

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 252**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 31/728** (2006.01)  
**A61K 33/42** (2006.01)  
**A61P 41/00** (2006.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/167** (2006.01)  
**A61K 31/738** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2013 PCT/EP2013/069877**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14056723**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2013 E 13766119 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2903591**

54 Título: **Formulación acuosa estéril inyectable a base de ácido hialurónico reticulado y de hidroxiapatita para uso terapéutico**

30 Prioridad:

**08.10.2012 FR 1259582**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.12.2016**

73 Titular/es:

**APTISSEN S.A. (100.0%)  
Chemin des Aulx 18  
1228 Plan-les-Ouates, CH**

72 Inventor/es:

**GAVARD MOLLIARD, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

ES 2 595 252 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).

**FORMULACIÓN ACUOSA ESTÉRIL INYECTABLE A BASE DE ÁCIDO HIALURÓNICO RETICULADO Y DE HIDROXIAPATITA PARA USO TERAPÉUTICO**

**DESCRIPCIÓN**

5

**Campo de la invención**

La presente invención tiene por objeto una formulación acuosa estéril inyectable reabsorbible, lista para el empleo, usada con fines terapéuticos en forma de gel viscoelástico cohesivo particulado que comprende i) ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, a una concentración comprendida entre el 1% y el 4% (masa/volumen); permitiendo la reticulación realizada obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, y ii) hidroxiapatita, a una concentración comprendida entre el 10% y el 70% (masa/volumen), estando dicha hidroxiapatita en forma de partículas de tamaño medio inferior o igual a 80  $\mu\text{m}$ , o inferior o igual a 500 nm; presentando dicha formulación acuosa estéril inyectable propiedades viscoelásticas tales que  $\text{Tan}\delta$  a la frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60.

10

15

**Contexto de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la cirugía en el ser humano o los animales y en particular de la cirugía ortopédica, de la cirugía dental o maxilofacial, de la cirugía ORL (otorrinolaringológica), de la cirugía urológica o ginecológica y de la cirugía gastroenterológica.

20

25

Se han desarrollado numerosos biomateriales en cirugía para rellenar y/o restablecer volúmenes y/o reemplazar tejidos biológicos a lo largo de un periodo más o menos prolongado.

En estos biomateriales, existen soluciones no reabsorbibles tales como, por ejemplo, las prótesis de cadera de material metálico usadas en cirugía ortopédica o soluciones reabsorbibles tales como, por ejemplo, las endoprótesis biorreabsorbibles a base de polímero usadas en cirugía cardíaca.

Los biomateriales dirigidos al relleno pueden usarse para una multitud de aplicaciones terapéuticas en los tejidos blandos o en los tejidos duros. Pueden mencionarse, por ejemplo:

30

- en cirugía maxilofacial: la reconstrucción de la cavidad orbital tras la enucleación con ayuda de una bola en material cerámico;

35

- en cirugía dental: el tratamiento de la periodontitis mediante la aplicación de materiales cerámicos para rellenar cavidades periodontales;

40

- en cirugía urológica: el tratamiento de la incontinencia urinaria o del reflujo vesicoureteral mediante la inyección endouretral de productos de relleno tales como por ejemplo productos a base de colágeno;

- en cirugía gastroenterológica: el tratamiento de la incontinencia fecal mediante la inyección de productos de relleno tales como, por ejemplo productos, a base de silicona;

- en cirugía ORL: el tratamiento de las cuerdas vocales para mejorar la fonación mediante la inyección de productos de relleno tales como, por ejemplo, productos a base de carbómero;

45

- en cirugía ortopédica: tratamiento de los defectos óseos mediante el uso de un sustituto óseo a base de cerámica porosa;

50

De manera general, puede decirse que los productos implantados dirigidos al relleno permiten tratar los tejidos deseados:

- creando principalmente un llenado/aumento de estos tejidos a largo plazo para los tejidos blandos.

55

- favoreciendo principalmente la construcción/regeneración de estos tejidos para los tejidos duros.

Entre los biomateriales denominados reabsorbibles dirigidos al relleno, pueden mencionarse, por ejemplo, los productos que contienen partículas de hidroxiapatita.

60

La hidroxiapatita presenta una composición química muy próxima a la de la fase mineral del hueso, sus propiedades biológicas y su biocompatibilidad hacen de ella un excelente producto de sustitución ósea. Una colonización ósea del sustituto depende estrechamente de las características porosas del material y en particular del tamaño y de la distribución de los poros, así como de la interconexión entre los macroporos (número y dimensión). Las interconexiones constituyen túneles que permiten el paso de las células y de la circulación sanguínea entre los poros y favorecen así la formación ósea en el interior del sustituto

65

La hidroxiapatita, debido a su alto nivel de biocompatibilidad y su lenta reabsorción en el organismo, se administra en tejidos muy diferentes y para aplicaciones variadas en formas diferentes tales como, por ejemplo:

- 5 - cementos a base de hidroxiapatita. Estos cementos los prepara el cirujano en el quirófano (material maleable a lo largo de la preparación durante algunos minutos) y después los administra a la zona que va a tratarse (material que endurece *in situ*). Se usan como sustitutos óseos debido a su buena osteointegración y su capacidad de biorreabsorción que permite dejar sitio para un hueso neoformado a lo largo del tiempo (documento WO2005/051446).
- 10 - disoluciones o geles a base de hidroxiapatita que pueden contener un polímero tal como la carboximetilcelulosa. Estos productos pueden usarse en diferentes campos tales como para rellenar deficiencias periodontales en cirugía dental o tratar la incontinencia urinaria o incluso realizar el relleno en cirugía ortopédica tras la extirpación de quistes o de tumores benignos (documento US 5 922 025).
- 15 - productos a base de hidroxiapatita que se presentan en forma de bloque, polvo, gránulos usados en ortopedia y que presentan una rápida osteointegración, usados por ejemplo en relleno para la recuperación de cadera o en contexto maxilofacial, como complemento a los implantes dentales.

Entre los productos a base de hidroxiapatita, muchos son los que no están listos para el empleo y necesitan una preparación previa por parte del cirujano (es el caso de los cementos a base de hidroxiapatita que requieren un mezclado previo de un polvo y de una disolución, en un momento determinado, antes de la deposición sobre o en la zona que va a tratarse y el endurecimiento del cemento *in situ*). Otros productos necesitan conformarse por parte del cirujano (material sólido que debe "cortarse" en la forma correcta) antes de la implantación sobre o en la zona que va a tratarse. También se notifican problemas asociados con la migración de las partículas de hidroxiapatita. Estos problemas pueden generarse por complicaciones y/o pérdidas de rendimiento del producto considerado. Por ejemplo, la migración de las partículas de hidroxiapatita induce una pérdida del efecto de relleno de los tejidos biológicos y puede posiblemente inducir efectos secundarios. En efecto, las partículas de hidroxiapatita pueden concentrarse concretamente en determinadas zonas más o menos alejadas de la zona que va a tratarse debido a las tensiones mecánicas a las que se somete el biomaterial. La presencia de partículas o la concentración demasiado elevada de partículas en una zona no deseada puede inducir complicaciones más o menos graves.

El ácido hialurónico (AH) es otro biomaterial reabsorbible contenido en numerosos productos concretamente para realizar el relleno. Se usa en su forma nativa (no modificada químicamente) o incluso en forma reticulada en numerosos campos terapéuticos o estéticos.

El ácido hialurónico reticulado se conoce bien en la dermoestética, campo para el que se inyecta en o bajo la dermis para rellenar las arrugas o restablecer el volumen de diferentes zonas del cuerpo durante un periodo de varios meses. Presenta la ventaja de presentar muy pocos efectos secundarios tras la inyección y complicaciones extremadamente poco frecuentes a largo plazo. Por otro lado, en caso de una mala inyección, el profesional sanitario tiene la posibilidad de corregir su tratamiento inyectando una disolución de hialuronidasas (enzimas específicas del AH), disolución que va a degradar el producto a base de AH reticulado previamente inyectado. Las inyecciones de AH reticulado, debido a su desaparición progresiva (reabsorción del polímero en los tejidos a lo largo del tiempo), deben repetirse a intervalos regulares, generalmente de 6 a 12 meses, con el fin de mantener la eficacia del tratamiento. El ácido hialurónico no reticulado, por su parte, tiene un tiempo de residencia corto a nivel de la piel (semivida inferior a una semana), se degrada *in vivo* mediante diferentes factores tales como la degradación radicalaria, enzimática, térmica y mecánica. Es la reticulación la que permite aumentar significativamente su semivida ralentizando las cinéticas de degradación del ácido hialurónico según los factores descritos anteriormente, permitiendo así una eficacia del tratamiento estético que puede alcanzar aproximadamente 12 meses.

El ácido hialurónico, reticulado o no reticulado, se usa en campos terapéuticos tales como, por ejemplo:

- en ortopedia, en la que se administra como viscosuplemento en las articulaciones afectadas por artrosis, para reducir el dolor y aumentar la movilidad del paciente tratado,
- 55 - en oftalmología, como disolución viscoelástica durante la cirugía de cataratas para crear un espacio intraocular y proteger los tejidos del ojo o como implante de drenaje en el contexto de la cirugía del glaucoma,
- en urología, como producto de relleno para tratar la incontinencia urinaria o fecal, o
- 60 - en maxilofacial, para reconstruir la cavidad orbitaria tras la enucleación.

Se realizó una intensa investigación científica a escala mundial con el fin de optimizar tratamientos a base de ácido hialurónico que presentan un rendimiento reforzado a lo largo del tiempo. El objetivo era concretamente disponer de productos que pudieran degradarse menos rápidamente en los tejidos biológicos con el fin de conservar un efecto de relleno óptimo a lo largo de un periodo lo más prolongado posible, al tiempo que se conservara un nivel muy alto de seguridad de los productos inyectados. Por otro lado, el ácido hialurónico presenta ventajas muy numerosas, lo que

hace de él un biomaterial de elección para diferentes aplicaciones médicas. No obstante, desgraciadamente no presenta propiedades que le confieran una gran actividad en el campo de la osteosíntesis para la reconstrucción ósea, al contrario que un biomaterial tal como la hidroxiapatita.

5 En este contexto, es importante poner a disposición de los profesionales sanitarios formulaciones biocompatibles listas para su empleo y fácilmente administrables que presenten propiedades mecánicas notables y un efecto a largo plazo adaptadas para las inyecciones con fines terapéuticos sin conllevar complicaciones asociadas con una migración del producto implantado.

10 El documento FR 2 938 187 ya da a conocer una composición viscoelástica inyectable a base de ácido hialurónico y que comprende uno o varios polioles y lidocaína. Esta composición presenta propiedades reológicas mejoradas y una larga permanencia *in vivo*.

### Sumario de la invención

15 La invención se refiere a una formulación acuosa estéril inyectable y biorreabsorbible, lista para el empleo, usada con fines terapéuticos, en forma de gel viscoelástico cohesivo particulado que comprende i) ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, a una concentración comprendida entre el 1% y el 4% (masa/volumen); permitiendo la reticulación realizada obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, y  
20 ii) hidroxiapatita, a una concentración comprendida entre el 10% y el 70% (masa/volumen), estando dicha hidroxiapatita en forma de partículas de tamaño medio inferior o igual a 80  $\mu\text{m}$ , o inferior o igual a 500 nm; presentando dicha formulación acuosa estéril inyectable propiedades viscoelásticas tales que  $\text{Tan}\delta$  a la frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60.

25 Según otro objeto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una formulación acuosa estéril inyectable que comprende las etapas que consisten en: a) preparar una primera mezcla que comprende al menos del 1% al 4% en peso de ácido hialurónico reticulado o de una de sus sales, mediante formación de enlaces covalentes entre las cadenas de dicho biopolímero con ayuda de moléculas bi o polifuncionales, permitiendo la reticulación realizada obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, b)  
30 purificar dicha primera mezcla, c) añadir a continuación la hidroxiapatita a una concentración comprendida entre el 10% y el 70% (masa/volumen) dispersándola de manera homogénea en el gel a base de ácido hialurónico reticulado, d) poner el gel así obtenido en forma lista para el empleo, e) esterilizar el producto con calor húmedo.

35 Según también otro objeto, la presente invención se refiere a un kit que se presenta preferiblemente en forma de jeringa, ampolla o frasco, que contiene la formulación tal como se mencionó anteriormente.

### Breve descripción de la figura

40 La figura 1 representa fotografías de la comparación de los geles B', X y de la formulación a base de CMC y de hidroxiapatita, según la prueba descrita en el ejemplo 2.

### Descripción detallada de la invención

45 La invención descrita a continuación tiene como objetivo proponer una nueva formulación acuosa estéril inyectable biorreabsorbible, lista para el empleo, usada con fines terapéuticos y que presenta propiedades específicas de viscoelasticidad, de rellenos, de rendimiento a largo plazo y en determinados casos de una capacidad para favorecer activamente el restablecimiento de los tejidos biológicos circundantes. Esta formulación se caracteriza porque está en forma de gel viscoelástico cohesivo particulado que comprende

50 i) ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, a una concentración comprendida entre el 1% y el 4% (masa/volumen); permitiendo la reticulación realizada obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, y

55 ii) hidroxiapatita, a una concentración comprendida entre el 10% y el 70% (masa/volumen), estando dicha hidroxiapatita en forma de partículas de tamaño medio inferior o igual a 80  $\mu\text{m}$ , o inferior o igual a 500 nm;

presentando dicha formulación acuosa estéril inyectable propiedades viscoelásticas tales que  $\text{Tan}\delta$  a la frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60.

60 La nueva formulación de la presente invención es biorreabsorbible. Comprende biomateriales que son biocompatibles y asimilables por los tejidos biológicos a plazo más o menos largo. En numerosas aplicaciones, y concretamente en el campo de la reconstrucción ósea en ortopedia, puede desempeñar el papel de promotor del nuevo crecimiento de los tejidos biológicos circundantes. En el caso de las aplicaciones en reconstrucción ósea, la formulación según la invención se reabsorbe y deja sitio para un hueso neoformado a lo largo del tiempo.

65 De manera totalmente sorprendente, se ha constatado que esta formulación presenta una capacidad notable para el

relleno y/o el restablecimiento de volúmenes y/o el remplazo de tejidos biológicos a largo plazo, esto gracias a una sinergia entre el ácido hialurónico reticulado y las partículas de hidroxiapatita, según las condiciones de la invención.

5 Desde un punto de vista mecánico, las partículas de hidroxiapatita (de comportamiento sólido: gran elasticidad y viscosidad despreciable) refuerzan considerablemente la elasticidad del gel y, por tanto, su capacidad para crear volumen induciendo una fuerza/presión importante sobre los tejidos para corregir la zona deficiente que va a tratarse.

10 El ácido hialurónico reticulado aporta propiedades de viscoelasticidad, es decir, de elasticidad pero también de viscosidad permitiendo tener una consistencia de gel que se aproxima a la de los tejidos blandos y, por tanto, contrarrestar así la elasticidad demasiado grande y la ausencia de viscosidad aportadas por las partículas de hidroxiapatita. Esto permite disponer de un producto que se integra en los tejidos de manera mucho más homogénea, menos traumática para los tejidos (gran limitación de la inflamación tras la inyección) y menos dolorosa en la inyección.

15 Por otra parte, el ácido hialurónico reticulado, en las condiciones de la invención, va a permitir reducir considerablemente la migración de las partículas de hidroxiapatita, partículas que se retienen en el interior del gel, debido a la gran cohesividad aportada por el ácido hialurónico reticulado de naturaleza cohesiva (ácido hialurónico reticulado que presenta una baja cinética de reabsorción). Esta fuerte limitación de la migración permite disponer de:

- 20 - un gel con una capacidad de generación de volumen mejorada a largo plazo,  
 - una reducción de los efectos secundarios permitiendo que las partículas de hidroxiapatita permanezcan en el sitio de inyección.

25 El ácido hialurónico es un polisacárido compuesto por la repetición de unidades de disacárido de glucuronato y de N-acetil-glucosamina. Se distribuye en gran medida entre los tejidos conjuntivos, epiteliales y nerviosos en los seres humanos así como en los animales. Constituye uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Contribuye de manera significativa a la proliferación y a la migración de las células. Se encuentra concretamente en concentración importante en el humor acuoso, el líquido sinovial, la piel y el cordón umbilical.

30 Entre las sales de ácido hialurónico preferidas según la invención, se mencionarán las sales de ácido hialurónico con un catión, por ejemplo, una sal mono o divalente tal como las sales de sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso. Las sales de sodio se prefieren muy particularmente.

35 Según la invención, el ácido hialurónico, o una de sus sales, está en forma reticulada. Esta reticulación se obtiene mediante formación de enlaces covalentes entre las cadenas de dicho biopolímero con ayuda de moléculas bi o polifuncionales, permitiendo la reticulación realizada obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, también denominada monofásica.

40 En un ejemplo no limitativo de la presente invención, el ácido hialurónico reticulado se prepara a partir de fibras de hialuronato de sodio puestas en contacto con diglicidil éter de butanodiol (BDDE) para formar una red gelificada.

45 La naturaleza cohesiva del gel a base de ácido hialurónico reticulado es una especificidad principal y necesaria de la invención. El gel no debe desagregarse rápidamente cuando se introduce en agua, como lo hace un gel de naturaleza no cohesiva, también denominado gel bifásico (tipo de gel a base de ácido hialurónico reticulado que no puede mantener las partículas de hidroxiapatita y, por tanto, evitar la migración). El ejemplo 2 pone de relieve esta diferencia entre un gel cohesivo y un gel no cohesivo.

50 La presente invención comprende una concentración de ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, comprendida entre el 1% y el 4% (masa/volumen), preferiblemente entre el 1% y el 3% (masa/volumen). Según una variante particularmente preferida, la concentración de ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, está comprendida entre el 1,5% y el 2,5% (masa/volumen). Alternativamente, la concentración de ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, puede estar comprendida entre el 1,5% y el 3% (masa/volumen), o del 1% al 2,5% (masa/volumen).

55 Ventajosamente, la formulación acuosa según la invención comprende ácido hialurónico, o una de sus sales, cuya masa molecular está preferiblemente comprendida entre  $2,5 \times 10^5$  Da y  $4 \times 10^6$  Da. Según una variante particularmente preferida, esta masa molecular está comprendida entre  $1 \times 10^6$  Da y  $3 \times 10^6$  Da. Alternativamente, la masa molecular está comprendida entre  $1 \times 10^6$  Da y  $2,5 \times 10^6$ , o  $2,5 \times 10^5$  Da y  $3 \times 10^6$  Da.

60 La hidroxiapatita es una especie mineral de la familia de los fosfatos, de fórmula  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , habitualmente escrita como  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  para destacar el hecho de que la malla de la estructura cristalina comprende 2 moléculas. La hidroxiapatita pertenece a la familia cristalográfica de las apatitas, compuestos isomórficos que presentan una misma estructura hexagonal. Este compuesto se usa como biomaterial desde hace muchos años en diferentes especialidades médicas.

La presente invención comprende una concentración de partículas de hidroxiapatita comprendida entre el 10 y el 70% (masa/volumen), preferiblemente entre el 20 y el 60% (masa/volumen), preferiblemente entre el 30 y el 50% (masa/volumen) y el tamaño medio de las partículas de hidroxiapatita es inferior o igual a 80  $\mu\text{m}$ , o inferior o igual a 500 nm.

Se ha observado que las propiedades de viscosidad y de elasticidad de la formulación según la invención son óptimas cuando el parámetro Tan delta o  $\text{Tan}\delta$ , correspondiente a la razón [módulo viscoso  $G''$  /módulo elástico  $G'$ ] a la frecuencia de 1 Hz, es inferior o igual a 0,60, preferiblemente inferior o igual a 0,58. En efecto, se ha mostrado que el carácter elástico de la formulación según la invención, con respecto a su viscosidad, debe ser lo suficientemente importante como para poder evitar la sedimentación de las partículas de hidroxiapatita. Así, se ha observado que por encima de 0,60, las partículas de hidroxiapatita tienen tendencia a sedimentar a lo largo del tiempo. Esta sedimentación implica la obtención de una formulación a base de partículas de hidroxiapatita no homogénea, lo cual no es satisfactorio por un lado para la acción de inyección de la formulación a través de la aguja (obstrucción de la aguja) y, por otro lado, para la seguridad y el rendimiento de la formulación a nivel de la zona de inyección (por ejemplo, creación de zonas denominadas duras en los tejidos inducidos por la concentración de partículas de hidroxiapatita en determinadas zonas más o menos alejadas de la zona que va a tratarse debido a las tensiones mecánicas a las que se somete el biomaterial. La presencia de partículas o la concentración demasiado grande de partículas en una zona no deseada pueden inducir complicaciones más o menos graves.

En general, la medición de la elasticidad ( $G'$ ) y de la razón de la viscosidad con respecto a la elasticidad ( $\text{Tan delta}=G''/G'$ ) se lleva a cabo realizando un barrido de frecuencia de 0,01 a 100 Hz con ayuda de un reómetro con una geometría de placa de 40 mm, un entrehierro de 1000 micrómetros y una temperatura de análisis de 25°C.

Tal como se muestra en el ejemplo 2, la cohesividad de la formulación según la invención es un elemento principal, pero también es necesario que el carácter viscoelástico de la misma sea apropiado con el fin de:

- evitar la sedimentación a lo largo del tiempo de las partículas de hidroxiapatita en el interior de su recipiente, y
- evitar tener un producto que va separarse en 2 fases (partículas de hidroxiapatita y gel de ácido hialurónico reticulado) durante la inyección y/o a nivel de la zona de inyección, creando así heterogeneidades a nivel de la zona tratada.

La invención también tiene como objetivo presentar una mejor longevidad a lo largo del tiempo en comparación con las formulaciones de la técnica anterior. Esta mejor longevidad del relleno de la zona que va a tratarse se obtiene gracias a la capacidad del ácido hialurónico reticulado de mantener a largo plazo las partículas de hidroxiapatita a nivel de la zona de inyección y de las partículas de hidroxiapatita de conferir propiedades mecánicas / reológicas notables a largo plazo. La ganancia en cuanto a la longevidad en clínica es probablemente de varios meses.

También es importante precisar que la presencia de las partículas de hidroxiapatita, radiopacas, confiere una ventaja al gel ya que puede localizarse fácilmente por el profesional sanitario con radiografía durante y/o tras la inyección.

La posibilidad que se le da al profesional sanitario de inyectar una disolución de hialuronidasas para corregir su inyección y degradar el ácido hialurónico reticulado que compone el producto también confiere una ventaja a la invención. No obstante, esta inyección no permite acelerar la reabsorción de las partículas de hidroxiapatita: por tanto, no hay una degradación completa del producto en el interior de los tejidos.

Por tanto, la presente invención consiste en una formulación, tal como se describió anteriormente, usada para el relleno y/o el restablecimiento de volúmenes y/o el remplazo y/o la regeneración de tejidos biológicos, tal como por ejemplo:

- en cirugía maxilofacial para la reconstrucción de la cavidad orbitaria;
- en cirugía dental para el tratamiento de la periodontitis;
- en cirugía urológica para el tratamiento de la incontinencia urinaria o del reflujo vesicoureteral mediante inyección endouretral;
- en cirugía gastroenterológica para el tratamiento de la incontinencia fecal;
- en cirugía ORL para el tratamiento de las cuerdas vocales para mejorar la fonación;
- en cirugía ortopédica para el tratamiento de los defectos óseos y
- en cirugía ginecológica.

La formulación según la invención se usa generalmente tal cual, pero no se excluye que se le añada al menos otro aditivo (distinto de los mencionados anteriormente) y/o al menos un principio activo.

5 Así, la formulación puede comprender además uno o varios materiales cerámicos. Estos materiales se eligen generalmente del grupo que comprende fosfato de tricalcio, carbonato de calcio y sulfato de calcio, o una combinación de varios de esos materiales cerámicos.

10 La formulación según la invención puede comprender además uno o varios factores de crecimiento, tales como los de la familia de las "proteínas morfogenética óseas" (BMP) y/o de los "factores de crecimiento transformantes b" (TGF- $\beta$ ). En la gran familia de los factores de crecimiento TGF  $\beta$ , los factores de crecimiento morfogenéticos (BMP) tienen una acción más específica sobre la osteogénesis. Las BMP pueden inducir la formación de huesos, son biomateriales osteoinductores. Están presentes en una cantidad infinitesimal en el esqueleto (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de hueso). El desarrollo de la biología molecular, y en particular de las técnicas de clonación, ha permitido producir estos factores en cantidad limitada y muy pura mediante ingeniería genética en forma de rhBMP-2 recombinante.

15 La formulación según la invención también puede comprender además uno o varios anestésicos, elegidos del grupo que comprende lidocaína sola o en combinación con adrenalina, procaína, etidocaína sola o en combinación con adrenalina, articaína sola o en combinación con adrenalina, mepivacaína, pramocaína, quinisocaína, o una o varias de las sales de estos anestésicos. Según una variante particularmente preferida, el anestésico elegido es el clorhidrato de lidocaína. La presencia de un anestésico en la formulación según la invención presenta un interés principal para la mejora de la comodidad del paciente a lo largo y después de la inyección.

20 Según otro modo particular de la invención, la formulación según la invención también puede comprender además uno o varios antioxidantes, tales como los antioxidantes de la familia de los polioles. El antioxidante podrá elegirse del grupo de los polioles que comprende concretamente sorbitol, glicerol, manitol o propilenglicol.

25 Según otro objeto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una formulación acuosa estéril inyectable que comprende las etapas que consisten en: a) preparar una primera mezcla que comprende al menos del 1% al 4% en peso de ácido hialurónico reticulado o de una de sus sales, mediante formación de enlaces covalentes entre las cadenas de dicho biopolímero con ayuda de moléculas bi o polifuncionales, permitiendo la reticulación realizada obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, b) purificar dicha primera mezcla, c) añadir a continuación la hidroxiapatita a una concentración comprendida entre el 10% y el 70% (masa/volumen) dispersándola de manera homogénea en el gel a base de ácido hialurónico reticulado, d) poner el gel así obtenido en forma lista para el empleo, e) esterilizar el producto con calor húmedo.

30 La esterilización de la formulación según la etapa e) se realiza con calor húmedo. El experto en la técnica sabrá seleccionar un ciclo de esterilización con calor (temperatura y duración del ciclo de esterilización) apropiado para la esterilización de su producto. Por ejemplo, pueden usarse los siguientes ciclos de esterilización con calor húmedo: 131°C, 1 min / 130°C, 3 min / 125°C, 7 min / 121°C, 20 min.

35 Según otro objeto, la presente invención se refiere a un kit que se presenta preferiblemente en forma de jeringa que contiene la formulación tal como se describió anteriormente.

40 De manera ventajosa, la formulación está lista para el empleo, puede inyectarse directamente por el profesional sanitario. El tipo de inyección depende del sitio y/o de los tejidos biológicos considerados. La invención puede usarse para numerosas aplicaciones terapéuticas, en concreto:

- 45 - en cirugía maxilofacial para la reconstrucción de la cavidad orbitaria;
- 50 - en cirugía dental para el tratamiento de la periodontitis;
- en cirugía urológica para el tratamiento de la incontinencia urinaria o del reflujo vesicoureteral mediante inyección endouretral;
- 55 - en cirugía gastroenterológica para el tratamiento de la incontinencia fecal;
- en cirugía ORL para el tratamiento de las cuerdas vocales para mejorar la fonación;
- 60 - en cirugía ortopédica para el tratamiento de los defectos óseos y
- en cirugía ginecológica.

65 La presente invención también se refiere a un kit en forma de un recipiente diferente de una jeringa tal como una ampolla o un frasco que contiene la formulación tal como se describió anteriormente.

Ahora va a ilustrarse la invención a título no limitativo mediante los siguientes ejemplos 1 a 4:

## Ejemplos

### Ejemplo 1

5 *Preparación de un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva*

10 Etapa 1: se añaden 3,5 g de hialuronato de sodio con un peso molecular de 2,6 MDa a sosa al 1% (30,5 g). Se deja que se homogenice la mezcla durante 1 h 30. Se añaden 420 mg de diglicidil éter de butanodiol (BDDE) a la mezcla que se homogeniza, se cierra y después se coloca en un baño maría a 50°C durante 2 h. A continuación se neutraliza la mezcla mediante adición de 7,5 g de HCl 1 N.

15 Se purifica el gel durante 24 h mediante diálisis con una solución fisiológica isoosmolar y que presenta un pH neutro (celulosa regenerada, límite de separación: masa molecular = 60 kDa) con el fin de obtener una concentración de ácido hialurónico de 25 mg/ml (2,5%). A continuación se homogeniza en una mezcladora clásica de paletas durante 1 h 30 (= gel A1 / 124 g).

20 Finalmente puede desgasificarse el gel, llenarse en jeringas de vidrio de 2 ml y esterilizarse mediante tratamiento en autoclave con vapor a 130°C durante 3 minutos (= gel A / gel viscoelástico de estructura denominada cohesiva o monofásica).

25 Etapa 2: preparación del gel según la invención. En 100 g de gel A1, se añaden 42,9 g de hidroxiapatita fosfocálcica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  cuyas partículas tienen una granulometría media comprendida entre 30 y 50 micrómetros, después se homogeniza el gel en una mezcladora clásica de paletas durante 1 h 30 (= gel B1 / 142,9 g). Finalmente puede desgasificarse el gel, llenarse en jeringas de vidrio de 2 ml y esterilizarse mediante tratamiento en autoclave con vapor a 130°C durante 3 minutos (= gel B). El gel es viscoelástico, cohesivo, particulado. En efecto, se presenta en forma de un gel viscoelástico (presenta propiedades de elasticidad  $G'$  y de viscosidad  $G''$  / véase a continuación), que presenta una gran cohesividad (véase ejemplo 2) y que contiene partículas de hidroxiapatita. La concentración de ácido hialurónico del gel es de 17,5 mg/ml (1,75%) (valoración con carbazol, método de la farmacopea europea).

30 Por otro lado, el pH (7,15) y la osmolaridad (315 mOsm/kg) del gel son fisiológicos. El gel es fácilmente inyectable a través de una aguja: se necesita una fuerza de 26,3 N para empujar el gel a través de una aguja de 21 G, considerando una velocidad de empuje de 12,5 mm/minuto.

35 Se caracterizan los geles A y B desde el punto de vista mecánico/reológico: El reómetro usado para realizar estas caracterizaciones es un AR2000 (TA instruments) con una geometría de placa de 40 mm, un entrehierro de 1000 micrómetros y una temperatura de análisis de 25°C.

40 Se realiza una medición de la elasticidad ( $G'$ ) y de la razón de la viscosidad con respecto a la elasticidad ( $\text{Tan delta} = G''/G'$ ) realizando un barrido de frecuencia de 0,01 a 100 Hz. Se realiza una comparación de los parámetros a 1 Hz.

Gel	$G'$ (1 Hz) en Pa	Tan delta (1 Hz)
A	184	0,25
B	381	0,29

45 Se constata que el producto B presenta una elasticidad significativamente más grande que el producto A. La Tan delta de los 2 productos A y B, por su parte, es relativamente parecida: el gel B conserva un carácter viscoso importante, a pesar de la presencia de las partículas de hidroxiapatita (que presentan una gran elasticidad y una viscosidad despreciable).

50 Una medición de la fuerza normal inducida por el gel que va a someterse a prueba se realiza mediante compresión de la muestra entre el plato Peltier y la geometría para un entrehierro de 1500 micrómetros y una cantidad de gel de 1,4 g.

Gel	Fuerza normal (N)
A	0,86
B	1,47

55 Se constata que el producto B presenta una elasticidad y una fuerza normal inducida significativamente más grande que el producto A.

Esta elasticidad mayor, en combinación con la gran cohesividad del gel según la invención, confiere una mejor capacidad del producto para crear volumen en los tejidos.

### Ejemplo 2



*Importancia de la estructura denominada cohesiva del gel a base de HA reticulado - Comparativo*

5 Se somete el gel A1 (de estructura denominada cohesiva o monofásica) descrito en el ejemplo 1 a diálisis con una solución fisiológica isoosmolar y que presenta un pH neutro (celulosa regenerada, límite de separación: masa molecular = 60 kDa) con el fin de obtener una concentración de ácido hialurónico de 20 mg/ml (2%).

10 A continuación se añade hidroxapatita de calcio en el gel con el fin de obtener una concentración de 200 mg/ml (20%) y después se realiza un mezclado con la espátula (2 minutos para 5 g de gel).

15 A continuación se esteriliza el gel así obtenido en el autoclave a 121°C durante 20 minutos (= gel B' según la invención).

20 Se dopa el gel comercial Restylane® Perlane® (lote 11363-1) a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada no cohesiva o bifásica, cuya concentración de ácido hialurónico es de 20 mg/ml (2%) con 200 mg/ml (20%) de hidroxapatita de calcio mediante mezclado con la espátula (2 minutos para 5 g de gel).

A continuación se esteriliza el gel así obtenido en el autoclave a 121°C durante 20 minutos (= gel X).

25 Se comparan el gel A1 y el gel Restylane® Perlane® según la siguiente prueba:

30 En frascos en plástico de 30 ml que contienen 5 ml de agua purificada, se introduce 1 ml de gel A1 en el frasco 1 y 1 ml de gel Restylane® Perlane® en el frasco 2. Tras cerrar los frascos, se mezclan manualmente los 2 frascos durante 5 segundos. Tras 10 segundos, se observa que el gel Restylane® Perlane® se ha desagregado/dispersado completamente en forma de una multitud de partículas en la disolución acuosa. El gel Restylane® Perlane® presenta por tanto correctamente una estructura denominada no cohesiva o bifásica (el gel se dispersa rápidamente en la disolución acuosa).

35 El gel A1, por su parte, sigue en forma de una "bola de gel" en la disolución acuosa. Por tanto, presenta correctamente una estructura denominada cohesiva o monofásica (el gel no se dispersa rápidamente en la disolución acuosa, presenta una gran cohesividad, al contrario que el gel Restylane® Perlane®).

40 Se comparan El gel B' según la invención y el gel X según la siguiente prueba (véase la figura 1): En frascos de plástico de 30 ml que contienen 5 ml de agua purificada, se introduce 1 ml de gel B' en el frasco 1 y 1 ml de gel X en el frasco 2. Tras cerrar los frascos, se mezclan manualmente los 2 frascos durante 5 segundos. Tras 10 segundos, se observa que el gel X se ha desagregado/dispersado completamente en forma de una multitud de partículas en la disolución acuosa. El gel X presenta una estructura viscoelástica no cohesiva particulada. No corresponde a las características del gel según la invención. En la práctica médica para un uso en estética, éste va a difundirse/migrar a nivel de la zona de inyección.

45 El gel B', por su parte, sigue en forma de una "bola de gel" en la disolución acuosa. Por tanto, presenta correctamente una estructura cohesiva particulada que va a permitir, en el contexto de la práctica médica para un uso en estética, no difundirse/migrar a nivel de la zona inyectada, y por tanto evitar las complicaciones asociadas a la migración de partículas de hidroxapatita en los tejidos, pero también tener un mejor rendimiento a largo plazo del producto ya que el gel inyectado va a poder mantener su capacidad de crear volumen en los tejidos a lo largo de un periodo prolongado, debido a la ausencia de migración del biomaterial de la zona tratada.

Ejemplo 3

50 *Importancia de la viscoelasticidad del gel según la invención - Comparativo*

Siendo C un gel preparado según el mismo protocolo (etapas 1 y 2) que el descrito en el ejemplo 1 introduciendo 200 mg de BDDE en lugar de 420 mg.

55 Siendo D un gel preparado según el mismo protocolo (etapas 1 y 2) que el descrito en el ejemplo 1 introduciendo 290 mg de BDDE en lugar de 420 mg.

Se caracteriza el gel C desde un punto de vista mecánico/reológico.

60 El reómetro usado para realizar las caracterizaciones reológicas es un AR2000 (TA instruments) con una geometría de placa de 40 mm, un entrehierro de 1000 micrómetros y una temperatura de análisis de 25°C.

Se realiza una medición de la razón de la viscosidad con respecto a la elasticidad ( $Tan\ \delta = G''/G'$ ) realizando un barrido de frecuencia de 0,01 a 100 Hz.

65 Se realiza una comparación de los parámetros a 1 Hz.

Gel	Tan delta = G''/G' (1 Hz)
C	0,84
D	0,58

5 Se constata que las partículas de hidroxiapatita tienen tendencia a sedimentarse a lo largo del tiempo (fenómeno correctamente observado haciendo pasar una muestra en la centrifugadora) para el gel C, lo cual no se observa para el gel D.

10 Esta sedimentación implica la obtención de productos a base de partículas de hidroxiapatita no homogéneos, lo cual no es satisfactorio para la acción de inyección del gel a través de la aguja (obstrucción de la aguja) pero tampoco para la seguridad y el rendimiento del producto a nivel de la zona de inyección (riesgos importantes de complicaciones tales como por ejemplo la creación de zonas denominadas duras).

Tal como se muestra en el ejemplo 2, la cohesividad del gel según la invención es importante pero también es necesario que el carácter viscoelástico del mismo sea apropiado con el fin de:

15 - evitar la sedimentación a lo largo del tiempo de las partículas de hidroxiapatita en el interior de su recipiente

- evitar tener un producto que va a separarse 2 fases (partículas de hidroxiapatita y gel de ácido hialurónico reticulado) durante la inyección y/o a nivel de la zona de inyección, creando así heterogeneidades a nivel de la zona tratada.

20 Por tanto, el carácter elástico del gel (con respecto a su viscosidad) debe ser suficientemente importante como para poder evitar la sedimentación de las partículas.

#### 25 Ejemplo 4

*Comparación de un gel según la invención con soluciones de la técnica anterior*

a) Formulación a base de HA no reticulado y de hidroxiapatita

30 Tal como se describe en la bibliografía, *in vivo*, el ácido hialurónico no reticulado tiene una semivida inferior a una semana.

35 Por consiguiente, una disolución de HA no reticulado con hidroxiapatita no es interesante ya que el ácido hialurónico no reticulado va a reabsorberse muy rápidamente y no va a permitir impedir la migración de las partículas de hidroxiapatita a largo plazo.

b) Formulación acuosa de hidroxiapatita

40 Se prepara una disolución acuosa de hidroxiapatita (S1) (el 30% de hidroxiapatita fosfocálcica que presenta una granulometría comprendida entre 30 y 50 micrómetros en una solución fisiológica isoosmolar y que presenta un pH neutro).

45 En un frasco de plástico de 30 ml que contiene 5 ml de agua purificada, se introduce 1 ml de la disolución S1. Se observa una dispersión inmediata de las partículas de hidroxiapatita en el frasco.

Al contrario que la formulación según la invención, la disolución S1 no puede mantener las partículas de hidroxiapatita a nivel de la zona de inyección a largo plazo.

c) Formulación a base de CMC y de hidroxiapatita (véase la figura 1).

50 Se prepara una formulación acuosa de carboximetilcelulosa (CMC) y de hidroxiapatita (S3) (el 30% de hidroxiapatita fosfocálcica que presenta una granulometría comprendida entre 30 y 50 micrómetros, y el 2% de CMC a 250.000 Da en una solución fisiológica isoosmolar y que presenta un pH neutro).

55 En un frasco de plástico de 30 ml que contiene 5 ml de agua purificada, se introduce 1 ml de la formulación S3. Tras cerrar el frasco, se mezcla manualmente el frasco durante 5 segundos.

60 Tras 10 segundos, se observa que la formulación S3 se ha desagregado/dispersado completamente en forma de una multitud de partículas en la disolución acuosa.

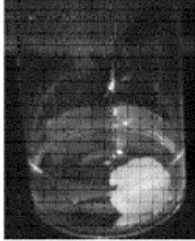
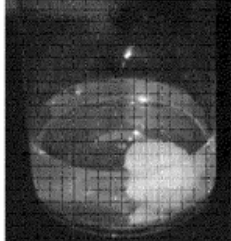
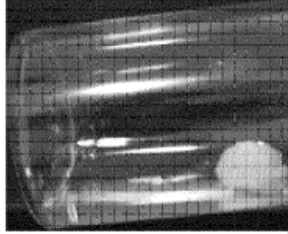
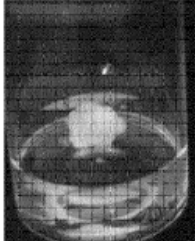
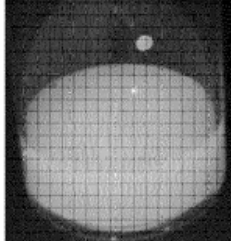
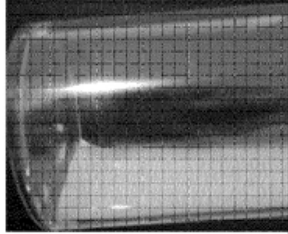

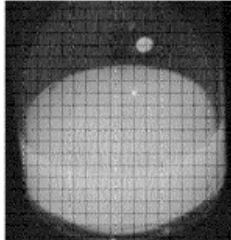
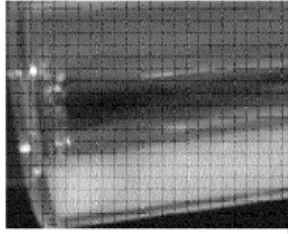
Al contrario que la formulación según la invención, la formulación S3 no puede mantener las partículas de hidroxiapatita a nivel de la zona de inyección a largo plazo.

## REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable, esterilizada con calor h3mido, usada con fines terap3uticos, en forma de gel viscoel3stico cohesivo particulado, que comprende
- 5
- i) 3cido hialur3nico reticulado, o una de sus sales, a una concentraci3n comprendida entre el 1% y el 4% (masa/volumen); permitiendo la reticulaci3n realizada obtener un gel a base de 3cido hialur3nico reticulado de estructura denominada cohesiva, y
- 10
- ii) hidroxiapatita, a una concentraci3n comprendida entre el 10% y el 70% (masa/volumen), estando dicha hidroxiapatita en forma de part3culas cuyo tama1o medio es inferior o igual a 80  $\mu\text{m}$ , o inferior o igual a 500 nm;
- 15
- presentando dicha formulaci3n acuosa est3ril inyectable propiedades viscoel3sticas tales que  $Tan\delta$  a la frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60 tal como se determina realizando un barrido de frecuencia de 0,01 a 100 Hz con ayuda de un re3metro con una geometr3a de placa de 40 mm, un entrehierro de 1000 micr3metros y una temperatura de an3lisis de 25°C.
- 20
2. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque la masa molecular del 3cido hialur3nico, o de una de sus sales, est3 comprendida entre  $2,5 \times 10^5$  Da y  $4 \times 10^6$  Da.
3. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque la concentraci3n del 3cido hialur3nico reticulado, o de una de sus sales, est3 comprendida entre el 1% y el 3% (masa/volumen).
- 25
4. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la concentraci3n de la hidroxiapatita est3 comprendida entre el 20% y el 60% (masa/volumen), preferiblemente entre el 30% y el 50%.
- 30
5. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la formulaci3n comprende adem3s uno o varios materiales cer3micos tales como el fosfato de tricalcio.
- 35
6. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 5, caracterizada porque el material cer3mico es el fosfato de tricalcio.
7. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la formulaci3n comprende adem3s uno o varios anest3sicos.
- 40
8. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 7, caracterizada porque el uno o varios anest3sicos se elige del grupo que comprende lidoca3na sola o en combinaci3n con adrenalina, proca3na, etidoca3na sola o en combinaci3n con adrenalina, artica3na sola o en combinaci3n con adrenalina, mepivaca3na, pramoca3na, quinisoca3na, o una o varias de las sales de estos anest3sicos.
- 45
9. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 8, caracterizada porque el anest3sico es el clorhidrato de lidoca3na.
10. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la formulaci3n comprende adem3s uno o varios antioxidantes.
- 50
11. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 10, caracterizada porque el uno o varios antioxidantes se elige de la familia de los polioles.
- 55
12. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 10, caracterizada porque los polioles comprenden sorbitol, glicerol, manitol o propilenglicol.
- 60
13. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la formulaci3n comprende adem3s uno o varios factores de crecimiento, tales como los de la familia de las "prote3nas morfogen3ticas 3seas" (BMP) y/o "factores de crecimiento transformantes  $\beta$ " (TGF- $\beta$ ).
- 65
14. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, usada en cirug3a ortop3dica, dental, maxilofacial ORL, gastroenterol3gica, urol3gica o ginecol3gica.
15. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, usada para el relleno y/o el restablecimiento de vol3menes y/o el remplazo de tejidos biol3gicos.

16. Kit que contiene la formulación acuosa estéril inyectable, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 5 17. Kit según la reivindicación 16 que se presenta en forma de jeringa, ampolla o frasco.
- 10 18. Procedimiento de preparación de una formulación acuosa estéril inyectable que comprende las etapas que consisten en: a) preparar una primera mezcla que comprende al menos del 1% al 4% en peso de ácido hialurónico reticulado o de una de sus sales, mediante formación de enlaces covalentes entre las cadenas de dicho biopolímero con ayuda de moléculas bi o polifuncionales, permitiendo la reticulación realizada  
15 obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada monofásica o cohesiva, b) purificar dicha primera mezcla, c) añadir a continuación la hidroxiapatita a una concentración comprendida entre el 10% y el 70% (masa/volumen) dispersándola de manera homogénea en el gel a base de ácido hialurónico reticulado estando dicha hidroxiapatita en forma de partículas cuyo tamaño medio es inferior o igual a 80  $\mu\text{m}$ , o inferior o igual a 500 nm, d) poner el gel así obtenido en forma lista para el empleo, e) esterilizar el producto con calor húmedo.

Fig. 1

Producto sometido a prueba	Observación antes de la agitación	Observación inmediatamente tras la agitación	Observación 10 segundos tras la agitación
Gel B' Según la invención (ejemplo 2)	 A glass dish containing a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass.	 A glass dish containing a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass, similar to the previous state.	 A glass dish tilted to show a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass.
Gel X (ejemplo 2)	 A glass dish containing a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass.	 A glass dish containing a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass, similar to the previous state.	 A glass dish tilted to show a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass.
Formulación a base de CMC y de hidroxiapatita (ejemplo 4)	 A glass dish containing a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass.	 A glass dish containing a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass, similar to the previous state.	 A glass dish tilted to show a dark liquid and a white, irregularly shaped solid mass.