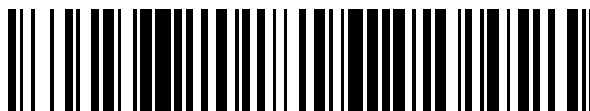


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 225**

51 Int. Cl.:

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2010** **E 10750046 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014** **EP 2470230**

54 Título: **Geles viscoelásticos como nuevos agentes de relleno**

30 Prioridad:

27.08.2009 IT PD20090246

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

17.10.2014

73 Titular/es:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)

Via Ponte della Fabbrica 3/A

35031 Abano Terme (PD), IT

72 Inventor/es:

D'ESTE, MATTEO y

RENIER, DAVIDE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 509 225 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

Geles viscoelásticos como nuevos agentes de relleno

Objeto de la invención

Geles viscoelásticos como nuevos agentes de relleno.

5 Campo de la invención

El ácido hialurónico (AH) es un heteropolisacárido que consiste en restos alternados de ácido D-glucorónico y N-acetil-D-glucosamina.

El AH es un polímero de cadena lineal con un peso molecular que oscila entre 50.000 y 13×10^6 Dalton, dependiendo de la fuente de la que se obtenga y de los procedimientos de preparación usados.

10 El AH está presente en la naturaleza en geles pericelulares, en la sustancia básica del tejido conectivo de vertebrados (del que es uno de los componentes principales), en el humor vítreo y en el cordón umbilical.

El AH desempeña un papel importante en el organismo biológico como soporte estructural y mecánico para los tejidos, y como componente activo en la fisiología celular de tejidos tales como la piel, los tendones, los músculos y el cartílago.

15 Es una de las moléculas principales de la matriz cartilaginosa, y también representa el principal constituyente no proteico del líquido sinovial. Puesto que es una molécula viscoelástica muy hidrófila, dota al líquido sinovial de propiedades lubricantes; por tanto el AH se ha usado en artrosis durante más de 30 años, principalmente para el tratamiento del dolor asociado.

20 El AH también desempeña un papel fundamental en los procedimientos de reparación tisular desde el punto de vista estructural (en la organización de la matriz extracelular y la regulación de su hidratación), y como sustancia estimulante/reguladora de un amplio espectro de procedimientos fisiológicos en los que dicho polisacárido actúa directa y/o indirectamente (formación de coágulos, actividad fagocítica, proliferación de fibroblastos, neovascularización, reepitelización, etc.) (Weigel P. y col., J Theoretical Biol, 1986:219-234; Abatangelo G. y col., J Surg Res, 1983, 35:410-416; Goa K. y col., Drugs, 1994, 47:536-566). Puesto que estas propiedades se conocen desde hace bastante tiempo, el AH también se ha usado para preparar apósitos para la cicatrización de heridas, úlceras y lesiones cutáneas de orígenes diferentes.

25 El ácido hialurónico también se usa como agente de relleno para arrugas, surcos y pequeñas depresiones de la cara, e incrementar el volumen de labios y mejillas, debido a que es inmunológicamente inerte, no tóxico, biodegradable y biorreabsorbible.

30 El tratamiento a base de ácido hialurónico está indicado para la corrección de:

- el volumen y el contorno de labios,
- surcos (por ejemplo, los pliegues nasolabiales)
- remodelación del contorno facial (por ejemplo, mejillas y barbilla)
- arrugas (por ejemplo, líneas glabellares y las comisuras de la boca)
- 35 • arrugas periorbitales
- cicatrices fibrosas post-acné
- cicatrices fibrosas post-traumáticas
- manchas de tejidos blandos
- cicatrices de rinoplastia.

40 El ácido hialurónico no es un agente de relleno permanente. Esto significa que, una vez inyectado, el producto se metaboliza y es reabsorbido gradualmente por el cuerpo en un tiempo que varía según el área tratada y el tipo de preparación usada. El efecto de relleno e incremento de volumen (o atenuación de las arrugas) es inmediato, y solo dura unas pocas semanas. Los productos principales presentes en el mercado se pueden clasificar en las siguientes categorías, en base a sus diferentes tiempos de reabsorción:

- 45 • agentes de relleno de reabsorción rápida (2-3 meses)
- agentes de relleno de duración media (5-6 meses),
- agentes de relleno de reabsorción lenta (1 año cerrar para tesis tal como Restylane Sub Q (QMED, documento EP0839159).

50 En la dermis, el AH realiza funciones hidratantes debido a su alta capacidad para retener agua, y funciones estructurales como "andamiaje" debido a que, al unirse a otras sustancias, forma complejos macromoleculares que compactan la piel.

Por tanto, el mecanismo de acción consiste en un relleno volumétrico inmediato debido a las propiedades viscoelásticas del producto, y nueva síntesis de colágeno debido a la estimulación de los fibroblastos cutáneos.

No obstante, el AH es un polisacárido natural que es degradado rápidamente por las enzimas hialuronidasas presentes en el tejido conectivo; con el fin de obtener agentes de relleno cuyo efecto perdure durante varios meses, el AH se debe someter por tanto a procedimientos de reticulación que mejoran sus propiedades viscoelásticas e incrementan su tiempo de residencia. Los agentes de relleno así formados se reticulan, por ejemplo, mediante BDDE (1,4-butanodiol diglicidiléter, Restylane[®], BELOTERO[®] y Regenyal Idea) o DVS (divinil sulfona, Hylaform[®]), que crean puentes entre las moléculas de polímero. Sin embargo, el incremento del grado de reticulación desnaturaliza progresivamente el AH hasta el punto de modificar profundamente sus propiedades químicas, físicas y biológicas. Las matrices de AH reticuladas en exceso se presentan en forma de sólidos particulados que ya no son reconocidos por las células (y en particular por el sistema inmunitario) como AH; por tanto, el polisacárido se percibe como un cuerpo exógeno, lo que desencadena reacciones inflamatorias con la formación de cápsulas fibróticas a su alrededor. Además, el AH excesivamente reticulado es incapaz de estimular la regeneración de tejido dérmico/cutáneo inducida, como es sabido por resultados científicos perfectamente establecidos, por fragmentos de AH (en particular aquellos con un bajo peso molecular) que tienen el efecto de estimular la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos cutáneos.

Los agentes de relleno también se clasifican como reabsorbibles o permanentes. El tipo reabsorbible es el más biocompatible; consisten en ácido hialurónico o colágeno, modificado o presente en su forma nativa, y en consecuencia se reabsorben en un año como máximo. El tipo permanente consiste en polímeros sintéticos tales como las poliacrilamidas, moléculas reticuladas particulares que forman un gel estable cuando se combinan con el agua. El tipo permanente siempre permanece *in situ* y son muy útiles para el relleno de los labios, pero su uso no está recomendado debido a que se producen inflamaciones agudas cada vez con mayor frecuencia debido a su inserción cutánea, lo que da lugar a cápsulas fibróticas en torno al agente de relleno, que es percibido como un cuerpo exógeno y por tanto tóxico.

El documento WO 2008/068297 desvela un agente de relleno que consiste en AH reticulado con BDDE y AH tal cual en una relación de 1:1 o 1:0,05, en el que el AH libre está atrapado en la red reticulada.

El documento WO 2009/073437 describe una formulación en gel a base de polisacáridos, que incluye AH, preferentemente en forma reticulada, asociado a un inhibidor de la degradación del propio polisacárido. Entre los diversos sistemas de reticulación, también se menciona el BDDE.

El documento WO 99/24070 desvela composiciones viscoelásticas en las que el AH está esterificado y posiblemente está asociado a derivados autorreticulados del AH, y asociado adicionalmente a fármacos o sustancias biológicamente activas.

El documento WO 97/49412 describe composiciones para el tratamiento de artropatías constituidas por AH autorreticulado, opcionalmente asociado a AH tal cual.

El solicitante ha perfeccionado un nuevo tipo de biomaterial como nuevo agente de relleno y/o como nuevo producto para modelar el cuerpo, formado al mezclar dos derivados reticulados del AH de formas diferentes pero complementarias, para obtener un sustituto de piel/tejido que permite la hidratación inmediata (en consecuencia el relleno inmediato) de la piel/tejido tratados, mientras mantiene tiempos de degradación *in vivo* muy prolongados eliminando la necesidad de inyecciones repetidas, y reduciendo así los efectos secundarios.

Los nuevos biomateriales a los cuales se refiere la presente invención presentan características de biocompatibilidad particulares idénticas a las del ácido hialurónico tal cual, pero su biodegradabilidad es diferente; cuando se implantan *in vivo*, su tiempo de residencia es mucho más prolongado que el del AH sin modificar, permitiendo así la regeneración/reconstrucción inmediata del tejido dérmico/cutáneo que haya perdido su compactibilidad original.

Descripción detallada de la invención

El solicitante ha perfeccionado un nuevo tipo de biomaterial como agente de relleno y/o como nuevo producto para el modelado del cuerpo basado en la mezcla de dos derivados del AH con características diferentes, pero complementarias, para obtener un nuevo producto para inyección en el tratamiento de manchas de la piel, en dermatología, en dermocosmética y/o en cirugía estética, que produce:

1. hidratación dérmica/cutánea inmediata
2. relleno inmediato del tejido tratado
3. tiempos de degradación *in vivo* muy prolongados
4. efectos secundarios reducidos.

Los nuevos biomateriales consisten en:

- ácido hialurónico autorreticulado (ACP) mezclado con
- ácido hialurónico reticulado con BDDE (HBC).

El ACP usado en la presente invención, preparado como se describe en el documento EP 0341745, posee un grado medio de reticulación de entre el 4 y el 5 % y preferentemente se prepara usando AH con un peso molecular medio (PM) de 200 KDa. Cuando se hidrata se presenta en forma de gel autorreticulado sin moléculas exógenas respecto al polisacárido nativo, debido a que surge del enlace éster entre los grupos carboxilo e hidroxilo de la misma cadena polisacáridica y/o cadenas adyacentes. Por tanto está desprovisto de inmunotoxicidad, es tan biocompatible como el AH nativo, altamente hidratante, y fácilmente biodegradable por las hialuronidasas, liberando moléculas con un bajo peso molecular capaces de estimular la síntesis de colágeno para mejorar el tono y la elasticidad del tejido cutáneo.

El ACP es el derivado del AH responsable de la hidratación inmediata (que da lugar a un relleno dérmico instantáneo) provocada por la inyección intradérmica del agente de relleno al cual se refiere la presente invención.

El AH reticulado con BDDE (una molécula que contiene grupos epoxi para la formación de éteres sobre los hidroxilos primarios del AH) contiene la molécula de reticulación, y por tanto es más resistente a la degradación enzimática puesto que posee enlaces éter que estabilicen el polisacárido, dotando al producto obtenido de un tiempo de residencia prolongado.

La mezcla de las dos especies de AH reticulado da lugar a la formación de un nuevo biomaterial que tiene características de biocompatibilidad idénticas a las del ácido hialurónico nativo, pero una biodegradabilidad diferente de manera que, cuando se implanta *in vivo*, su tiempo de residencia es mucho más prolongado que el del AH sin modificar, permitiendo así la regeneración/reconstrucción del tejido dérmico que haya perdido su compactibilidad original. El solicitante también ha demostrado que su asociación da lugar, de forma bastante inesperada, a un tiempo de degradación *in vivo* mucho mayor que el de los agentes de relleno de referencia comerciales formados por el mismo tipo de AH reticulado con BDDE, con el consiguiente incremento del tiempo de residencia. Por último, el solicitante reivindica los nuevos biomateriales para su uso como agentes de relleno y/o como nuevos productos para el modelado del cuerpo en el tratamiento de manchas cutáneas, en dermatología, en dermocosmética y/o en cirugía estética.

La naturaleza químicamente heterogénea del nuevo biomaterial permite que las propiedades del producto final se puedan modular modificando convenientemente la relación ponderal entre los constituyentes. Los dos AH se pueden mezclar en una relación de ACP:HBC de 10:90 a 90:10. La relación ponderal se seleccionará en base a la viscosidad final deseada, que dependerá del sitio tratado. Si se han de tratar zonas que requieran la implantación de grandes cantidades de biomaterial, como en el caso del relleno de los senos, las nalgas, las mejillas o la barbilla, o arrugas de expresión profundas, el biomaterial usado preferentemente presentará una buena compactibilidad, y por tanto una viscosidad adecuada para obtener un gel con una consistencia excelente y una velocidad de biodegradación baja; en este caso la mezcla de ACP:HBC estará entre 10:90 y 50:50, y preferentemente entre 25:75, debido a que el producto obtenido al incrementar la fracción ponderal del HBC es más adecuado para producir un efecto de aumento de volumen más duradero. No obstante, si se han de tratar surcos en los labios o arrugas finas en la frente, la relación de ACP:HBC preferentemente estará entre 90:10 y 50:50, puesto que una mayor fracción de ACP en el agente de relleno produce un material más adecuado para la biorrevitalización de la piel y la corrección de líneas finas, pequeñas arrugas de expresión y similares. Además, la aguja debe tener un calibre muy fino; por tanto el gel se debe extruir fácilmente y debe ser menos viscoso que el descrito anteriormente. Las propiedades biológicas del producto en consecuencia se pueden ajustar en base a la relación de ACP:HBC seleccionada.

Siendo igual la composición de ACP/HBC, las propiedades del biomaterial también se pueden modular de forma conveniente por medio de una selección específica del vehículo en el cual se prepara: por ejemplo, una mezcla de ACP:HBC a 50:50 en peso dispersa en solución salina (NaCl al 0,9 %) será más viscosa que si se dispersa en tampón fosfato a pH = 6,95; en consecuencia, para esta mezcla específica, la solución salina es un medio más adecuado para la formulación de productos con una velocidad de dispersión *in situ* limitada. Los materiales en los que prevalece el HBC presentan el perfil opuesto. Las propiedades viscoelásticas del material en consecuencia afectan al comportamiento del producto.

La presente invención también se refiere a dos procedimientos de preparación de los biomateriales descritos anteriormente: procedimiento A y procedimiento B.

Los nuevos procedimientos A y B están divididos en dos etapas:

1. procedimiento para la producción del derivado de HBC, y
2. procedimiento para su mezcla con el derivado de ACP.

Las dos etapas dan lugar a la producción de productos con un grado de pureza muy elevado. Con los procedimientos usados normalmente para la producción de AH reticulado con BDDE, las purificaciones se llevan a cabo lavando la masa de gel obtenida, o mediante diálisis. En ambos casos, no se puede conseguir la eficiencia óptima de purificación debido a la naturaleza de la matriz del gel que, debido a su tendencia a hincharse, incorpora grandes cantidades de disolvente. Estos geles tienen una movilidad y capacidad de transporte bajas, y tienden a precipitar en forma de gomas gelatinosas. El precipitado obtenido de esta forma, aislado como un sólido, tiene propiedades de solubilidad y reológicas diferentes cuando se rehidrata, en particular la capacidad de hincharse, la

elasticidad y la homogeneidad (características esenciales para un agente de relleno), respecto al gel antes de la purificación.

No obstante, el procedimiento descrito de aquí en adelante por el solicitante como procedimiento A precipita el producto en forma de polvo finamente dividido, que en consecuencia se puede lavar fácilmente. Por otra parte, la selección cuidadosa de las condiciones de reacción produce, tras el aislamiento por precipitación y lavado, un producto con una capacidad de reconstrucción del gel por medio de rehidratación y esterilización que da lugar a un biomaterial que tiene características de elasticidad y homogeneidad reproducibles y perfectamente normalizadas.

El procedimiento B no incluye la etapa de precipitación del producto HBC en forma de polvo; la purificación y homogenización del gel (obtenido después de la mezcla de HBC con ACP) se lleva a cabo en la etapa de trituración, que supone su paso a través de un filtro con un coeficiente de retención de material particulado de entre 25 y 150 μm . Esta etapa purifica el gel final y lo hace perfectamente homogéneo.

El AH usado en la presente invención para preparar los derivados descritos anteriormente (HBC, ACP) puede proceder de cualquier fuente, tal como la extracción a partir de crestas de gallo o de fermentación, y tienen un peso molecular medio de entre 400 y 3×10^6 Da, preferentemente entre 1×10^5 Da y 1×10^6 Da, y aún más preferentemente entre 200.000 y 1×10^6 Da.

El nuevo procedimiento A de fabricación comprende las siguientes etapas:

Síntesis de HBC reticulado

1. Disolución en solución alcalina (preferentemente NaOH 0,15 M - 0,35 M) de diepóxido de BDDE en una relación estequiométrica de entre el 2,5 y el 25 % molar, preferentemente entre el 5 y el 15 % molar (en función del uso previsto del producto; cuanto mayor es el porcentaje de BDDE, más prolongado será el tiempo de residencia) de las unidades de repetición del ácido hialurónico, seguido por
2. Dispersión de AH en la solución mencionada en el párrafo anterior, a temperatura ambiente. La concentración de AH debe estar entre 80 y 300 mg/ml, y el tiempo de homogeneización entre 30 y 300 minutos.
3. Desencadenamiento de la reacción mediante activación por calor, dicha solución que se calienta a una temperatura de entre 35 y 55 °C durante entre 2 y 36 horas.
4. Extrusión de la masa obtenida a través de un tamiz metálico, para reducirla a partículas con un tamaño de 600 μm aproximadamente.
5. La hidratación del gel mediante su dilución con agua en un factor de 3 a 25, durante un tiempo de entre 4 y 48 horas a una temperatura de 4 a 24 °C.
6. Corrección del pH a neutro con una solución acuosa de HCl que tiene una concentración de 0,5 a 5 moles/l, preferentemente de 1 a 2 moles/l.
7. Adición de 2,5 volúmenes de disolvente orgánico soluble en agua tal como etanol, metanol, isopropanol, n-propanol, dioxano, acetonitrilo, acetona y/o sus mezclas (preferentemente etanol y acetona), hasta que se obtiene el producto en forma de polvo precipitado.
8. Lavado con disolventes orgánicos tales como etanol, metanol, isopropanol, n-propanol, dioxano, acetonitrilo, acetona y/o sus mezclas (preferentemente etanol y acetona), que contienen una fracción de agua inferior al 35 %.
9. Secado al vacío a una temperatura de entre 30 y 45 °C durante entre 2 y 7 días, y en cualquier caso hasta la eliminación de los disolventes residuales por debajo de 400 ppm, para obtener un polvo blanco de HBC.

Mezcla de ACP con HBC

10. Mezcla del polvo de HBC con el polvo de ACP en una relación de ACP:HBC de entre 10:90 y 90:10 (en función del uso elegido, como se ha descrito anteriormente).
11. Hidratación con solución salina o tampón fosfato, preferentemente solución salina (que puede contener otros excipientes tales como lidocaína), que da lugar a una concentración total de AH de entre 12 y 27 mg/ml, preferentemente entre 20 y 25 mg/ml, a una temperatura de entre 0 y 26 °C.
12. Extrusión a través de un tamiz con una malla de entre 50 y 500 μm , preferentemente entre 100 y 250 μm . Dicha filtración se lleva a cabo a temperatura ambiente o a una temperatura de entre 25 y 65 °C, preferentemente entre 40 y 60 °C.
13. Llenado de las jeringas, fabricadas preferentemente en vidrio o material polimérico, con el producto obtenido.
14. Esterilización por calor con vapor saturado a una temperatura de entre 120 y 124 °C (preferentemente $121,5 \pm 18$ °C) durante al menos 10 min.

El nuevo procedimiento B de fabricación comprende las siguientes etapas:

Síntesis de HBC reticulado

1. Disolución en solución alcalina (preferentemente NaOH 0,15 M - 0,35 M) de diepóxido de BDDE en una relación estequiométrica del 2,5 al 25 % molar, preferentemente entre el 5 y el 15 % molar (en función del uso previsto del producto) de las unidades de repetición del ácido hialurónico, seguido de

2. Dispersión del AH en la solución mencionada en el párrafo anterior, a temperatura ambiente. La concentración de AH debe estar entre 80 y 300 mg/ml, y el tiempo de homogeneización entre 30 y 300 minutos.

3. Desencadenamiento de la reacción mediante la activación por calor, dicha solución que se calienta a una temperatura de entre 35 y 55 °C durante entre 2 y 36 horas.

4. Corrección del pH a neutro con una solución acuosa de HCl que tiene una concentración de 0,05 a 1 moles/l, preferentemente de 0,1 moles/l.

5. Hidratación del gel mediante su dilución con agua en un factor de 3 a 20 durante un tiempo de entre 4 y 48 horas a una temperatura de 4 a 24 °C. Esta solución puede contener otros excipientes, tales como NaCl, sales de sodio o potasio del ácido fosfórico, y lidocaína, preferentemente en forma de sal de clorhidrato. Las sales de sodio (cloruro o fosfato) tienen la función de mantener la osmolaridad adecuada del producto, y mantener el pH a un valor compatible con los tejidos. En una realización preferida de la invención, se añade NaCl en una cantidad tal que la solución final contiene una concentración de entre el 0,8 y 1,0 % del mismo, preferentemente el 0,9 %; el clorhidrato de lidocaína, si está presente, se añade en una cantidad tal que la formulación final contiene una cantidad de entre 2,2 y 3,2 mg/ml del mismo, preferentemente 2,7 mg/ml.

Mezcla de ACP con HBC

6. Mezcla del gel de HBC con polvo de ACP en una relación de ACP:HBC de entre 10:90 y 90:10 (en peso del principio activo) en función del uso seleccionado para el nuevo agente de relleno, como se ha descrito anteriormente. De forma alternativa, el ACP se puede mezclar con HBC partiendo de ambos componentes en forma de gel, usando un sistema de agitación adecuado (preferentemente con una pala orbital) durante un tiempo de entre 30 minutos y 24 horas a una temperatura de entre 0 y 26 °C.

7. Trituración y homogeneización pasando a través de un filtro con un coeficiente de retención de material particulado de entre 25 y 150 µm, preferentemente entre 40 y 110 µm. Si la viscosidad es excesiva, la operación se puede realizar en caliente, a una temperatura de entre 25 y 65 °C.

8. Llenado de las jeringas, fabricadas en vidrio o en material polimérico, con el producto obtenido.

9. Esterilización por calor con vapor de agua saturado a una temperatura de entre 120 y 124 °C (preferentemente $121,5 \pm 1$ °C) durante al menos 10 min.

Algunos ejemplos de preparación del nuevo agente de relleno de acuerdo con la invención se describen a continuación, a modo de ejemplo y no de limitación.

Ejemplo 1: Síntesis de HBC 500 (AH 500-730 kDa)

Procedimiento A

0,075 moles de AH con un peso molecular de 500-730 kDa, producido por fermentación, se dispersan en 215 ml de una solución de NaOH 0,25 M que contiene 1,41 ml de BDDE. A continuación la mezcla se calienta a 42 °C y se hace reaccionar durante 3 horas. A continuación la mezcla se hidrata durante 24 horas con 300 ml de una solución que contiene una cantidad estequiométrica de HCl para ajustar el pH a neutro. El volumen total se lleva hasta 750 ml y se precipita con 2,5 volúmenes de etanol para obtener un precipitado filtrable y decantable. La mezcla se lava con etanol al 75 % hasta su purificación integral, verificada midiendo la conductividad específica de los disolventes de lavado, que debe ser inferior a 30 µS/cm, y se seca al vacío a 40 °C durante 5 días. El producto HBC 500 se obtiene con un rendimiento en peso del 87 %.

Ejemplo 2: Síntesis de HBC 1000 (AH 1MDa)

Procedimiento A

1,60 g de AH con un peso molecular medio de 1 MDa, producido por fermentación, se dispersan en 20 ml de una solución de NaOH 0,25 M que contiene 75 µl de BDDE. A continuación la mezcla se calienta a 42 °C y se hace reaccionar durante 2 horas. A continuación la mezcla se hidrata durante 24 horas con 20 ml de una solución que contiene una cantidad estequiométrica de HCl para ajustar el pH a neutro. El volumen total se lleva hasta 75 ml y el HBC se precipita con 2,5 volúmenes de etanol para obtener un precipitado filtrable y decantable. La mezcla se lava con etanol al 75 % hasta su purificación integral, verificada midiendo la conductividad específica de los disolventes de lavado, que debe ser inferior a 30 µS/cm, y se seca al vacío a 40 °C durante 5 días. El producto HBC 1000 se obtiene con un rendimiento en peso del 90 %.

Ejemplo 3: Síntesis de HBC 200 (AH 200 kDa)

Procedimiento A

2,55 g de AH con un peso molecular medio de 200 KDa, producido por fermentación, se dispersan en 20 ml de una solución de NaOH 0,25 M que contiene 63 µl de BDDE. A continuación la mezcla se calienta a 42 °C y se hace reaccionar durante 150 minutos. A continuación la mezcla se hidrata durante 24 horas con 20 ml de una solución que contiene una cantidad estequiométrica de HCl. El volumen total se lleva hasta 75 ml y se precipita con 2,5 volúmenes de etanol para obtener un precipitado filtrable y decantable. La mezcla se lava con etanol al 75 % hasta su purificación integral, verificada midiendo la conductividad específica de los disolventes de lavado, que debe ser

inferior a 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y se seca al vacío a 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. El producto HBC 200 se obtiene con un rendimiento en peso del 85 %.

Ejemplo 4: Preparación de gel ACP:HBC 500, en una relación de 50:50

Procedimiento A

- 5 1,00 g de HBC 500, preparado como se describe en el Ejemplo 1, se mezcla con 1,00 g de éster interno de AH ACP. El polvo se hidrata con 100 ml de solución salina estéril al 0,9 % en peso/volumen a una temperatura de 8 $^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas. El gel obtenido se calienta a 48 $^{\circ}\text{C}$ y se filtra a través de un tamiz metálico con una malla de 0,17 mm, y a continuación se distribuye entre jeringas de vidrio de 1 ml, que posteriormente se someten a un ciclo de esterilización con vapor saturado a una temperatura de 121 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Se obtiene un gel homogéneo
10 estéril adecuado para su administración local.

Ejemplo 5: Preparación de gel ACP:HBC 1000, en una relación de 30:70

Procedimiento A

- 15 1,40 g de HBC 1000, preparado como se describe en el Ejemplo 2, se mezclan con 0,60 g de éster interno de AH ACP. El polvo se hidrata con 100 ml de solución salina estéril al 0,9 % en p/v a una temperatura de 8 $^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas. El gel obtenido se calienta a 48 $^{\circ}\text{C}$ y se filtra a través de un tamiz metálico con una malla de 0,17 mm, y a continuación se distribuye entre jeringas de vidrio de 1 ml, que posteriormente se someten a un ciclo de esterilización con vapor saturado a una temperatura de 121 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Se obtiene un gel homogéneo estéril adecuado para su administración local.

Ejemplo 6: Preparación de gel ACP:HBC 500, en una relación de 25:75

Procedimiento A

- 20 1,875 g de HBC 500, preparado como se describe en el Ejemplo 1, se mezclan con 0,625 g de éster interno de AH ACP. El polvo se hidrata con 100 ml de solución salina estéril al 0,9 % en p/v a una temperatura de 8 $^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas. El gel obtenido se calienta a 48 $^{\circ}\text{C}$ y se filtra a través de un tamiz metálico con una malla de 0,19 mm, y a continuación se distribuye entre jeringas de vidrio de 1 ml, que posteriormente se someten a un ciclo de esterilización con vapor saturado a una temperatura de 121 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 minutos. Se obtiene un gel homogéneo
25 estéril adecuado para su administración local.

Ejemplo 7: Preparación de gel ACP:HBC 1000, en una relación de 75:25

Procedimiento A

- 30 0,50 g de HBC 1000, preparado como se describe en el Ejemplo 2, se mezclan con 1,50 g de éster interno de AH ACP. El polvo se hidrata con 100 ml de solución salina estéril al 0,9 % en p/v a una temperatura de 8 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. El gel obtenido se calienta a 42 $^{\circ}\text{C}$ y se filtra a través de un tamiz metálico con una malla de 0,17 mm, y a continuación se distribuye entre jeringas de vidrio de 2 ml, que posteriormente se someten a un ciclo de esterilización con vapor saturado a una temperatura de 121 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 minutos. Se obtiene un gel homogéneo estéril adecuado para su administración local.

Ejemplo 8: Preparación de gel HYADD:HBC 500, en una relación de 60:40

Procedimiento A (ejemplo comparativo)

- 40 1,20 g de HBC 500 preparado como se describe en el Ejemplo 1 se mezclan con 0,80 g de hexadecilamida del AH (HYADD). El polvo se hidrata con 100 ml de solución salina estéril al 0,9 % en p/v a una temperatura de 8 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. El gel obtenido se calienta a 52 $^{\circ}\text{C}$ y se filtra a través de un tamiz metálico con una malla de 0,17 mm, y a continuación se distribuye entre jeringas de vidrio de 1 ml, que posteriormente se someten a un ciclo de esterilización con vapor saturado a una temperatura de 121 $^{\circ}\text{C}$ durante 11 minutos. Se obtiene un gel homogéneo estéril adecuado para su administración local.

Ejemplo 9: Preparación de gel HYADD:HBC 500, en una relación de 40:60

Procedimiento A (ejemplo comparativo)

- 45 8,0 g de sal sódica del AH con un peso molecular medio de 500-730 kDa, producido por fermentación, se dispersan en 40 ml de una solución de NaOH 0,25 M que contiene 0,44 ml de BDDE. La mezcla se calienta a 41,5 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas y 40 minutos. A continuación, se hidrata durante toda la noche con 100 ml de una solución de HCl 0,1 M y 200 ml de agua. Se añaden 50 ml de una solución saturada de NaCl, y la mezcla se deja hinchar durante toda la noche. Al día siguiente, se añaden 170 ml de acetona y 30 ml de solución saturada de NaCl, y la mezcla se precipita
50 por adición lenta de un litro de etanol. El precipitado se lava con el mismo disolvente hasta que se hayan eliminado los residuos de NaCl, y a continuación se seca con una estufa a 35 $^{\circ}\text{C}$ al vacío hasta que se hayan eliminado los

disolventes residuales. El polvo de HBC así obtenido se mezcla en una relación de 5:3 con HYADD, preparado como se describe en la patente EP 1853279. Los polvos mezclados se hidratan con solución salina, dando lugar a una concentración total de 20 mg/ml (correspondientes a 12,5 mg/ml de HBC y 7,5 mg/ml de HYADD4). El producto se deja hinchar durante toda la noche a 5 °C, y al día siguiente se filtra a través de una membrana plana con una tasa nominal de retención de material particulado de 100 µm. Jeringas de vidrio de 1 ml se llenan con el producto obtenido de este modo y se esterilizan en un ciclo con F0 = 13 a 121,5 °C.

Ejemplo 10: Relleno cutáneo y tolerabilidad del gel de HYADD:HBC en el modelo de administración intradérmica de conejo (ejemplo comparativo)

El fin del experimento era evaluar el relleno cutáneo, la aparición de cualquier evento adverso macroscópico, y la respuesta del tejido provocada por el gel de HYADD:HBC (preparado como se describe en el Ejemplo 9) inyectado en el tejido intradérmico del conejo, en comparación con el relleno comercial BELOTERO®.

Para dicha evaluación, los geles probados se administraron por vía intradérmica a conejos machos NZW-KBL que pesan 1,8-2,3 kg.

Diseño del experimento:

Los animales fueron anestesiados por administración intravenosa de ketamina y xilazina. Se usaron 3 animales para cada agente de relleno sometido a ensayo.

Día 0: T0

- Inyección de muestras (1 ml de hidrogel por muestra) después de afeitar la espalda de los conejos;
- Medición de la hinchazón en todos los conejos y la observación macroscópica de los eventos adversos.

Día 7: T7

- Medición del volumen de hinchazón y observación macroscópica de los eventos adversos.

El volumen de hinchazón se calculó con la fórmula:

$$(2/3 \times \pi) \times (r1) \times (r2) \times (r3)$$

en la que: (r1), (r2) y (r3) representan la anchura, longitud y altura de la hinchazón respectivamente, medidas con un calibrador.

Resultados:

El nuevo agente de relleno no provocó ningún evento inflamatorio en la dermis tratada

Los resultados obtenidos para el tiempo de residencia se muestran en la Figura 1: La cantidad de hinchazón evaluada en la primera semana de tratamiento (expresada en mm³) demuestra que el gel según la invención es capaz de inducir un volumen de hinchazón de la piel más grande que el control, que sigue siendo alta incluso después de 7 días, de nuevo en un grado muy superior al agente de relleno comercial usado como comparador. Este hallazgo confirma claramente que los nuevos agentes de relleno producen inmediatamente una dilatación dérmica significativa, y este efecto se puede atribuir a la presencia del derivado de HYADD que, debido a sus características químicas/reológicas, ha demostrado ser esencial para promover el relleno cutáneo inmediato que permanece estable en el tiempo.

Ejemplo 11: Síntesis de HBC 500 (AH 500-730 kDa)

Procedimiento B

18,75 g de sal sódica de AH con un peso molecular de 500-730 kDa, producido por fermentación, se dispersan en 133 ml de una solución de NaOH 0,25 M que contiene 885 µl de BDDE. A continuación la mezcla se calienta a 45 °C durante 2,5 horas. La mezcla se hidrata durante toda la noche con 0,62 l de una solución que contiene una cantidad estequiométrica de HCl, 2,65 g de NaCl y 2,7 g de clorhidrato de lidocaína, con agitación lenta.

Ejemplo 12: Preparación de gel de ACP:HBC 500, en una relación de 25:75

Procedimiento B

6,25 g de éster interno del ácido hialurónico ACP 200 se solubilizan en 250 ml de una solución que contiene 4,4 g de NaCl con agitación lenta. Cuando la hidratación se ha completado, el gel se combina con el gel obtenido según el Ejemplo 11 en un mezclador equipado con un sistema para mezclar semisólidos, hasta que sea homogéneo. El gel obtenido se extruye a través de un filtro de membrana plana con una tasa nominal de retención de material particulado de 70 µm. El producto así obtenido se introduce en jeringas de vidrio y se esteriliza en un ciclo con F0 = 13 a 121,5 °C.

Ejemplo 13: Preparación de gel de HYADD:HBC 500, en una relación de 25:75Procedimiento B (ejemplo comparativo)

- 5 6,25 g de hexadecilamida de HYADD se solubilizan en 250 ml de una solución que contiene 4,4 g de NaCl con agitación lenta. Cuando la hidratación se ha completado, el gel se combina con el gel obtenido según el Ejemplo 11 en un mezclador equipado con un sistema de mezcla orbital, hasta que sea homogéneo. El gel obtenido se extruye a través de un filtro de membrana plana con una tasa nominal de retención de material particulado de 70 µm. El producto así obtenido se introduce en jeringas de vidrio y se esteriliza en un ciclo con F0 = 13 a 121,5 °C.

Ejemplo 14: Síntesis de HBC 500 (AH 500-730 kDa)Procedimiento B

- 10 125 g de sal sódica de AH con un peso molecular de 500-730 kDa, producida por fermentación, se dispersan en 1,33 l de una solución de NaOH 0,25 M que contiene 9,4 ml de BDDE. La mezcla se calienta a 45 °C durante 2,5 horas. La mezcla se hidrata durante toda la noche con 6,2 l de una solución que contiene una cantidad estequiométrica de HCl, 26,5 g de NaCl y 27 g de clorhidrato de lidocaína, con agitación lenta.

Ejemplo 15: Preparación de gel de ACP:HBC 500, en una relación de 50:50

- 15 Procedimiento B

- 125 g de éster interno del ácido hialurónico ACP200 se solubilizan en 2,5 l de una solución que contiene 44 g de NaCl con agitación lenta. Cuando la hidratación se ha completado, el gel se combina con el gel obtenido según el Ejemplo 14 en un mezclador equipado con un sistema de mezcla orbital con un deflector y un raspador. El gel obtenido se extruye a través de un filtro de membrana plana con una tasa nominal de retención de material particulado de 45 µm. El producto así obtenido se introduce en jeringas de vidrio y se esteriliza en un ciclo con F0 = 13 a 121,5 °C.

Ejemplo 16: Relleno cutáneo y tolerabilidad del gel de ACP:HBC en el modelo de administración intradérmica en conejo

- 25 El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 10, usando gel preparado como se describe en los Ejemplos 11-12, y comparándolo con el control Belotero® y con un segundo relleno comercial, Regenyal Idea.

Para este experimento, el solicitante no solo determina el volumen de hinchazón de la piel causada por el tratamiento, sino que también evalúa el tiempo de residencia total del gel/agente de relleno según la invención en comparación con dos agentes de relleno comerciales bien conocidos que representan el comparador final porque ambos constan de AH reticulado con BDDE.

- 30 La hinchazón de la piel en los conejos tratados se midió cada dos semanas (con la observación macroscópica de eventos adversos) para un máximo de 96 días.

Resultados:

- 35 La Figura 2 muestra los resultados obtenidos: se confirmaron los hallazgos descritos más arriba, en concreto, la hidratación inmediata de la dermis tratada (principalmente en los primeros 7 días) en un grado sorprendentemente superior al de los controles; por otra parte, el tamaño de la hinchazón de la piel fue más evidente y el tiempo de residencia más prolongado que los de los dos comparadores comerciales. Al final del experimento, el nuevo agente de relleno según la invención aún estaba presente, mientras que los dos controles casi habían desaparecido.

REIVINDICACIONES

1. Biomateriales que se pueden obtener mezclando

- el derivado autorreticulado de ácido hialurónico (ACP) con
- el derivado (HBC) de ácido hialurónico reticulado con 1,4-butanodiol diglicidiléter (BDDE)

5 en una relación ponderal de entre 10:90 y 90:10 como nuevos agentes de relleno y/o como productos para el modelado del cuerpo.

2. Biomateriales según la reivindicación 1, en los que la relación ponderal es de 90:10 a 50:50, como agentes de relleno biorrevitalizantes.

10 3. Biomateriales según la reivindicación 1, en los que la relación ponderal es de 10:90 a 50:50 con un efecto de aumento del volumen.

4. Biomateriales según la reivindicación 3, en los que la relación ponderal es de 25:75.

5. Procedimiento de mezcla de ACP con HBC preparado mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- a. disolución en solución alcalina de diepóxido de BDDE en una relación estequiométrica del 2,5 al 25 % molar de las unidades de repetición del ácido hialurónico, seguido por
 - b. dispersión de ácido hialurónico (AH) en la solución mencionada en el apartado a), a temperatura ambiente;
 - c. desencadenamiento de la reacción mediante la activación por calor, con la solución mencionada en el apartado b) que se calienta a una temperatura de entre 35 y 55 °C durante entre 2 y 36 horas;
 - d. extrusión de la masa obtenida a través de un tamiz metálico, para reducirla a partículas con un tamaño de 600 µm aproximadamente;
 - e. hidratación del gel obtenido diluyéndolo con agua en un factor de 3 a 20;
 - f. corrección del pH a neutro con una solución acuosa de HCl;
 - g. precipitación con un disolvente orgánico soluble en agua hasta que el producto se obtiene en forma de polvo;
 - h. lavado con disolventes orgánicos que contienen agua;
 - i. secado al vacío hasta que se hayan eliminado los disolventes residuales por debajo de 400 ppm y se obtenga un polvo de HBC;
- en el que el procedimiento de mezcla comprende las siguientes etapas:
- j. mezcla de polvo de ACP con polvo de HBC en una relación de ACP:HBC de entre 90:10 y 10:90;
 - k. hidratación con solución salina o tampón fosfato, que da lugar a una concentración total de AH de entre 12 y 27 mg/ml;
 - l. extrusión a una temperatura de entre 25 y 65 °C a través de un tamiz con una malla de entre 50 y 500 µm;
 - m. llenado de la jeringa;
 - n. esterilización por calor con vapor de agua saturado a una temperatura de entre 120 y 124 °C durante al menos 10 min.

6. Procedimiento de mezcla de ACP con HBC preparado mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- a. disolución en solución alcalina de diepóxido de BDDE en una relación estequiométrica del 2,5 al 25 % molar de las unidades de repetición del ácido hialurónico, seguido por
 - b. dispersión de AH en la solución mencionada en el apartado a), a temperatura ambiente;
 - c. desencadenamiento de la reacción mediante la activación por calor, con la solución mencionada en el apartado b) que se calienta a una temperatura de entre 35 y 55 °C durante entre 2 y 36 horas;
 - d. corrección del pH a neutro con una solución acuosa de HCl;
 - e. hidratación del gel obtenido diluyéndolo con agua en un factor de 3 a 20;
- en el que el procedimiento de mezcla comprende las siguientes etapas:
- f. mezcla de gel o polvo de ACP con HBC en forma de gel en una relación de ACP:HBC de entre 90:10 y 10:90;
 - g. trituración y homogeneización pasando a través de un filtro con un coeficiente de retención de material particulado de entre 25 y 150 µm;
 - h. llenado de la jeringa;
 - i. esterilización por calor con vapor saturado a una temperatura de entre 120 y 124 °C durante al menos 10 min.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 5 o 6, en el que el AH usado para la preparación de los derivados de HBC y ACP tiene un peso molecular medio de entre 400 y 3×10^6 Da, preferentemente entre 1×10^5 Da y 1×10^6 Da, y más preferentemente entre 200.000 y 1×10^6 Da.

8. Biomateriales obtenidos según la reivindicación 6, en los que la relación ponderal de ACP:HBC es de 25:75.

55 9. Biomateriales según las reivindicaciones anteriores, en los que el vehículo es solución salina.

10. Biomateriales según las reivindicaciones anteriores, que contienen lidocaína.
 11. Biomateriales según la reivindicación 8, que contienen lidocaína, en los que el vehículo consiste en solución salina.
 12. Biomateriales según las reivindicaciones anteriores para su uso como nuevos agentes de relleno y/o como nuevos productos para el modelado del cuerpo en el tratamiento de manchas de la piel, en dermatología, en dermocosmética y/o en cirugía estética.
- 5

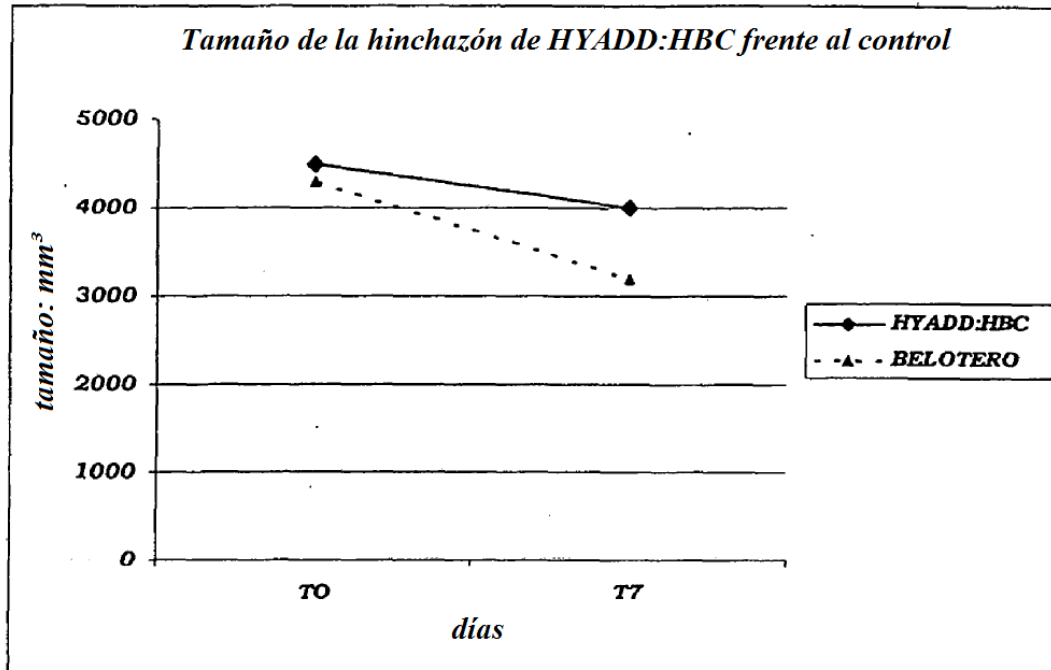


Figura 1

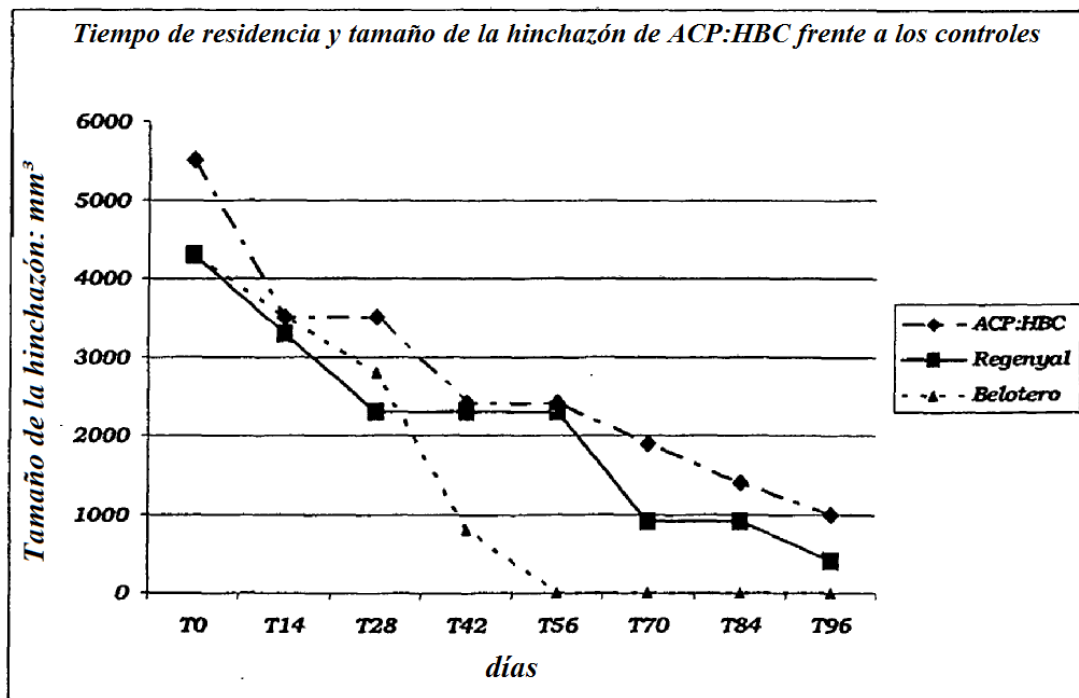


Figura 2