi durante la etapa b) es menor que 5 ppm/min, preferiblemente, menor que 2 ppm/min, para una concentración de ácido hialurónico de 20 mg/g.

Preferiblemente, la etapa b) se produce en un tiempo mayor que una hora, preferiblemente, mayor que dos horas.

25 Preferiblemente, la etapa b) se puede llevar a cabo en un tiempo que varía de 1 a 2 horas 30 minutos e, incluso mejor, de 1 hora 30 minutos a 2 horas.

ii) Condiciones para llevar a cabo la etapa c)

La etapa c), sin embargo, implica la estimulación de la reacción de reticulación.

30 Por lo tanto, el término "estimulación" se entenderá que significa, en el contexto de la presente invención, un aumento significativo en la velocidad de la reacción de reticulación.

Las condiciones particulares que se van a adoptar para estimular la reacción de reticulación pueden depender de la naturaleza del polisacárido, de su peso molecular, del medio acuosa y de la naturaleza del agente de reticulación.

35 En general, esta estimulación se puede llevar a cabo al poner en contacto la mezcla obtenida después de la etapa b) con un elemento desencadenante, o estimulante, tal como, por ejemplo, mediante calentamiento o exposición a UV, o incluso al poner en contacto dicha mezcla con un material de tipo catalizador.

La elección de dicho elemento desencadenante está dentro del conocimiento general de un experto en la técnica.

Por lo tanto, un elemento desencadenante se puede aplicar mediante:

- inmersión del recipiente que comprende la mezcla obtenida después de la etapa b) en un baño que contiene un fluido caliente;
- 40 – exposición de dicha mezcla a radiación de ciertas longitudes de onda, por ejemplo, en el UV, o a microondas o incluso radiación infrarroja;
- irradiación por medio de rayos ionizantes, de conformidad con el proceso descrito en el documento US 2008/0139796; y
- reticulación enzimática.

45 En el contexto de la presente invención, este elemento desencadenante se representa ventajosamente por un aumento en la temperatura impuesta a la mezcla obtenida después de la etapa b).

Una temperatura particularmente adecuada para la etapa c) depende de la naturaleza del polisacárido en cuestión.

Si el polisacárido es ácido hialurónico, una temperatura particularmente adecuada para la etapa c) está entre 35 °C y 60 °C, preferiblemente, entre 45 y 55 °C e, incluso mejor, entre 48 y 52 °C.

- 5 En el caso de la etapa b) descrita anteriormente, la velocidad de reticulación rápida considerada en la etapa c) se puede caracterizar, en particular, por la velocidad de desaparición, dentro de la mezcla obtenida después de la etapa b), del agente de reticulación de epoxi.

Por lo tanto, la velocidad media de desaparición del agente de reticulación de epoxi durante la etapa c) es mayor que 5 ppm/min, preferiblemente, mayor que 7 ppm/min, para una concentración de ácido hialurónico de 20 mg/g.

- 10 El grado de reticulación también depende del tiempo de reticulación impuesto a la mezcla obtenida después de la etapa b). Cuanto mayor es el tiempo, mayor es el grado de reticulación, con un óptimo que, sin embargo, no se puede superar sin correr el riesgo de degradar el polisacárido.

Por lo tanto, la etapa c) se puede llevar a cabo durante un tiempo que varía de 30 a 300 minutos, preferiblemente 100 a 200 minutos e, incluso mejor, 150 a 190 minutos.

- 15 De manera ventajosa, las condiciones de reticulación se ajustan para maximizar la eficacia de la reticulación, es decir, para obtener un grado máximo eficaz de reticulación para una cantidad mínima usada de agente de reticulación.

Según una realización particularmente preferida, las etapas de reticulación b) y c) se llevan a cabo en un medio básico, el recipiente que contiene la mezcla obtenida después de la etapa a) se mantiene durante una hora a temperatura ambiente y después se coloca en un baño con termostato calentado hasta una temperatura de aproximadamente 50 a 55 °C, durante un tiempo de al menos 1 hora y, preferiblemente, de entre 1 hora 30 minutos y 3 horas 30 minutos.

- 20 Como se explicó anteriormente, se puede detener la reticulación (etapa e) antes, durante o después de la etapa d) de recuperar el gel.

Dicha etapa, en un proceso según la invención, requiere exponer el gel reticulado o, durante la reticulación, incluso el recipiente que lo contiene, a condiciones propicias para detener la reticulación o de otro modo a condiciones capaces de detener la formación de enlaces entre las diversas cadenas del polisacárido.

- 25 Según una variante de realización preferida, la etapa e) se lleva a cabo antes de la etapa d).

Por ejemplo, con respecto a las condiciones térmicas que se aplicarán para estimular el proceso de reticulación, la reticulación puede detenerse:

- simplemente al retirar el recipiente del baño con termostato y enfriarlo hasta que vuelva a temperatura ambiente;
- 30 – al colocar el recipiente en un baño de agua fría, preferiblemente a una temperatura menor que la temperatura ambiente, hasta que la temperatura, dentro de dicho recipiente esté próxima a la temperatura ambiente; o incluso
- al extraer el gel de dicho recipiente.

En el caso de reticulación por radiación, esta se detiene al detener la exposición de dicho gel a la radiación.

- 35 Según una realización particular, un proceso de la invención puede incluir, además, al menos una etapa que consiste en hacer que la mezcla obtenida después de la etapa a), o incluso obtenida después de la etapa b), pase a través de al menos un dispositivo capaz de retener cualquier partícula con un diámetro mayor que 100 micrones.

Esta etapa específica, también denominada en el resto de la descripción "etapa de extrusión", por lo tanto, se produce después de la etapa a) y antes de la etapa b) y/o después de la etapa b) y antes de la etapa c).

- 40 Como se desprenderá de los ejemplos a continuación, el efecto ventajoso asociado con esta etapa de extrusión es que se obtiene un gel reticulado que tiene propiedades viscoelásticas mejoradas adicionalmente.

La elección del tipo de dispositivo de extrusión está dentro del conocimiento general de un experto en la técnica.

De manera ventajosa, la etapa de extrusión se lleva a cabo al usar al menos un dispositivo que comprende al menos un filtro.

- 45 Un experto en la técnica es capaz de definir las características adecuadas en relación con la porosidad, geometría, resistencia y capacidad de retención de dicho filtro para que este último deje pasar la mezcla obtenida después de la etapa a), o incluso después de la etapa b), mientras retiene cualesquiera partículas con un diámetro mayor que 100 micrones.

En el resto de la presente descripción, el dispositivo que comprende al menos un filtro usado para llevar a cabo la etapa de extrusión también se puede denotar mediante la expresión "dispositivo de extrusión".

De manera ventajosa, la etapa de extrusión se lleva a cabo por medio de al menos un dispositivo que comprende al menos un filtro que tiene una porosidad que varía de 2 a 100 micrones, preferiblemente, de 5 a 50 micrones, incluso mejor, 8 a 30 micrones y, más particularmente, 10 micrones.

De manera ventajosa, la velocidad lineal de extrusión de la mezcla obtenida después de la etapa a) y/o b) a través del(de los) dispositivo(s) de extrusión es lenta para no degradar las cadenas del polisacárido durante su pasaje a través de este(estos).

Por lo tanto, la velocidad lineal de extrusión de dicha(s) mezcla(s) obtenida(s) después de la etapa a) y/o la etapa b) a través del(de los) dispositivo(s) es entre 1 y 100 cm/min, preferiblemente, entre 1 y 4 cm/min.

Según otra realización particular, el proceso de la invención se puede llevar a cabo al menos parcialmente dentro de un recipiente específico que tiene una pared deformable, tal como, por ejemplo, una bolsa.

Esto se debe a que las propiedades de deformación de dicho recipiente y su estanqueidad posibilitan llevar a cabo las diversas etapas del proceso de la invención y, especialmente, las etapas de homogeneización y reticulación, en condiciones óptimas que provocan que se obtenga un gel reticulado incluso mejor, es decir, uno que tiene propiedades de inyectabilidad superiores a las exhibidas por un gel obtenido según un proceso que emplea un recipiente convencional de tipo tarro o tanque.

El gel reticulado obtenido después del proceso de la invención según se describió anteriormente, no puede en general inyectarse directamente, en particular, debido a su alta concentración de ácido hialurónico y/o a la posible presencia de residuos del agente de reticulación o de otro modo debido a sus condiciones fisiológicas y/o de pH incompatibles con el uso en los campos de las aplicaciones mencionadas anteriormente.

Además, el gel obtenido después del proceso de la invención puede tener, especialmente, una rigidez demasiado alta para inyectarse como tal en un paciente.

Por lo tanto, se pueden llevar a cabo varias etapas adicionales, conocidas para los expertos en la técnica, para obtener un hidrogel inyectable.

Más particularmente, se necesita una etapa de neutralización y expansión de este gel para darle sus cualidades de implante. Las cadenas de la red del polisacárido después se estiran e hidratan, mientras que el pH se ajusta hasta el de la dermis.

También se puede llevar a cabo una etapa de protección y redensificación del gel para mejorar adicionalmente las cualidades del implante, según los conocimientos de un experto en la técnica. El gel debe formularse fisiológicamente en virtud de la presencia de sales en cantidades equivalentes a las del medio inyectado.

Para una pureza incluso más alta, también se puede llevar a cabo una etapa de purificación adicional.

Finalmente, el hidrogel obtenido de este modo puede usarse para cargar jeringas en condiciones de atmósfera controlada, dichas jeringas después posiblemente se someten a una etapa de esterilización, preferiblemente, una etapa de esterilización térmica.

II) Polisacárido

El término "polisacárido" se entiende que significa cualquier polímero que consiste en varios monosacáridos enlazados entre sí mediante enlaces de glucósido y que tiene la fórmula general: $-(C_x(H_2O)_y)_n-$.

Un polisacárido según la invención es ácido hialurónico, y sales biológicamente aceptables de este.

Las sales de ácido hialurónico según la invención se eligen más particularmente de sales fisiológicamente aceptables tales como la sal de sodio, la sal de potasio, la sal de zinc, la sal de plata y mezclas de estas, preferiblemente, sal de sodio

Preferiblemente, un ácido hialurónico o sal de ácido hialurónico según la invención tiene un alto peso molecular, preferiblemente, un peso molecular mayor o igual que 100.000 Da, incluso mejor, mayor o igual que 1 MDa (o $1,10^6$ Da), o incluso mayor que 3 MDa (o $3,10^6$ Da), dependiendo de la aplicación en cuestión.

Una sal particularmente preferida es hialuronato de sodio (NaHA).

De manera ventajosa, el ácido hialurónico puede estar presente dentro del gel acuoso de dicho ácido hialurónico en una forma no reticulada en un contenido que varía de 5 a 15 % en peso, preferiblemente, en un contenido mayor que 10 % en peso, con respecto al peso total de dicho gel acuoso.

Como se mencionó anteriormente, la mezcla de la etapa a) del proceso según la invención da como resultado al menos un gel de ácido hialurónico acuoso en una forma no reticulada, o una de sus sales, que se combina con al menos un agente de reticulación de epoxi.

5 Ahora, dicho gel de ácido hialurónico acuoso puede resultar en sí mismo de poner en contacto de antemano dicho ácido hialurónico, o una de sus sales, con un medio acuoso.

El término "medio acuoso" se entiende en el contexto de la presente invención que significa cualquier medio líquido que contiene agua y que tiene la propiedad de disolver un polisacárido o una de sus sales.

La naturaleza del medio acuoso es más particularmente dependiente del tipo de reticulación contemplado, pero también del tipo de polímero usado.

10 En este sentido, un medio acuoso adecuado puede ser ácido o básico.

Un medio acuoso particularmente preferido es un medio alcalino, preferiblemente, hidróxido de sodio (NaOH), más particularmente, una disolución de hidróxido de sodio que tiene un pH mayor que 12.

III) Agente de reticulación de epoxi

15 El término "agente de reticulación" se entiende que significa cualquier compuesto capaz de inducir reticulación entre las diversas cadenas del ácido hialurónico.

La elección de este agente de reticulación para que reticule el polisacárido claramente está dentro de la competencia de un experto en la técnica.

20 Un agente de reticulación según la invención se elige de agentes de reticulación de epoxi difuncionales o multifuncionales, tales como butanodiol diglicidil éter (BDDE), diepoxioctano o 1,2-bis(2,3-epoxipropil)-2,3-etileno, y mezclas de estos.

Preferiblemente, un agente de reticulación según la invención es butanodiol diglicidil éter.

Ajustar la cantidad de agente de reticulación para llevar a cabo la reacción de reticulación también está dentro de la competencia de un experto en la técnica.

25 Según una realización particularmente preferida, el proceso según la invención usa hialuronato de sodio en medio alcalino con butanodiol diglicidil éter como agente de reticulación.

A lo largo de la descripción, incluidas las reivindicaciones, la expresión "que comprende/n un/una" debe entenderse como sinónima de "que comprende/n al menos un/una" a menos que se indique específicamente de cualquier otra manera.

30 Las expresiones "entre... y..." y "que varía de...a..." debe entenderse que significan que los límites son inclusivos, a menos que se especifique de cualquier otra manera.

Los siguientes ejemplos y figuras se presentan a modo de ilustración no limitante de la invención.

FIGURAS:

- La Figura 1: ilustra las propiedades viscoelásticas de geles de ácido hialurónico medidas por su módulo de elasticidad G' (en Pa).
- 35 – Figura 2: ilustra la variación en el módulo de elasticidad G' (en Pa) de hidrogeles obtenidos después de una etapa de reticulación caracterizada por una primera etapa de mantener una mezcla de un gel de ácido hialurónico acuoso al 12 % con BDDE durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente una segunda etapa de incubación de dicha mezcla a 52 °C durante varios tiempos.
- 40 – Figura 3: ilustra la variación en el módulo de elasticidad G' (en Pa) de hidrogeles obtenidos después de una etapa de reticulación caracterizada por una única etapa de incubación de una mezcla de gel de ácido hialurónico acuoso al 12 % con BDDE a 52 °C durante varios tiempos.

EJEMPLOS:

Ejemplo 1

45 Para cada uno de los geles reticulados descritos anteriormente, se emplearon 10 g de ácido hialurónico (1,5 MDa), 73 g de hidróxido de sodio al 1 % y 1,2 g de butanodiol diglicidil éter (BDDE).

Las condiciones particulares aplicadas para cada gel fueron las siguientes:

Producto A (testigo)

El protocolo de preparación fue el siguiente:

1. homogeneización a temperatura ambiente de la mezcla de ácido hialurónico/hidróxido de sodio al 1 % durante aproximadamente 1 hora 30 minutos para obtener una disolución viscosa perfectamente homogénea;
- 5 2. adición del agente de reticulación (BDDE) y homogeneización adicional a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos;
3. incubación de la disolución viscosa de mezcla de ácido hialurónico/hidróxido de sodio al 1 %/BDDE durante 3 horas a 52 °C; y
- 10 4. neutralización, hinchazón y homogeneización del sólido obtenido (disolución de ácido hialurónico reticulada) en una disolución de tampón de fosfato acidificada para obtener un hidrogel que contiene 20 mg/g de ácido hialurónico con un pH cercano a neutro.

Producto B (según la invención)

- El protocolo fue el mismo que se describió para el producto A, pero se llevó a cabo con una etapa intermedia, entre las etapas 2 y 3, durante la cual la mezcla obtenida después de la etapa 2 se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas.

Esta etapa intermedia también se puede denotar, en el resto de la presente descripción, mediante la expresión "etapa de reposo".

El tiempo de contacto total de "ácido hialurónico/BDDE" antes de la incubación a 52 °C fue, por lo tanto, aproximadamente 2 horas 20 minutos.

Producto C (según la invención)

El protocolo fue el mismo que se describió para el producto A, pero se llevó a cabo con una etapa de extrusión, después de la etapa 2 de agregar BDDE y homogeneizar durante 15 minutos, posteriormente con la etapa intermedia, en la que el producto B se mantuvo durante 2 horas a temperatura ambiente y después la etapa de incubación 3 a 52 °C durante 3 horas.

- 25 Esta etapa de extrusión se llevó a cabo por medio de un tamiz circular del tipo de bloque de tamiz extrusor, que tiene un tamaño de malla de 10 micrones.

El tiempo de contacto total de ácido hialurónico/BDDE antes de la incubación a 52 °C fue nuevamente de aproximadamente 2 horas 20 minutos.

- 30 Se cargaron todas las jeringas con los productos A, B y C. Las propiedades viscoelásticas de estos tres productos se midieron al usar un reómetro (Haake RS6000) con una geometría de cono/placa (ángulo de cono de 1°/placa con diámetro de 35 mm). Se llevó a cabo un barrido de esfuerzo y se midieron el módulo de elasticidad G' (en Pa) y el ángulo de desplazamiento de fase δ (en °) para una tensión de 5 Pa.

Resultados

- 35 La Figura 1 más adelante muestra los valores de módulo de elasticidad G' (en PA) medidos. Como indicación, el valor del ángulo de desplazamiento de fase δ se indica (en °) en la parte superior de cada columna, a la derecha del valor G' .

El desplazamiento de fase medido es extremadamente pequeño, lo que significa que estos geles exhiben un carácter principalmente elástico.

- 40 Los resultados de la Figura 1, y especialmente el del producto B, muestran un aumento significativo en G' cuando la reacción de reticulación se lleva a cabo a través de un proceso de la invención, es decir, al emplear dos velocidades diferentes para llevar a cabo la reacción de reticulación, una después de la otra.

Este efecto es incluso más pronunciado cuando se lleva a cabo la etapa de extrusión al usar un dispositivo que comprende un filtro con una porosidad de 10 micrones.

Ejemplo 2: Evaluación, en varias etapas, de la cantidad de agente de reticulación agente en un gel de ácido hialurónico sometido a un proceso según la invención.

- 45 Se prepararon varios hidrogeles reticulados en paralelo al usar un proceso de la invención a través del uso de un recipiente específico, a saber, una bolsa deformable, como se definió anteriormente.

Se preparó así una disolución de ácido hialurónico al 12 % en NaOH al 1 %. Después de hidratar el ácido hialurónico, se agregó una disolución de BDDE diluido cinco veces en NaOH al 1 %.

La cantidad total de BDDE usada, por lo tanto, correspondió a un contenido teórico equivalente a 1,8 mg/g en un hidrogel de ácido hialurónico de 20 mg/g.

Después, se prepararon varias fracciones de A, B y C a partir de la mezcla obtenida

5 anteriormente. La fracción A corresponde a un gel de ácido hialurónico mantenido durante 1 hora a temperatura ambiente (RT, por sus siglas en inglés) antes de la etapa de incubación descrita más adelante.

La fracción B corresponde a un gel de ácido hialurónico mantenido durante 2 horas a temperatura ambiente antes de la etapa de incubación descrita más adelante.

10 Finalmente, la fracción C correspondió a un gel de ácido hialurónico mantenido durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la etapa de incubación descrita más adelante, esta etapa de reposo se combinó adicionalmente con una etapa de extrusión a través de un tamiz de tamaño de malla 10 μm .

Después de los diversos tratamientos descritos anteriormente, las fracciones A, B y C se incubaron a 52 °C durante 3 horas.

15 Los sólidos obtenidos respectivamente después de esta etapa de incubación (disoluciones de ácido hialurónico reticulado) después se neutralizaron, hincharon y homogeneizaron en una disolución de tampón de fosfato de pH 7,3 para obtener un hidrogel de ácido hialurónico de 20 mg/g.

Para monitorizar la cantidad de agente de reticulación consumido en diversas etapas del proceso de la invención, se llevó a cabo un análisis de BDDE en varias etapas.

20 Por lo tanto, las muestras T1 y T2 corresponden a muestras de gel tomadas después de mantener las mezclas de ácido hialurónico/BDDE, antes de la etapa de incubación durante 3 horas a 52 °C, a temperatura ambiente durante 1 y 2 horas, respectivamente.

Las muestras T1 y T2 después se sometieron a etapas de neutralización, hinchazón y homogeneización como las que se describieron anteriormente para las fracciones A, B y C, para obtener hidrogeles de ácido hialurónico de 20 mg/g.

Las muestras A, B y C correspondieron a muestras de gel tomadas de las fracciones correspondientes después de la incubación durante 3 horas a 52 °C y la conversión a un hidrogel de 20 mg/g.

25 **Resultados**

La Tabla 1 muestra las cantidades medidas de agente de reticulación y los valores de módulo de elasticidad (G' en Pa) de los hidrogeles obtenidos.

Como indicación, los valores de la viscosidad compleja $|\eta|^*$ y el ángulo de desplazamiento de fase δ también se indican.

Tabla 1

Muestras:	BDDE (mg/g)	G' (Pa)	$ \eta ^*$ (Pa.s)	δ (°)
T1	1,53	<i>NCO *(disoluciones predominantemente viscosas con baja elasticidad debido a la ausencia de reticulación, $\delta > 45^\circ$)</i>		
T2	1,43			
Fracción A (mantenida a RT durante 1 h)	0,20	136	22	5
Fracción B (mantenida a RT durante 2 h)	0,17	174	28	5
Fracción C (mantenida a RT durante 1 h y una etapa de extrusión a través de un filtro de 10 μm)	0,20	159	25	5
*NCO = no llevada a cabo.				

30

Cabe señalar que el contenido de BDDE residual medido corresponde a geles no esterilizados y no purificados.

Los contenidos medidos de agente de reticulación (BDDE) en las muestras T1 y T2 son del mismo orden de magnitud. La pequeña reducción en el contenido de BDDE observada en comparación con el contenido teórico indicado

anteriormente se explica por una velocidad lenta de la reacción de reticulación, según sea el caso, asociada con la degradación de BDDE debido a la inestabilidad de los grupos funcionales epoxi.

En cambio, la reducción en el contenido de BDDE se acentúa en gran medida después de la etapa de incubación a 52 °C durante 3 horas, este consumo sustancial de BDDE, por lo tanto, corresponde a una velocidad rápida de la reacción de reticulación.

En relación con las propiedades mecánicas de los geles obtenidos (fracciones A, B y C), cabe señalar que (i) el desplazamiento de fase es extremadamente pequeño, lo que significa que estos geles tienen un carácter principalmente elástico, (ii) el módulo de elasticidad G' más alto se obtiene para el gel que resulta de la fracción B, es decir, con una etapa de mantener a temperatura ambiente durante 2 horas antes de la incubación a 52°C y (iii) la fracción C, extruida antes de la reticulación, tiene un módulo de elasticidad G' significativamente mayor en comparación con el mismo hidrogel, pero no extruido (fracción A).

Los puntos (ii) y (iii) indicados anteriormente, por lo tanto, corroboran los efectos ventajosos debido al uso de dos velocidades de reticulación diferentes, una después de la otra, para la reacción de reticulación, pero también debido a la etapa de extrusión en el contexto de un proceso para preparar un gel reticulado según la invención.

Ejemplo 3:

Se preparó una mezcla de gel de polisacárido acuoso/agente de reticulación idéntica a la descrita en el Ejemplo 2 anteriormente.

Después, se llevaron a cabo dos pruebas:

– En el primer caso, se prepararon varias fracciones A, B, C y D a partir de la mezcla anterior. La reacción de reticulación se llevó a cabo al dejar dichas fracciones durante 2 horas a temperatura ambiente antes de colocarlas a 52 °C durante varios tiempos.

– En el segundo caso, también se prepararon varias fracciones A', B', C' y D'. A diferencia de las fracciones A, B, C y D, estas se incubaron directamente a 52 °C durante varios tiempos.

Los tiempos de incubación a 52 °C para las diversas fracciones consideradas fueron los siguientes:

• **Fracciones A y A':** 2 horas 40 minutos

• **Fracciones B y B':** 2 horas 50 minutos

• **Fracciones C y C':** 3 horas

• **Fracciones D y D':** 3 horas 10 minutos.

Los geles de ácido hialurónico reticulados obtenidos después de las etapas de incubación después se neutralizaron, después se hincharon y homogeneizaron en una disolución de tampón de fosfato (PB, por sus siglas en inglés) de pH 7,3 para obtener hidrogeles de ácido hialurónico de 20 mg/g. Las siguientes caracterizaciones y análisis se llevaron a cabo con los hidrogeles obtenidos de este modo.

Resultados

La Tabla 2 a continuación proporciona los valores de módulos de elasticidad G' (en Pa) de los hidrogeles obtenidos. Como indicación, el valor de la viscosidad compleja $|\eta|$ y el ángulo de desplazamiento de fase δ también se proporcionan.

Tabla 2

	Barrido de amplitud (cono/placa)		
	$\tau = 5 \text{ Pa}$		
	G' (Pa)	$ \eta $ * (Pa.s)	δ (°)
A	174,5	27,9	5,1
B	186,9	29,9	5,7
C	174,0	27,8	5,5

	Barrido de amplitud (cono/placa)		
	$\tau = 5 \text{ Pa}$		
	G' (Pa)	$ \eta *$ (Pa.s)	δ (°)
D	152,2	24,3	4,8
A'	119,2	19,1	7,1
B'	126,5	20,3	6,4
C'	125,8	20,1	6,3
D'	122,7	19,6	5,7

Las Figuras 2 y 3 a continuación ilustran los resultados proporcionados en la Tabla 2 anteriormente.

La eficacia óptima de la etapa de incubación a 52 °C sobre la reticulación, por lo tanto, se produce a las 3 horas aproximadamente con o sin la etapa anterior de mantener la mezcla de gel de polisacárido acuoso/agente de reticulación a temperatura ambiente.

5

Los hidrogeles obtenidos mediante un proceso que emplea una etapa de mantenimiento a temperatura ambiente durante 2 horas, antes de la etapa de incubación a 52 °C, tienen propiedades viscoelásticas que son significativamente mejores que los valores máximos observados para los hidrogeles obtenidos mediante un protocolo donde está ausente la etapa de mantenimiento a temperatura ambiente.

10

Estos resultados demuestran que el efecto beneficioso debido a la presencia, para llevar a cabo la reacción de reticulación, de una etapa de mantenimiento de una mezcla de gel de polisacárido acuoso/agente de reticulación a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado no se puede simplemente reproducir al extender el tiempo de reticulación a 52 °C.

15

Se debe a que el G' óptimo medido en los hidrogeles obtenidos según un proceso de reticulación de la invención no ha sido alcanzado nunca por los hidrogeles obtenidos según un proceso de reticulación convencional, cualquiera sea la duración de la etapa de incubación a 52 °C.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para preparar un gel reticulado de al menos un ácido hialurónico o una de sus sales, que comprende al menos las etapas que consisten en:
 - a) proporcionar, a una temperatura menor que 35 °C, un gel acuoso que comprende al menos un ácido hialurónico en una forma no reticulada junto con al menos un agente de reticulación de epoxi difuncional o multifuncional;
 - b) mantener la mezcla de la etapa a) a una temperatura menor que 35 °C durante al menos una hora;
 - c) estimular la reacción de reticulación de la mezcla obtenida después de la etapa b), la etapa c) se lleva a cabo térmicamente, a una temperatura entre 35 y 60 °C, durante un tiempo que varía de 30 a 300 minutos, y si es necesario;
 - d) recuperar dicho gel reticulado formado.
2. Proceso según la reivindicación 1, en donde las etapas a) y b) se llevan a cabo a una temperatura que varía de 15 a 25 °C, e incluso mejor, a temperatura ambiente.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa b) se lleva a cabo durante un tiempo mayor que 1 hora, preferiblemente, mayor que 2 horas.
4. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el gel acuoso considerado en la etapa a) se obtiene de antemano al combinar, en un recipiente apropiado:
 - (i) un medio acuoso;
 - (ii) al menos un ácido hialurónico, o una de sus sales, en una forma no reticulada; y
 - (iii) al menos un agente de reticulación de epoxi difuncional o multifuncional, y homogeneizar la mezcla obtenida de este modo, el orden de la adición de dichos compuestos (i), (ii) y (iii) al recipiente es indiferente.
5. Proceso según la reivindicación 1, en donde la etapa de homogeneización se produce durante un tiempo menor que 200 minutos, preferiblemente, menor que 150 minutos, o incluso entre 15 y 100 minutos.
6. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura entre 45 y 55 °C, o incluso entre 48 y 52 °C.
7. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa c) se lleva a cabo durante un tiempo que varía de 100 y 200 minutos e, incluso mejor, de 150 a 190 minutos.
8. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente de reticulación es butanodiol diglicidil éter (BDDE).
9. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular mayor o igual que 1 MDa.
10. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido hialurónico está presente dentro del gel acuoso de dicho ácido hialurónico en una forma no reticulada en un contenido de entre 5 y 15 % en peso, preferiblemente, mayor que 10 % en peso, con respecto al peso total de dicho gel acuoso.
11. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se emplea hialuronato de sodio en medio alcalino y butanodiol diglicidil éter (BDDE) como agente de reticulación.
12. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el gel reticulado es un gel de fase simple viscoelástico predominantemente elástico.
13. Uso de un gel reticulado obtenido al implementar un proceso como se define según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para rellenar de forma duradera los defectos de volumen de la piel y, especialmente, para rellenar las arrugas.

Figura 1

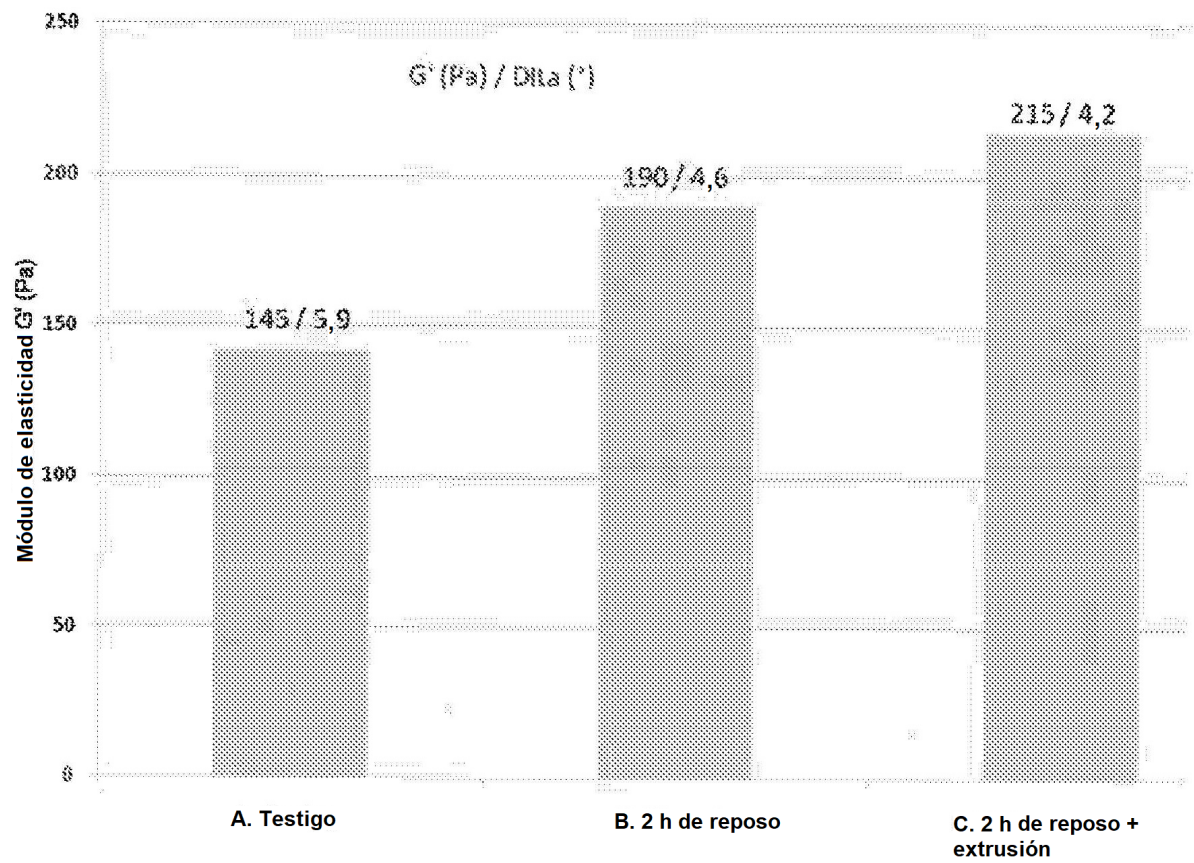


Figura 2

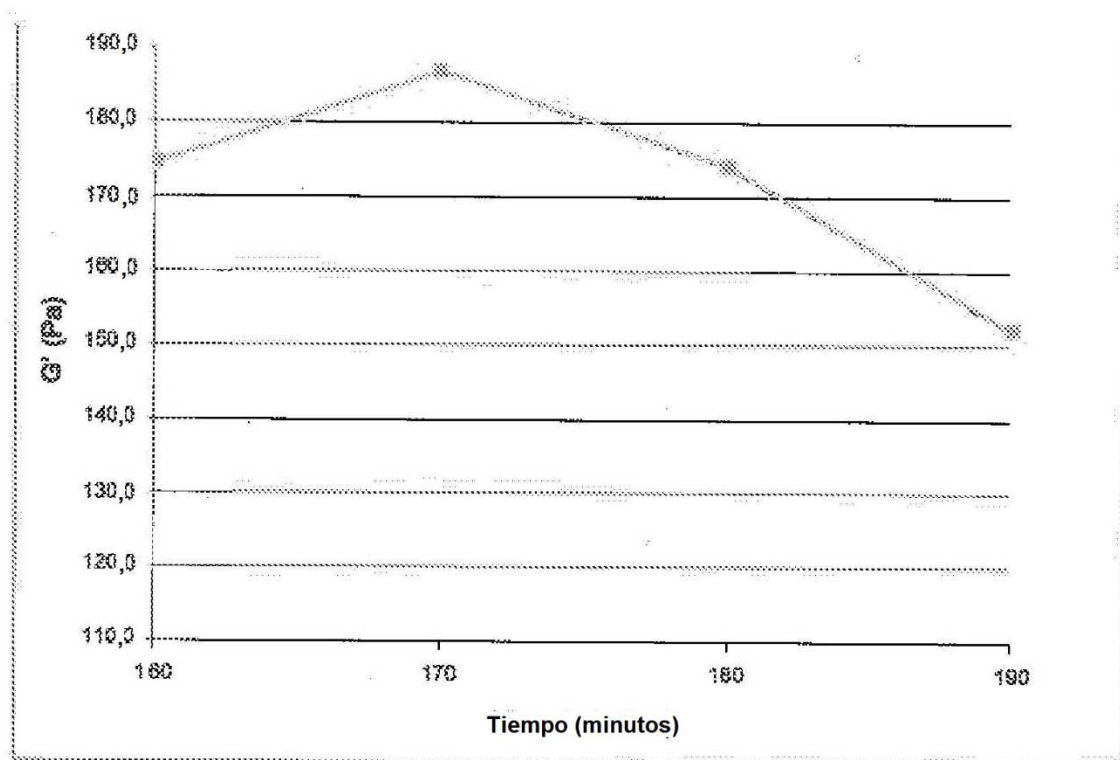


Figura 3

