

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 388**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2011** **E 11711228 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2550027**

54 Título: **Hidrogeles reticulados de polisacárido y proteína-polisacárido para aumento de tejido blando**

30 Prioridad:

22.03.2010 US 316283 P

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

05.10.2016

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)

**2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**GUILLEN, KARINA, HEREDIA y
TEZEL, AHMET**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 585 388 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

Hidrogeles reticulados de polisacárido y proteína-polisacárido para aumento de tejido blando

Fundamento

5 Se han desarrollado varios productos de relleno dérmico inyectables para tratar o corregir imperfecciones faciales, por ejemplo, arrugas y pérdida de volumen debido a los efectos naturales del envejecimiento. Los "rellenos dérmicos" inyectables restauran temporalmente una apariencia más lisa, más joven.

De forma ideal, los rellenos dérmicos son de apariencia duradera, suave, lisa y natural cuando se introducen en o por debajo de la piel. Además, estos productos son preferiblemente fáciles de introducir en un paciente usando una aguja de calibre fino y una baja fuerza de extrusión de manera que será mínima la molestia para el paciente.

10 Los rellenos de tejido blando basados en colágeno se desarrollaron hace unos 20 años, y por algún tiempo, los rellenos basados en colágeno bovino fueron los únicos rellenos dérmicos aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de EE.UU. Porque estos tempranos rellenos dérmicos estaban basados en bovinos, una de las principales desventajas a su uso ha sido el potencial de reacción alérgica en los pacientes.

15 En febrero de 2003, las composiciones de relleno de colágeno derivado de seres humanos recibió la aprobación de la FDA. Estos colágenos proporcionan la ventaja de un riesgo significativamente reducido de reacciones alérgicas. Desafortunadamente, dichas composiciones de relleno de colágeno derivado de seres humanos tienden rápidamente a degradarse poco después de la inyección.

En diciembre de 2003, se aprobó el primer relleno dérmico basado en ácido hialurónico (AH) por la FDA. Esto fue seguido rápidamente por el desarrollo de muchos otros rellenos dérmicos basados en AH.

20 El AH, también conocido como hialuronano, es un polisacárido soluble en agua, que se da de forma natural, específicamente un glucosaminoglucano, que es un componente principal de la matriz extra-celular y está ampliamente distribuido en los tejidos animales. El AH tiene excelente biocompatibilidad y no provoca reacciones alérgicas cuando se implanta en un paciente. Además, el AH tiene la capacidad de unirse a grandes cantidades de agua, haciéndolo un excelente voluminizador de tejidos blandos.

25 El desarrollo de rellenos basados en AH que muestran propiedades *in vivo* ideales además de usabilidad quirúrgica ideal se ha probado difícil. Por ejemplo, los rellenos basados en AH que muestran propiedades de estabilidad deseables *in vivo*, pueden ser tan altamente viscosos que la inyección a través de agujas de calibre fino es difícil. Por el contrario, los rellenos basados en AH que se inyectan relativamente fácilmente a través de agujas de calibre fino a menudo tienen propiedades de estabilidad relativamente inferiores *in vivo*.

30 Las estrategias de síntesis de hidrogel actuales desarrollan el reticulado de AH bajo condiciones básicas usando pequeñas moléculas para unir las respectivas cadenas. Sin embargo, bajo estas condiciones las cadenas de AH hidrolizan en fragmentos más cortos y se introducen uniones de molécula pequeña en el hidrogel.

El documento US 2007/0203095 describe un gel de AH reticulado en donde las retículas incluyen N-acilurea y/u O-acil-isourea.

35 El documento WO 2009/026158 describe una composición que comprende un polímero hidrófilo y un resto de unión a ligando unido de forma covalente al polímero.

El documento US 2009/0263447 enseña el reticulado de AH por activación del AH usando un agente de acoplamiento y la reacción del AH activado con un agente de reticulado que comprende un oligopéptido o un polipéptido.

40 Es un objetivo de la presente invención proporcionar rellenos de tejido blando estables, elásticos, con propiedades reológicas mejoradas.

Compendio

45 La presente invención se refiere a rellenos de tejido blando, por ejemplo, composiciones de relleno dérmico y sub-dérmico, en adelante, a veces, denominado de forma intercambiable como "rellenos dérmicos", "rellenos de tejido blando" o "rellenos".

Un aspecto de la invención es un hidrogel que comprende al menos un polímero biocompatible reticulado que tiene restos reticulados de longitud cero, en donde el al menos un polímero biocompatible reticulado se selecciona de ácido hialurónico reticulado y una sal de ácido hialurónico reticulado. En algunas realizaciones, la composición comprende además al menos un ingrediente activo distinto incorporado en el polímero biocompatible reticulado.

El hidrogel puede formarse haciendo reaccionar al menos un polímero biocompatible reticulable con al menos un agente de reticulado de longitud cero a pH neutro. Por ejemplo, el pH neutro puede estar entre 6,0 y 8,0, entre 6,5 y 7,5, o aproximadamente 7,0.

5 En algunas realizaciones, el polímero biocompatible reticulable es ácido hialurónico (AH) y el agente de reticulado de longitud cero es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

En algunas realizaciones, el agente de reticulado de longitud cero se hace reaccionar con el AH en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS), sulfo-NHS (o sulfonil-NHS) o 4-dimetilaminopiridina (DMAP).

En algunas realizaciones, el hidrogel incluye además al menos un segundo polímero biocompatible reticulado. El segundo polímero biocompatible reticulado puede ser, por ejemplo, una proteína tal como elastina.

10 En algunas realizaciones, el hidrogel puede incluir un agente activo seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de enzima, agentes anestésicos, neurotoxinas medicinales, antioxidantes, agentes anti-infecciosos, agentes anti-inflamatorios, agentes bloqueantes de la luz ultravioleta (UV), tintes, hormonas, inmunosupresores y combinaciones de los mismos.

15 La presente invención proporciona además un método para fabricar un hidrogel para el aumento de tejido blando. El método incluye proporcionar al menos un polímero biocompatible reticulable; disolver el al menos un polímero biocompatible reticulable en una disolución tamponada que mantiene un pH de 6,0 a 8,0; añadir al menos un agente de reticulado de longitud cero a la disolución tamponada para formar una mezcla de reacción; y dejar reposar la mezcla de reacción durante un tiempo apropiado para formar un hidrogel que comprende al menos un polímero biocompatible reticulado que tiene restos reticulados de longitud cero, en donde el al menos un polímero biocompatible reticulable se selecciona de ácido hialurónico y una sal de ácido hialurónico.

20 Las reacciones del método de la invención pueden incluir uno o más de la disolución tamponada que es una solución salina tamponada con fosfato que tiene un pH de entre 6,5 y 7,5, y el al menos un agente de reticulado de longitud cero que es EDC.

En algunas realizaciones, la NHS se incluye en la etapa de adición.

25 En algunas realizaciones, el método incluye una etapa de dializado después de la etapa de adición.

En algunas realizaciones, el método incluye el uso de al menos un segundo polímero biocompatible reticulable. El segundo polímero biocompatible reticulable puede ser, por ejemplo, una proteína tal como elastina.

30 En una realización, el método incluye añadir un agente activo. El agente activo puede ser un agente activo seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de enzimas, agentes anestésicos, neurotoxinas medicinales, antioxidantes, agentes anti-infecciosos, agentes anti-inflamatorios, agentes de bloqueo de luz ultravioleta, tintes, hormonas, inmunosupresores y combinaciones de los mismos.

35 En una realización específica de la invención, se proporciona un método para fabricar un hidrogel para el aumento de tejido blando que comprende las etapas de proporcionar una solución salina tamponada con fosfato 0,1M (PBS) que tiene un pH entre 6,5 y 7,5; disolver de 20 a 80 mg/mL de AH y de 2 a 20 por ciento en peso de elastina soluble en el PBS para formar una mezcla de polímero; añadir 5 a 30 por ciento en moles de EDC y NHS a la mezcla polimérica para formar una mezcla de reacción; dejar a la mezcla de reacción reaccionar durante 12 a 48 horas a 22° a 60°C para formar un gel; dializar el gel frente a PBS para formar un gel purificado; y ajustar el tamaño del gel purificado para formar un hidrogel para el aumento de tejido blando. En algunas realizaciones, el método incluye añadir un agente activo seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de enzimas, agentes anestésicos, neurotoxinas medicinales, antioxidantes, agentes anti-infecciosos, agentes anti-inflamatorios, agentes bloqueantes de luz ultravioleta, tintes, hormonas, inmunosupresores y combinaciones de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra gráficamente la elasticidad y viscosidad de AH y AH-elastina reticulados con EDC/NHS de acuerdo con una realización de la invención.

45 La Figura 2 ilustra gráficamente la resistencia del AH y AH-elastina a la degradación enzimática.

La Figura 3 ilustra gráficamente la fuerza de extrusión de AH y AH-elastina reticulados con EDC/NHS de acuerdo con una realización de la invención.

Descripción detallada

50 Donde la definición de términos como se usa en la memoria se sale del significado normalmente usado del término, el solicitante intenta utilizar las definiciones proporcionadas en esta memoria, a menos que se indique específicamente.

La presente descripción generalmente se refiere a rellenos de tejido blando, por ejemplo, rellenos dérmicos o subdérmicos, basados en polímeros biocompatibles reticulados. En un aspecto, las composiciones descritas en esta memoria incluyen hidrogeles que comprenden ácido hialurónico biocompatible reticulado y/o una sal del mismo que tiene restos reticulados de longitud cero y opcionalmente al menos un ingrediente activo distinto incorporado en el polímero biocompatible reticulado. Los actuales hidrogeles basados en AH tienen reología (es decir, características de flujo), elasticidad y persistencia mejoradas respecto a hidrogeles basados en AH conocidos. Los métodos o procedimientos de preparación de dichas composiciones también se proporcionan, además de productos fabricados por dichos métodos o procedimientos.

Una ventaja sorprendente de las composiciones y los métodos de la presente descripción es que el peso molecular de las cadenas poliméricas permanece alto y los hidrogeles resultantes han mejorado las propiedades reológicas mientras al mismo tiempo tienen bajas fuerzas de extrusión. Los hidrogeles con dureza y elasticidad bien afinadas son beneficiosos para el desarrollo de biomateriales adecuados para el aumento de tejido blando.

Lo basado en AH como se usa en esta memoria se refiere a composiciones que incluyen AH reticulado y composiciones que incluyen AH reticulado más uno más polímeros reticulados distintos. Además, el AH puede referirse a ácido hialurónico y cualquiera de sus sales de hialuronato, que incluyen, aunque no están limitadas a, hialuronato sódico (NaAH), hialuronato de potasio, hialuronato de magnesio, hialuronato de calcio y combinaciones de los mismos. El uso de más de un polímero biocompatible no está excluido específicamente de la presente descripción. Los hidrogeles de la presente descripción pueden incluir más de un polímero biocompatible, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más polímeros biocompatibles. Los polímeros biocompatibles adecuados incluyen polisacáridos (por ejemplo, AH, quitosano, sulfato de condroitina, alginato, carboximetilcelulosa), poli(etilenglicol), poli(ácido láctico), poli(hidroxietilmetacrilato), poli(metilmecrilato) y proteínas (por ejemplo, elastina y colágeno).

Generalmente, la concentración de AH en el hidrogel es preferiblemente al menos 10 mg/mL y hasta 100 mg/mL. Por ejemplo, la concentración de AH en alguna de las composiciones está en un intervalo entre 15 mg/mL y 80 mg/mL, o 15 mg/mL a 30 mg/mL. En algunas realizaciones, la concentración de AH es aproximadamente 26 mg/mL.

Generalmente, los agentes de reticulado de longitud cero se acoplan a polímeros sin añadir ningún átomo de brazo espaciador adicional y por lo tanto los agentes de reticulado de longitud cero no se incorporan a la matriz polimérica reticulada. Los agentes reticulados de longitud cero adecuados incluyen carbodiimidas tal como EDC. Las carbodiimidas no solubles en agua incluyen diciclohexilcarbodiimida (DCC) y diisopropilcarbodiimida (DIC), que también pueden ser adecuadas.

El acoplamiento mediado por carbodiimida entre carboxilatos y grupos funcionales alcohol o amina continua fácilmente a temperatura ambiente, pH neutro y bajo condiciones acuosas. El pH neutro puede estar, por ejemplo, entre 6,0 y 8,0, entre 6,5 y 7,5 o aproximadamente 7,0. Típicamente en agua, la EDC puede usarse para mediar la esterificación entre carboxilatos y alcoholes o la amidación entre carboxilatos y aminas. Así, el AH reticulado se forma explotando los grupos reactivos presentes en AH (por ejemplo, carboxilato y alcohol). Además, tomando ventaja de la alta reactividad de grupos amina en proteínas, la amidación entre cadenas laterales de lisina de proteínas con grupos carboxilato de AH se alcanza para formar hidrogeles reticulados de AH-proteína. Los agentes de reticulado y polímeros no reaccionados pueden eliminarse por diálisis.

En algunas realizaciones, la EDC se usa en conjunto con NHS o sulfonil-NHS (sulfo-NHS), denominado de forma colectiva como "NHS" en esta memoria. La NHS estabiliza los intermedios de reactivo formado por EDC; así, la adición de NHS puede aumentar la eficiencia de acoplamiento de EDC. De forma alternativa, puede usarse 4-dimetilaminopiridina (DMAP) para catalizar la reacción de acoplamiento.

Sin estar limitado a esto, las composiciones basadas en AH de acuerdo con la presente descripción incluyen composiciones basadas en AH reticulado y al menos composiciones basadas en AH reticulado parcialmente. El AH no reticulado como se usa en esta memoria se refiere tanto a cadenas de AH realmente no reticulado (por ejemplo, "libre") además de cadenas ligeramente reticuladas y fragmentos de las mismas que están generalmente en forma líquida soluble.

Los rellenos de tejido blando de la presente invención pueden incluir un agente activo seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de enzimas, agentes anestésicos, neurotoxinas medicinales (por ejemplo, toxina botulínica y toxina clostridium), antioxidantes, agentes anti-infecciosos (por ejemplo, antibióticos), agentes anti-inflamatorios, agentes de bloqueo de luz UV, tintes, hormonas, inmunosupresores y combinaciones de los mismos.

Además, los rellenos de tejido blando de la presente invención pueden incluir uno o más agentes anestésicos en una cantidad efectiva para mitigar el dolor experimentado por inyección de la composición. El anestésico local puede seleccionarse del grupo de ambucaína, amolanona, amilocaína, benoxinato, benzocaína, betoxicaína, bifenammina, bupivacaína, butacaína, butambeno, butanilcaína, butetamina, butoxicaína, carticaína, cloroprocaína, cocaetileno, cocaína, ciclometicaína, dibucaína, dimetisoquina, dimetocaína, diperodona, diclonina, ecgonidina, ecgonina, cloruro de etilo, etidocaína, betaeucaína, euprocina, fenalcomina, formocaína, hexilcaína, hidroxitetraína, p-aminobenzoato de isobutilo, mesilato de leucinocaína, levoadrol, lidocaína, mepivacaína, mepirilcaína,

metabutoxicaína, cloruro de metilo, mirtecaína, naepaina, octacaína, ortocaína, oxetazaina, paretoxicaína, fenacaína, fenol, piperocaína, piridocaína, polidocanol, pramoxina, prilocaína, procaína, propanocaína, proparacaína, propipocaína, propoxicaína, pseudococaína, pirrocaína, ropivacaína, alcohol salicílico, tetracaína, tolicaína, trimecaína, zolamina y sales de los mismos. En una realización, el agente anestésico es lidocaína, tal como en forma de HCl de lidocaína. Las composiciones descritas en esta memoria pueden tener una lidocaína u otro anestésico en una concentración de entre 0,1% y 5% en peso o entre 0,2% y 1,0% en peso de la composición. En una realización, la composición tiene una concentración de lidocaína de aproximadamente 0,3% en peso (% en p/p) de la composición. La concentración de lidocaína en las composiciones descritas en esta memoria puede ser terapéuticamente efectiva, lo que significa que la concentración es adecuada para proporcionar un beneficio terapéutico.

La presente invención también proporciona métodos para fabricar hidrogeles. La etapa inicial de proporcionar materia prima de AH puede ser en forma de fibras secas de AH o polvo. La materia prima de AH puede ser AH, sus sales y/o mezclas de los mismos. El material de AH puede comprender, por ejemplo, fibras de Na-AH o polvo de NaAH de fuente bacteriana. En algunos aspectos de la presente descripción, el material de AH puede derivarse de animales. El material de AH puede ser una combinación de materias primas que incluyen AH y al menos algún otro polisacárido, por ejemplo, glucosaminoglucano (GAG).

En algunas realizaciones, el material de AH en las composiciones comprende o consiste casi enteramente de AH de alto peso molecular. Esto es, casi el 100% del material de AH en las presentes composiciones puede ser AH de alto peso molecular. En otras realizaciones, el material de AH en las composiciones comprende una combinación de AH de alto peso molecular y AH de bajo peso molecular.

El material de AH de las composiciones puede comprender entre 5% y 95% de AH de alto peso molecular con el equilibrio del material de AH incluyendo AH de bajo peso molecular. En una composición típica, la relación de AH de alto peso molecular a bajo peso molecular es al menos 2 ($p/p \geq 2$), con el AH de alto peso molecular teniendo un peso molecular de más de aproximadamente 1,0 MDa.

Se apreciará por los expertos en la técnica que la selección de material de AH de alto y bajo peso molecular y sus porcentajes relativos o relaciones es dependiente de las características deseadas, por ejemplo, fuerza de extrusión, módulo elástico, módulo viscoso y persistencia del producto final basado en AH. Para información adicional que puede ser útil para entender este y otros aspectos de la presente descripción, véase la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2006/0194758.

Los geles basados en AH pueden prepararse según la presente invención limpiando primero y purificando la materia prima o seca de AH que tiene una relación de peso molecular alto/bajo deseado. Estas etapas implican generalmente hidratar las fibras de AH secas o polvo en la relación de peso molecular alto/bajo deseado, por ejemplo, usando agua pura, y filtrar el material para eliminar materias extrañas grandes y/u otras impurezas. El material hidratado, filtrado, se seca entonces y se purifica. El AH de peso molecular alto y bajo puede limpiarse y purificarse de forma separada, o puede mezclarse, por ejemplo, en la relación deseada, justo antes del reticulado.

El método de la presente invención incluye la etapa de disolución del polímero biocompatible reticulable en una disolución tamponada mantenida a un pH entre 6,0 y 8,0, tal como entre 6,5 y 7,5, o aproximadamente 7,0. En una realización preferida, el tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunas realizaciones, se añade un segundo polímero biocompatible. Cuando se usa más de un polímero biocompatible, los polímeros pueden añadirse en relaciones que dan características de flujo, elasticidad, viscosidad y persistencia adecuadas. En una realización preferida, el segundo polímero biocompatible es una proteína tal como elastina. En una realización particularmente preferida, 20 a 80 mg/mL de AH se disuelve en la disolución de tampón, y 2 a 20 por ciento en peso de elastina soluble se disuelve en la disolución tampón.

El método incluye además la etapa de adición de al menos un agente de reticulado de longitud cero a la disolución tamponada. El uso de más de un agente de reticulado o un agente de reticulado diferente no está excluido del alcance de la presente descripción. En una realización preferida, el agente de reticulado de longitud cero es EDC. La NHS puede añadirse a la mezcla de reacción antes, o junto con, EDC para aumentar la eficiencia de reticulado. EDC y NHS pueden añadirse en cualquier relación, tal como 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5 o 1:10. En una realización preferida, EDC y NHS se añaden en una porción (es decir, relación 1:1). EDC y NHS pueden prepararse a cualquier concentración adecuada, tal como 1 a 50 por ciento en moles, y más preferiblemente 5 a 30 por ciento en moles.

La mezcla de reacción se deja reposar durante un tiempo apropiado para formar un hidrogel adecuado para la implantación de tejido blando. En algunas realizaciones, el tiempo está entre 12 horas y 72 horas, entre 12 y 48 horas o aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción se mantiene a una temperatura apropiada, tal como entre 22 y 60 grados Celsius.

La etapa de reticulado puede llevarse a cabo usando cualquier medio conocido por el experto en la técnica. Los expertos en la técnica aprecian como optimizar las condiciones de reticulado según la naturaleza de los polímeros biocompatibles, y como llevar a cabo el reticulado a un grado optimizado. Un grado de reticulado es preferiblemente suficiente para la composición final de hidrogel obtenida de los métodos actuales para permanecer implantada en el

sitio de la inyección sin excesiva difusión del sitio de inyección. En algunas realizaciones, el grado de reticulado es 2% a 20%, y más preferiblemente 4% a 12%, en donde el grado de reticulado se define como la relación de porcentaje en peso del agente de reticulado a unidades monoméricas de AH en la composición. El grado de reticulado puede ser menor que 6% o más preferiblemente menos que 5%.

5 El método de fabricación de un hidrogel puede incluir la etapa de dializar el hidrogel después de que el hidrogel se forma para eliminar los agentes de reticulado, materiales de partida no reaccionados, y sub-productos tales como N-acilurea. En algunas realizaciones, la diálisis se realiza usando una disolución tampón. En una realización preferida, la disolución tampón es PBS. El hidrogel purificado puede entonces ajustarse en tamaño usando cualquier método adecuado, tal como pasar a través de una criba de acero inoxidable que tiene el tamaño de malla deseado.

10 Los geles basados en AH reticulado pueden comprender un componente de AH reticulado capaz de absorber al menos una vez su peso en agua. Cuando se neutraliza y se hincha, el componente de AH reticulado y agua absorbida por el componente de AH reticulado está en una relación de peso de aproximadamente 1:1.

15 Las composiciones descritas en esta memoria muestran un módulo elástico y módulo viscoso que es dependiente de los polímeros biocompatibles específicos usados y la presencia y/o ausencia de al menos un agente activo. En algunas realizaciones, el módulo elástico de las composiciones basadas en AH puede ser al menos 50 Pa, pero es más preferiblemente entre 150 Pa y 1500 Pa, tal como entre 500 Pa y 1200 Pa. En algunas realizaciones, el módulo viscoso puede estar entre 50 Pa y 500 Pa, tal como entre 50 Pa y 200 Pa. En una realización ejemplar, el módulo viscoso es aproximadamente 160 Pa.

20 En algunas realizaciones, el método incluye la etapa de añadir un ingrediente al hidrogel. Como se trata en más detalle anteriormente, el ingrediente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en inhibidores de enzima, agentes anestésicos, neurotoxinas medicinales, antioxidantes, agentes anti-infecciosos, agentes anti-inflamatorios, agentes bloqueantes de luz ultravioleta, tintes, hormonas, inmunosupresores y combinaciones de los mismos. El uso de más de un agente activo no está excluido específicamente. En algunas realizaciones, uno o más agentes activos se añaden al hidrogel purificado. En otras realizaciones, uno o más agentes activos se añaden al tampón de reacción y se reticulan con el polímero biocompatible y/o los agentes activos se atrapan o encierran por el polímero biocompatible reticulado.

25 Las jeringas útiles para administrar los hidrogeles de la presente descripción incluyen cualquier jeringa conocida en la técnica capaz de repartir composiciones de relleno dérmico viscoso. Las jeringas generalmente tienen un volumen interno de 0,4 mL a 3 mL, más preferiblemente entre 0,5 mL y 1,5 mL o entre 0,8 mL y 2,5 mL. Este volumen interno está asociado con un diámetro interno de la jeringa que afecta a la fuerza de extrusión necesaria para inyectar composiciones de relleno dérmico de alta viscosidad. Los diámetros internos son generalmente 4 mm a 9 mm, más preferiblemente de 4,5 mm a 6,5 mm o de 4,5 mm a 8,8 mm. Además, la fuerza de extrusión necesaria para repartir las composiciones basadas en AH desde la jeringa es dependiente del calibre de la aguja. Los calibres de las agujas usadas generalmente incluyen calibres entre 18G y 40G, más preferiblemente 25G a 33G o de 16G a 25G. Un experto en la técnica puede determinar las dimensiones correctas de la jeringa y el calibre de la aguja necesario para llegar a un requisito de fuerza de extrusión particular.

30 Las fuerzas de extrusión expuestas por las composiciones basadas en AH descritas en esta memoria que usan las dimensiones de la aguja descritas anteriormente se aplican usando las velocidades de inyección que son cómodas para un paciente. Cómodo para un paciente se usa para definir una velocidad de inyección que no daña o provoca exceso de dolor a un paciente en la inyección al tejido blando. Un experto en la técnica apreciará que cómodo como se usa en esta memoria incluye no solo la comodidad del paciente, sino también la comodidad y habilidad del médico o técnico médico que inyecta las composiciones de AH. Aunque ciertas fuerzas de extrusión pueden ser alcanzables con las composiciones de AH de la presente descripción, un experto en la técnica entiende que las fuerzas de extrusión altas pueden llevar a una falta de control durante la inyección y que dicha falta de control puede dar por resultado dolor adicional al paciente. Las fuerzas de extrusión de las actuales composiciones de AH pueden ser de 8 N a 40 N, o más preferiblemente de 10 N a 30 N, o 15 N a 20 N.

35 La esterilización, como se usa en esta memoria comprende cualquier método conocido en la técnica para matar o eliminar de forma efectiva agentes transmisibles, preferiblemente sin alterar o degradar sustancialmente las composiciones basadas en AH y cualquier agente activo.

40 Un método preferible de esterilización de las jeringas llenas es mediante autoclave. El tratar en autoclave puede conseguirse aplicando una mezcla de calor, presión y humedad a una muestra que necesita esterilización. Pueden usarse muchas temperaturas, presiones y tiempos de ciclo de esterilización diferentes para esta etapa. Por ejemplo, las jeringas llenas pueden esterilizarse a una temperatura de 120°C a 130°C o más. La humedad puede utilizarse o no. La presión se aplica en algunas realizaciones dependiendo de la temperatura usada en el procedimiento de esterilización. El ciclo de esterilización puede ser de al menos 1 minutos a 20 minutos o más.

45 Otro método de esterilización incorpora el uso de una especie gaseosa que se conoce por matar o eliminar agentes transmisibles. Preferiblemente, el óxido de etileno se usa como el gas de esterilización y se conoce en la técnica por ser útil en dispositivos médicos de esterilización y productos.

Un método adicional de esterilización incorpora el uso de una fuente de radiación que se conoce en la técnica por matar o eliminar agentes transmisibles. Un haz de radiación se dirige a la jeringa que contiene la disolución de AH, y la longitud de onda de energía mata o elimina los agentes transmisibles indeseados. La energía preferible útil incluye, aunque no está limitada a luz ultravioleta, radiación gamma, luz visible, microondas o cualquier otra longitud de onda o banda de longitudes de onda que mata o elimina los agentes transmisibles indeseados, preferiblemente sin alterar o degradar sustancialmente la composición basada en AH o cualquier agente activo.

Ejemplo 1

Polisacárido reticulado mediado por EDC

Los hidrogeles de polisacárido se generaron reticulando AH usando EDC y NHS (o sulfo-NHS, de forma colectiva "NHS").

El acoplamiento de AH mediado por carbodiimida se realiza en PBS 0,1 M a pH neutro (6,5-7,5). AH se disuelve en tampón (20-80 mg/mL). Después se añaden 5-30% en moles de EDC y NHS en una porción. Después, el polímero se deja reticular durante 12-72 horas a 22-60°C. El gel resultante puede diluirse y después se dializa de forma extensiva a temperatura ambiente frente a PBS para eliminar los sub-productos de N-acilurea y cualquier material de partida no usado. Ajustar el tamaño del gel purificado se realiza después a través de una criba de acero inoxidable.

Ejemplo 2

Polisacárido-proteína reticulado mediado por EDC

Los hidrogeles de polisacárido-proteína se generaron reticulando AH y elastina usando EDC y NHS.

El acoplamiento de AH y elastina mediado por carbodiimida se realiza en PBS 0,1 M a pH neutro (6,5-7,5). Se disuelven AH (20-80 mg/mL) y elastina soluble (2-20% en peso) en PBS. Se añaden 5-30% en moles de EDC y NHS en una porción. Después, el polisacárido y la proteína se dejan reticular a temperatura ambiente durante 12-48 horas a 22-60°C. El gel resultante se dializa después de forma extensiva a temperatura ambiente frente a PBS para eliminar los sub-productos de N-acilurea y materiales de partida. Ajustar el tamaño del gel purificado se realiza entonces a través de una criba de acero inoxidable.

Ejemplo 3

Reología de AH y AH-elastina reticulados

Las características de flujo de los hidrogeles preparados según los Ejemplos 1 y 2 se evaluaron para valorar su elasticidad y viscosidad.

Un análisis de barrido de deformación proporciona información sobre un módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') del gel. Un valor grande de G' comparado con G'' indica un gel muy elástico. La Figura 1 representa datos de barrido de deformación típicos para un hidrogel comprendido por AH y AH-elastina reticulados con EDC/NHS. El G' para los dos geles es 1100 Pa y 505 Pa, respectivamente donde como el de AH reticulado con BDDE es 150 Pa. El G'/G'' del AH reticulado con EDC/NHS es 6,9 y el de AH-elastina es 3,7, respectivamente. En comparación, el G'/G'' de AH reticulado con BDDE es aproximadamente 2,5. Tomados juntos, estos datos sugieren que los geles resultantes de reticulado mediado por EDC/NHS tienen mayor elasticidad y dureza en comparación con el hidrogel reticulado con BDDE. Por consiguiente, AH y AH-proteínas reticulados con EDC/NHS tienen propiedades mejoradas adecuadas para aumento del tejido blando, tal como, relleno dérmico.

Ejemplo 4

Degradación enzimática de AH y AH-elastina reticulados

Los hidrogeles preparados según los Ejemplos 1 y 2 se sometieron a degradación enzimática *in vitro* para evaluar la resistencia a la degradación enzimática.

Se entiende generalmente que la resistencia mejorada a la degradación enzimática correlaciona con la persistencia *in vivo* mejorada. Un gel superior resiste la degradación y por lo tanto tiene una diferencia menor de AH libre antes y después de la degradación enzimática. Primero, el porcentaje de no reticulado (es decir, AH "libre") antes y después de la degradación enzimática con hialuronidasa testicular bovina (AHasa) se mide por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) en un sistema HPLC Agilent (Santa Clara, CA) equipado con detectores de barrido de luz láser multi-ángulo (MALS) y de índice refractivo. La Figura 2 representa degradación enzimática de AH y AH-elastina reticulados con EDC/NHS, e hidrogel de AH reticulado con BDDE. Como se muestra en la Figura 2, el aumento en AH soluble es 37% y 4% para el AH y AH-elastina reticulados con EDC/NHS, respectivamente. El aumento en AH soluble para AH reticulado con BDDE es 41%. Así, la AH-elastina resiste la degradación enzimática más que el AH reticulado con EDC/NHS, y tanto AH como AH-elastina resisten la degradación más que AH reticulado con BDDE. Como resultado, AH y AH-proteínas reticulados con EDC/NHS se espera que tengan persistencia *in vivo* mejorada.

Ejemplo 5

Extrusión de AH y AH-elastina reticulados

La fuerza de extrusión de hidrogeles preparados según los Ejemplos 1 y 2 se determinó para evaluar la viabilidad de administración de los hidrogeles a través de una aguja.

- 5 El análisis de fuerza de extrusión se realizó en un instrumento INSTRON® (Norwood, MA) usando una jeringa de 0,8 mL equipada con una aguja de calibre 30 (G). El hidrogel se extruyó a una velocidad constante de 50 mm/min. Se muestra en la Figura 3 un gráfico de extensión de compresión representada frente a la fuerza de compresión para AH y AH-elastina reticulados con EDC/NHS en comparación con AH reticulado con BDDE. Este dato muestra que la fuerza de compresión promedio máxima del AH y AH elastina reticulados con EDC/NHS son 37 N y 13 N, respectivamente, mientras que el de AH reticulado con BDDE es 38 N. Por consiguiente, AH y AH-elastina reticulados con EDC/NHS pueden administrarse por medio de inyección a través de una aguja 30 G.

Ejemplo 6

AH no reticulado total

El AH no reticulado total (es decir, AH libre) se determinó en los hidrogeles preparados según los Ejemplos 1 y 2.

- 15 El porcentaje de AH no reticulado es un importante parámetro en la evaluación de la eficiencia de reticulado relativo, además de predecir la persistencia *in vivo* de un hidrogel. Está bien documentado que el AH no reticulado se degrada rápidamente *in vivo*; por lo tanto, los hidrogeles con un mayor porcentaje de AH no reticulado es probable que tengan menos persistencia *in vivo*. El AH no reticulado total se mide diluyendo el gel 20x en PBS, y después se deja que el gel se hinche durante 1 semana con agitación constante. La disolución se filtra entonces a través de un filtro de 0,22 μm para eliminar partículas y materia en gel, y se analiza entonces por SEC-MALS para medir el porcentaje de AH recuperado. En este ejemplo específico, el AH y AH-elastina reticulados con EDC/NHS contienen aproximadamente 10% y 41% de AH no reticulado total, respectivamente. Este dato indica que tanto AH como AH-elastina reticulados con EDC/NHS se espera que tengan persistencia *in vivo* adecuada.

REIVINDICACIONES

1. Un hidrogel adecuado para aumento de tejido blando, el hidrogel que comprende al menos un polímero biocompatible reticulado que tiene restos reticulados de longitud cero;
- 5 en donde el al menos un polímero biocompatible reticulado se selecciona de ácido hialurónico reticulado y una sal de ácido hialurónico reticulado.
2. Un hidrogel según la reivindicación 1, que comprende además al menos un segundo polímero biocompatible reticulado.
3. Un hidrogel según la reivindicación 2, en donde el al menos un segundo polímero biocompatible reticulado es una proteína.
- 10 4. Un hidrogel según la reivindicación 3, en donde la proteína es colágeno.
5. Un hidrogel según la reivindicación 3, en donde la proteína es elastina.
6. Un método para producir un hidrogel adecuado para aumento de tejido blando, comprendiendo el método las etapas de:
- proporcionar al menos un polímero biocompatible reticulado;
- 15 disolver el al menos un polímero biocompatible reticulado en una disolución tamponada que mantiene un pH de entre 6,0 y 8,0;
- añadir al menos un agente reticulado de longitud cero a la disolución tamponada para formar una mezcla de reacción; y
- 20 permitir la mezcla de reacción repose durante un tiempo apropiado para formar un hidrogel que comprende al menos un polímero biocompatible reticulado que tiene restos reticulados de longitud cero;
- en donde el al menos un polímero biocompatible reticulado se selecciona de ácido hialurónico y una sal de ácido hialurónico.
7. Un método según la reivindicación 6, en donde la disolución tamponada es solución salina tamponada con fosfato (PBS) que tiene un pH de entre 6,5 y 7,5.
- 25 8. Un método según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el al menos un agente de reticulado de longitud cero es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende además añadir N-hidroxisuccinimida (NHS) a la disolución tamponada en la etapa de adición.
- 30 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además a añadir al menos un segundo polímero biocompatible reticulado a la disolución tamponada.
11. Un método según la reivindicación 10, en donde el al menos un segundo polímero biocompatible reticulado es una proteína.
12. Un método según la reivindicación 11, en donde la proteína es elastina.
13. Un método según la reivindicación 6, que comprende las etapas de:
- 35 proporcionar una disolución de PBS 0,1 M que tiene un pH entre 6,5 y 7,5;
- disolver 20 a 80 mg/mL de ácido hialurónico o una sal de ácido hialurónico y 2 a 20% en peso de elastina soluble en PBS para formar una mezcla polimérica;
- añadir 5 a 30% en moles de EDC y NHS a la mezcla polimérica para formar una mezcla de reacción;
- permitir que la mezcla de reacción reaccione durante 12 a 48 horas a 22 a 60°C para formar un gel;
- 40 dializar el gel frente a PBS para formar un gel purificado;
- ajustar el tamaño del gel purificado para formar un hidrogel; y
- añadir un agente activo al hidrogel, siendo el agente activo un inhibidor enzimático, un agente anestésico, una neurotoxina medicinal, un antioxidante, un agente anti-infeccioso, un agente anti-inflamatorio, un agente bloqueante de UV, un tinte, una hormona, un inmunosupresor o una combinación de los mismos.

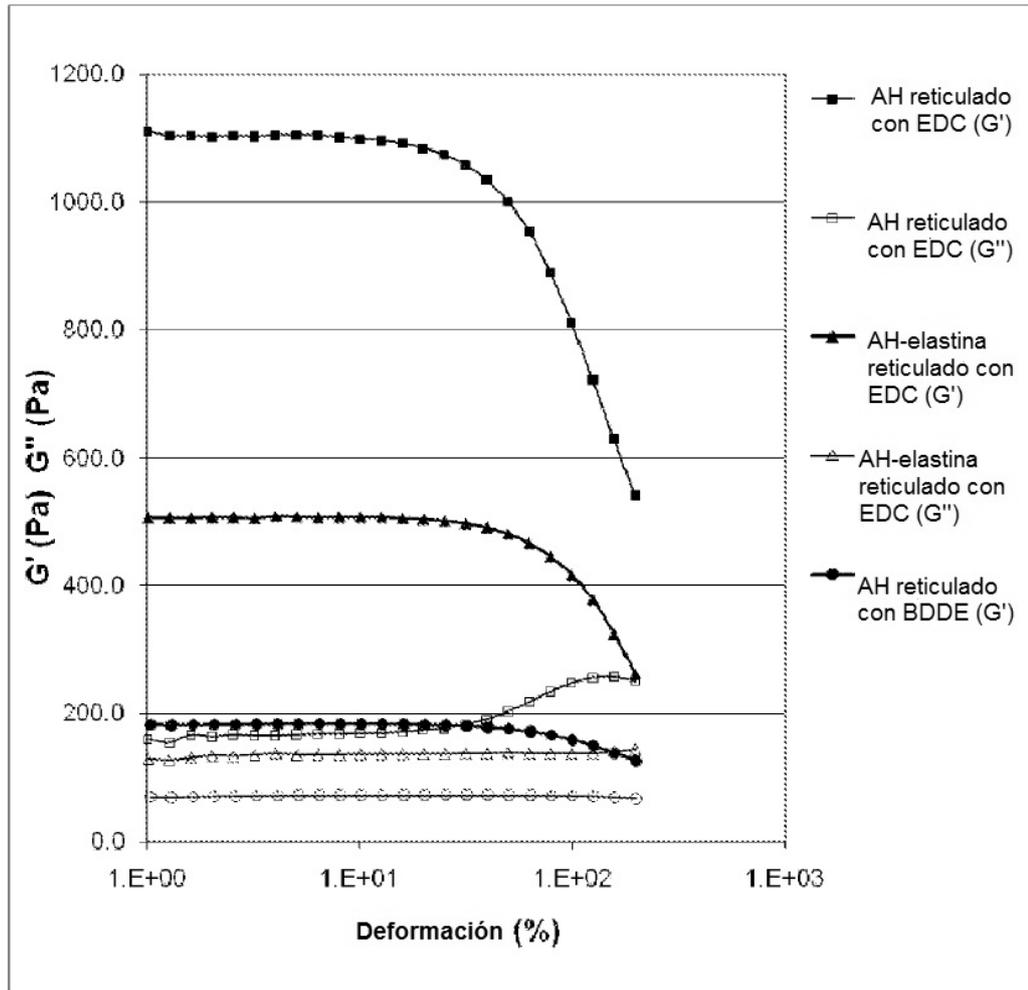


FIG. 1

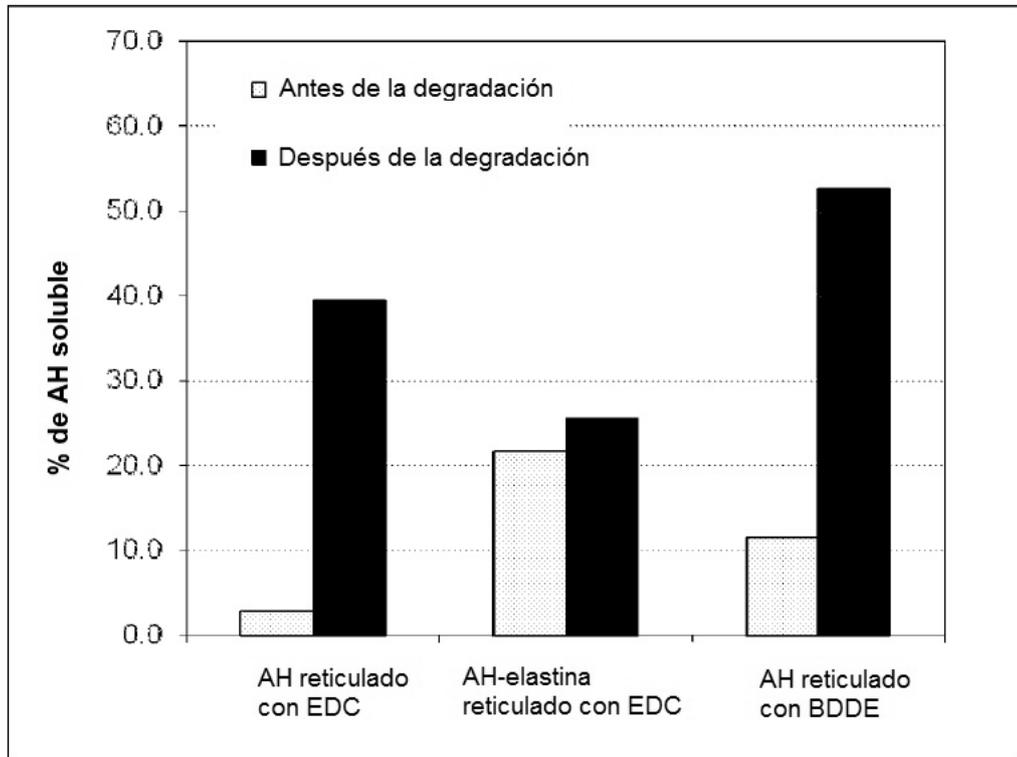


FIG. 2

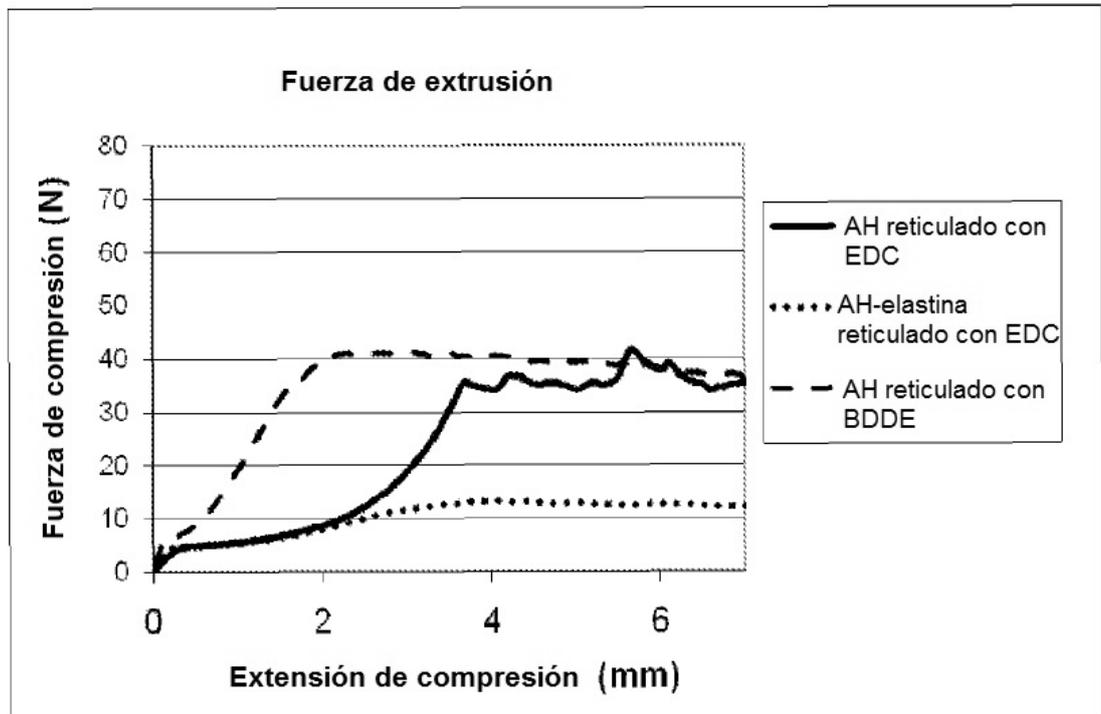


FIG. 3