

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 864**

51 Int. Cl.:

A61K 31/722	(2006.01)	A61Q 19/08	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 47/10	(2007.01)		
A61K 47/26	(2006.01)		
A61K 47/36	(2006.01)		
A61K 9/06	(2006.01)		
A61P 19/02	(2006.01)		
A61L 27/20	(2006.01)		
A61L 27/50	(2006.01)		
A61K 8/73	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/EP2015/067755**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016464**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15742326 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 3016663**

54 Título: **Composición termogelificable esterilizada**

30 Prioridad:

01.08.2014 FR 1457546

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

07.07.2017

73 Titular/es:

**KIOMED PHARMA (100.0%)
Rue Haute Claire 4
4040 Herstal, BE**

72 Inventor/es:

**CHAUSSON, MICKAËL y
LECLER, RENAUD**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 622 864 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición termogelificable esterilizada

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a una composición termogelificable esterilizada. Más en particular, la presente invención se refiere a una composición esterilizada al vapor, y a un procedimiento de esterilización para preparar dicha composición, y a sus usos, especialmente en el campo médico o para una inyección en el cuerpo humano o animal.
- 10 **[0002]** Se propugna esterilizar los aparatos, las muestras y otros dispositivos que deben estar en contacto con el cuerpo humano o animal. Para realizar de manera industrial dicha esterilización, resulta ventajoso esterilizar al vapor.
- [0003]** Sin embargo, en un cierto número de casos específicos, la esterilización al vapor no es conveniente.
- 15 Se trata especialmente de casos en los que los elementos para esterilizar no resisten una elevación de la temperatura, la presencia de vapor de agua, o incluso si se esteriliza el elemento se ve modificado por las condiciones de esterilización de manera que deja de ser conveniente para su uso en la aplicación pretendida.
- [0004]** Según la patente EP-2.361.640 se sabe que las composiciones termogelificables a base de quitosano no pueden esterilizarse al vapor, en concreto porque dicha esterilización influye en la estructura y las propiedades funcionales del hidrogel, y así en la capacidad de la composición de gelificarse o de recuperar su forma inicial, fluida. Por tanto se desaconseja realizar dicha esterilización al vapor para esterilizar un hidrogel de quitosano y sus derivados. Jarry *et al.* (Effects of steam sterilization on termogelling chitosan-based gels. J Biomed Mater Res (Appl Biomater), 2011, 58, 127-135) enseñan cómo esterilizar primero una solución de quitosano y después añadir los
- 20 otros compuestos del hidrogel, como beta glicerol fosfato de sodio, también esterilizados a su vez por separado. Este procedimiento de esterilización no interviene en el producto final, e impone realizar la mezcla de las soluciones de forma aséptica, lo cual no resulta ventajoso desde un punto de vista industrial. Además se desaconseja según la patente US-6.344.488 esterilizar al vapor una composición termogelificable de quitosano ya que el gel es termosensible. La solución de quitosano se esteriliza así al vapor antes de la adición del agente gelificante.
- 25 Chengdong Ji *et al.* han descrito la esterilización de quitosano en presencia de fosfato de glicerol (Sterilization-free chitosan hydrogels for controlled drug release, Materials Letters, 2012, 72,110-112), pero no se ha estudiado ninguna propiedad mecánica. No es posible conocer si los geles de quitosano así esterilizados pueden usarse de forma distinta que como vector de medicamentos, especialmente cuando se buscan propiedades reológicas y/o mecánicas concretas. Jarry *et al.* (Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: effect on termogelling chitosan-
- 30 β -glycerophosphate systems, Chem Pharm Bull, 2002, 50(10), 1335-340) han estudiado también el efecto de la esterilización al vapor de los geles de quitosano. Sugieren un poder beneficioso de determinados polioles. Los pH de estas composiciones termogelificables son inferiores a 7,2. Por último, la patente US-6.344.488 sostiene que la transición sol-gel de dichas composiciones termogelificantes («termogeles») de quitosano es irreversible a pH superior a 6,9. Estos termogeles cuya transición sol-gel es irreversible presentan el inconveniente en la práctica de
- 35 que no pueden ser esterilizados por aumento de la temperatura o al vapor para que las composiciones no se gelifiquen antes de su uso. Se trata por tanto de un inconveniente de primer orden.
- [0005]** La invención tiene como objetivo resolver estos problemas técnicos.
- 45 **[0006]** Existe en particular la necesidad de suministrar una composición estéril termogelificable, gelificada a temperatura fisiológica de un ser humano o animal, que presenta buenas propiedades fisicoquímicas para aplicaciones terapéuticas o estéticas.
- [0007]** La invención tiene especialmente como objetivo suministrar una composición termogelificable estéril
- 50 que pueda inyectarse fácilmente estando gelificada a temperatura fisiológica de un ser humano. Dicha composición estéril debe presentar buenas propiedades fisicoquímicas para aplicaciones terapéuticas o estéticas, en particular a la temperatura fisiológica de 37 °C. Más en particular, dicha composición estéril deberá poder presentar propiedades viscoelásticas modulables según la aplicación con el fin de aproximarse con la mayor precisión posible a las propiedades necesarias para el objetivo terapéutico o estético pretendido.
- 55 **[0008]** La invención tiene asimismo como objetivo suministrar una composición estéril termogelificable cuyo pH sea aceptable para las aplicaciones terapéuticas o estéticas pretendidas. Más en particular, dichas composiciones estériles deberían poder presentar un pH modulable según la aplicación pretendida, especialmente lo más próximo posible al pH fisiológico.

[0009] La presente invención tiene asimismo como objetivo suministrar una composición estéril termogelificable cuya osmolaridad es próxima a la fisiológica para la aplicación terapéutica o estética pretendida, en particular una osmolaridad de 100 a 700 mosm/kg y, en particular, de 200 a 500 mosm/kg (escrito también como
5 «mosmol/kg»).

[0010] La presente invención tiene asimismo como objetivo según una variante suministrar una composición estéril cuya transición sol-gel sea reversible, especialmente con el fin de que las condiciones de almacenamiento y/o de transporte no necesitan un control drástico de la temperatura, y/o que la composición pueda experimentar una
10 esterilización al vapor, en concreto varios ciclos de esterilización al vapor.

[0011] La invención tiene además como objetivo suministrar una composición que puede usarse como viscosuplemento y, en particular, que puede ser inyectada en o en mezcla con un líquido sinovial. La invención tiene como objetivo especialmente suministrar un líquido sinovial reconstruido, es decir, una composición que restaura las
15 propiedades de una articulación, en particular aportándole una capacidad de absorber los choques durante un movimiento y de ser lubricada al menos en reposo.

[0012] La invención tiene además como objetivo suministrar una composición que presenta buenas propiedades en mezcla con un líquido sinovial y, en particular, un líquido sinovial de un ser humano.
20 Ventajosamente, la invención tiene como objetivo suministrar una composición que presenta una buena resistencia a la degradación en un entorno inflamatorio, en particular en términos de conservación del módulo de elasticidad G' y de la viscosidad en reposo.

[0013] La presente invención permite de manera sorprendente resolver uno o varios problemas que se
25 enuncian a continuación.

[0014] Se ha descubierto de manera sorprendente que dicha composición podía prepararse cuando esta composición comprende un quitosano que presenta unidades de N-acetil-glucosamina, unidades de glucosamina y unidades de glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-glucosamina, presentando dicho
30 quitosano sustituido preferentemente un grado de sustitución de las unidades de glucosamina comprendido entre el 10 y el 50 %, expresado en número de moles del sustituyente con respecto al número de moles de unidades totales.

[0015] Según una realización en particular, las unidades de glucosamina son unidades de D-glucosamina (unidades de D-glucosamina, unidades de D-glucosamina sustituidas, unidades de N-acetil-D-glucosamina y en su
35 caso unidades de N-acetil-D-glucosamina sustituidas).

[0016] Según una variante, el quitosano presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina, y en su
40 caso unidades de N-acetil-D-glucosamina sustituidas.

[0017] Por «D-glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina», se entiende que las unidades de D-glucosamina sustituidas no forman unidades de N-acetil-D-glucosamina después de la sustitución.

[0018] Según una variante, un quitosano sustituido presenta una sustitución de las unidades de D-glucosamina únicamente.
45

[0019] Según otra variante, un quitosano sustituido presenta una sustitución de las unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina simultáneamente, y en el que el grupo de sustitución está unido de manera covalente, según una variante a los grupos amina del quitosano únicamente, o según otra variante a los grupos
50 amina e hidroxilo del quitosano simultáneamente.

[0020] Según una realización, el grado de sustitución de las unidades de D-glucosamina expresado en número de moles de unidades de D-glucosamina con respecto al número de moles de unidades totales (unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, sustituidas o no) del quitosano sustituido está comprendido entre el 0,1 y
55 el 0,5 %.

[0021] Se ha descubierto según una variante específica, que un grado de sustitución de las unidades de glucosamina, expresado en número de moles de unidades de glucosamina en las que el grupo sustituyente está ligado por un enlace covalente, con respecto al número de moles totales de unidades de glucosamina y N-acetil-

glucosamina del quitosano sustituido, de 0,1 a 0,5 permitía ventajosamente solubilizar el quitosano sustituido, en su caso en presencia de un agente gelificante, por ejemplo una sal de poliol o azúcar, y más en particular una sal de glicerol fosfato, a un pH y a una temperatura en un intervalo adaptado especialmente a las aplicaciones pretendidas. Puede ser más sencillo expresar el grado de sustitución por la razón molar o por la razón másica de los reactivos de partida con respecto al quitosano, tal como se explica más adelante.

5 [0022] Según una variante, el quitosano sustituido es soluble por su grado de sustitución en una solución de agua tamponada a pH 7, por ejemplo con un tampón de fosfato salino (PBS), comprendiendo la solución una concentración de quitosano sustituido del 1 % en masa con respecto a la masa de la solución total, midiéndose el pH a 8 °C.

10 [0023] Según una variante, especialmente cuando el quitosano sustituido presenta un carácter de ion bipolar, existe un intervalo de pH estrecho en el que el quitosano sustituido es insoluble. Esta particularidad se elude según la técnica anterior con la adición de un agente gelificante, por ejemplo sal de poliol o de azúcar, y más en particular sal de glicerol fosfato, para que el quitosano sustituido se solubilice al pH considerado de interés para la invención.

15 [0024] Sustituyendo al quitosano, ha sido posible preparar una solución de un quitosano sustituido soluble en una solución acuosa cuyo pH varía en un gran intervalo, mientras que el quitosano no sustituido solo es soluble a pH inferiores a de 5,5 a 6,5. La solución acuosa de quitosano sustituido puede presentar en general un pH comprendido entre 6,5 y 8,5. Esta solución según la invención puede ser gelificada. La gelificación o transición sol-gel puede realizarse así a pH neutro o a pH fisiológico, como por ejemplo a un pH comprendido entre 7 y 8,5, mientras que el quitosano no es soluble a pH 7, siendo el pKa de los grupos amina de aproximadamente 5,5 (y no cargado a pH 7 en el que los grupos amina no están protonados). El quitosano sustituido presenta así una capacidad de solubilizarse a diferentes pH gracias a la presencia de grupos sustituyentes que modifican su perfil de solubilización. De manera sorprendente ha sido posible preparar composiciones termogelificables con un quitosano sustituido y, en particular, a baja concentración de quitosano, en particular con un quitosano de masa molecular muy baja, baja o media, presentando una transición sol-gel reversible o en la que las propiedades del gel resultante están en concordancia con las aplicaciones planteadas, en particular como viscosuplemento de un líquido sinovial. Dicha composición que comprende un quitosano sustituido presenta una transición sol-gel cuando la temperatura aumenta. Así, de manera muy ventajosa la transición sol-gel, es decir, el paso de la solución del estado fluido al estado de gel, puede ser modulada en función del grado de sustitución para que esta transición sol-gel se produzca especialmente en condiciones de pH, osmolalidad y temperatura deseadas. La invención permite así ventajosamente, según una variante, preparar una composición termogelificable fluida a una temperatura inferior a la de uso, normalmente a una temperatura inferior a la temperatura fisiológica, por ejemplo de 37 °C, aunque esté en forma de gel a la temperatura de uso, normalmente a la temperatura fisiológica, por ejemplo de 37 °C, a pH neutro (pH 7) o a pH fisiológico, y por ejemplo de 7 a 8,5, con una osmolalidad conveniente para el uso planteado. Se trata por ejemplo de una osmolalidad fisiológica.

20 [0025] Según otra variante, la invención se refiere a una composición termogelificable, en forma de gel antes de uso, normalmente a temperatura ambiente, y por ejemplo a temperatura de conservación (por ejemplo, de 4 a 8 °C), y a temperatura de uso, normalmente a la temperatura fisiológica, por ejemplo de 37 °C, a pH neutro (pH 7) o a pH fisiológico, y por ejemplo de 7 a 8,5, con una osmolalidad conveniente para el uso planteado. Se trata por ejemplo de una osmolalidad fisiológica.

25 [0026] Se entiende por «composición termogelificable» o «termogel» un fluido, y especialmente una solución que presenta la propiedad de experimentar una transición sol-gel por modificación de la temperatura, preferentemente por aumento de la temperatura, y más preferentemente por aumento de la temperatura hasta la temperatura fisiológica del cuerpo humano o animal, y así presentarse en forma de un gel a temperatura fisiológica después de la inyección o implantación. La composición termogelificable de la invención puede presentarse en forma de hidrogel, es decir, de gel acuoso.

30 [0027] Según la presente invención, se entiende por gel una composición que no se deshace bajo su propio peso, y más específicamente que no presenta ningún flujo en ausencia de estímulo exterior por retorno de un recipiente que contiene la composición por ejemplo durante 30 segundos, y caracterizada por un módulo elástico G' superior al módulo de pérdida G'' , midiéndose los módulos por reología con ayuda de un reómetro de geometría «Couette» o con ayuda de un reómetro con una geometría plana y un barrido en modo oscilatorio de baja amplitud (por ejemplo, reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument)). La diferencia entre los módulos G' y G'' del gel es característica de la cohesión del gel.

[0028] Según la presente invención, se entiende por «fluido» una composición que se deshace bajo su propio peso por retorno de un recipiente que contiene la composición por ejemplo durante 30 segundos y caracterizada por un módulo elástico G' inferior al módulo de pérdida G'' , midiéndose los módulos por reología con ayuda de un reómetro de rotación con cizalla de Couette (cizalla del fluido entre dos cilindros coaxiales).

5

[0029] Ventajosamente, se ha descubierto que el grado de sustitución de las unidades de D-glucosamina permite modular la transición sol-gel. Se ha descubierto especialmente que el grado de sustitución de las unidades de D-glucosamina permite formar una composición termogelificable sin agente gelificante, como por ejemplo una sal de glicerol. Así la invención permite ventajosamente suministrar una composición termogelificable en la que el grado mínimo de sustitución del quitosano se elige de manera que el quitosano sustituido sea soluble en la composición termogelificable. Se puede verificar también la solubilidad en diferentes tampones. Por «soluble en agua» se entiende que el quitosano sustituido no presenta turbiedad visible a simple vista. Más específicamente, se puede confirmar la ausencia de turbiedad por una densidad óptica inferior a 0,5, y preferentemente inferior a 0,2, medida por espectrometría UV-visible a la longitud de onda de 600 nm de una muestra que comprende de agua en su caso tamponada por un tampón al pH en cuestión, tal como acetato de sodio a 0,5 M, en referencia a un recipiente de referencia que solo comprende el disolvente acuoso usado para la muestra medida, pero en ausencia del quitosano sustituido. Cuando el quitosano no está sustituido suficientemente, la composición no es soluble en un intervalo de pH satisfactorio, por ejemplo comprendido entre $\text{pH} = 7$ y $\text{pH} = 8,5$, a temperatura ambiente, y en consecuencia deja de ser termogelificable cuando se aumenta la temperatura.

20

[0030] La invención permite suministrar una composición termogelificable en la que el grado máximo de sustitución del quitosano se elige para que una transición sol-gel se efectúe a una temperatura inferior a la temperatura de uso, preferentemente inferior a la temperatura fisiológica, por ejemplo a la temperatura de 37 °C. La transición sol-gel puede constatarse mediante el cruzamiento de los módulos G' y G'' según el procedimiento definido en la invención.

25

[0031] Ventajosamente, el grado de sustitución se determina por espectrometría de resonancia magnética (RMN) del protón en solución en medio acuoso, con ayuda de un espectrómetro de resonancia magnética, por ejemplo un espectrómetro Bruker de frecuencia 400 MHz. Las muestras se preparan de la manera siguiente: se disuelven 5 a 6 mg de quitosano sustituido en 1 ml de agua deuterada. Se añaden 2 μl de ácido clorhídrico deuterado de concentración 12 M a la solución del quitosano sustituido con el fin de alcanzar una zona de pH apropiada para el análisis. La zona de pH apropiada depende de la naturaleza del sustituyente. El espectro se registra a una temperatura de 70 °C, con un número de barridos comprendido entre 64 y 256 y un tiempo de relajación comprendido entre 1 y 8 segundos. El espectro obtenido se trata por desconvolución con el fin de determinar el valor de la integral de las áreas de las señales de interés para poder calcular el grado de sustitución del quitosano sustituido.

35

[0032] El procedimiento de preparación de la muestra, las condiciones de registro del espectro de RMN y la fórmula usada para calcular el grado de sustitución deben adaptarse a cada tipo de quitosano sustituido, ya que depende de la naturaleza y de la posición del sustituyente.

40

[0033] A continuación se ofrece un ejemplo de cálculo del grado de sustitución (GS) para el caso del quitosano sustituido por un grupo succinilo unido al grupo amina de las unidades de D-glucosamina (quitosano succinamida, Fórmula 1). Las abreviaturas son las siguientes: I_{H2} es igual a la integral del área de la señal del protón de las unidades de D-glucosamina en posición 2; $I_{CH2\text{ succi}}$ es igual a la integral del área de la señal de los protones de los dos grupos -CH₂ de los sustituyentes succinilo unidos a las unidades de D-glucosamina (en los átomos de carbono en posición alfa y beta de la función amida); $I_{CH3\text{ acetilo}}$ es igual a la integral del área de la señal de los protones de los grupos acetilo de las unidades de N-acetil-D-glucosamina.

45

[0034] En la Figura 1 se ilustra un ejemplo de espectro de RMN del quitosano succinamida y la fórmula desarrollada del quitosano succinamida.

50

$$\%GS = \frac{I_{CH2\text{succi}}/2}{I_{H2} + I_{CH2\text{succi}}/2 + I_{CH3\text{acetilo}}/3}$$

55 **Fórmula 1-** Cálculo del grado de sustitución del quitosano sustituido por un grupo succinilo por RMN del protón

- 5 **[0035]** Si existe otro procedimiento RMN y más ventajoso para estimar el grado de sustitución de manera fiable, conviene usar dicho procedimiento. La fórmula mostrada a continuación debe ser adaptada por el experto en la materia en lo que se refiere a la preparación de la muestra y las señales para integrar, especialmente en función de la resolución, de la robustez y de la posición de los protones de las señales que se usarán para el cálculo del grado de sustitución.
- [0036]** Ventajosamente, la composición presenta una transición sol-gel termorreversible.
- 10 **[0037]** Ventajosamente, la presente invención permite suministrar una composición a baja concentración de quitosano sustituido.
- [0038]** Ventajosamente, la concentración de quitosano es inferior al 4 %, por ejemplo inferior al 3 %, o incluso por ejemplo inferior al 2 % en masa con respecto a la masa total de la composición (m/m).
- 15 **[0039]** Según una variante específica, la concentración de quitosano sustituido es inferior al 1,9 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final. Ventajosamente, la concentración de quitosano sustituido está comprendida entre el 0,5 y el 1,5 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final. Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente del 1,2 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.
- 20 **[0040]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente del 2,5 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.
- [0041]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente del 2,0 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.
- 25 **[0042]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente del 1,5 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.
- 30 **[0043]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente del 1,3 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.
- [0044]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente del 1,1 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.
- 35 **[0045]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente del 1,0 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.
- [0046]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente del 0,9 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.
- 40 **[0047]** Además, el grado de sustitución de las unidades de D-glucosamina permite ventajosamente no usar una solución a pH ácido (normalmente 5,0 a 5,5) para solubilizar el quitosano y después se debe añadir necesariamente una sal de azúcar o de poliol, como glicerol fosfato, para aumentar el pH hasta aproximadamente 7. Por el contrario, la presente invención permite ventajosamente preparar directamente una solución a pH neutro o a pH fisiológico, como por ejemplo de 6,2 a 8,5, en la que el quitosano sustituido es soluble y presenta así igualmente la ventaja por ejemplo de que no haya necesidad de añadir una solución ácida para solubilizar el quitosano. Esto presenta la ventaja de asegurar una libertad mucho mayor en el intervalo de pH que puede usarse para la composición termogelificable, y así preparar composiciones termogelificables a pH neutro o fisiológico. Se puede usar por ejemplo un agente tampón que sea un ácido o una base para ajustar el pH. Por ejemplo se puede usar un tampón básico y después ajustar con un ácido débil el pH de la composición termogelificable.
- 45 **[0048]** Según una variante ventajosa, la composición termogelificable no comprende agente gelificante. Según esta variante, la composición termogelificable presenta la propiedad de gelificarse por la simple presencia del quitosano sustituido. En particular, según esta variante, la composición no comprende un agente gelificante tal como se define en la invención. En particular, según una variante preferida, la composición termogelificable de la invención no comprende una sal de glicerol y, en particular, no una sal de glicerol fosfato (escrito también como «glicerofosfato»). Esta variante permite evitar la presencia de glicerol fosfato o de otro agente gelificante equivalente cuyo efecto técnico es únicamente mecánico en el gel. Según esta variante, se prefiere evitar compuestos tales
- 55

como los agentes gelificantes que no tienen beneficio terapéutico ni de interacción de naturaleza biológica/química con el cuerpo del sujeto tratado.

5 **[0049]** Según una variante, la composición comprende un agente gelificante, preferentemente un agente gelificante que induce una transición sol-gel de la composición, por ejemplo una sal de glicerol fosfato por ejemplo en forma de sodio o calcio, por ejemplo en su forma pentahidratada, estando dicho agente gelificante presente preferentemente en la composición a una concentración comprendida entre el 1 y el 20 %, preferentemente entre el 3 y el 9 %, en masa con respecto a la masa total de la composición final (m/m).

10 **[0050]** El agente gelificante es ventajosamente al menos una sal de poliol o de azúcar, comprendida cualquiera de sus mezclas.

15 **[0051]** Entre las sales de poliol o de azúcar se puede citar especialmente las sales de fosfato, y más en particular las sales dibásicas de monofosfato de poliol o de azúcar. Se puede citar igualmente las sales de sulfato como por ejemplo las sales de monosulfato de poliol o de azúcar. Entre las sales de fosfato se puede citar especialmente los monofosfatos dibásicos de glicerol, que incluyen el glicerol-2-fosfato, el sn-glicerol-3-fosfato y el 1-glicerol-3-fosfato. Según una variante, se trata del beta-glicerol fosfato. Entre los polioles y los azúcares para dichas sales, se puede citar los polioles y azúcares siguientes: histidinol, acetol, dietilostilbestrol, indolglicerol, sorbitol, ribitol, xilitol, arabinitol, eritritol, inositol, manitol, glucitol, palmitoil-glicerol, linoleoil-glicerol, oleoil-glicerol, 20 araquidonoil-glicerol, fructosa, galactosa, ribosa, glucosa, xilosa, ramnulosa, sorbosa, eritrolosa, desoxirribosa, cetosa, manosa, arabinosa, fuculosa, fructopiranososa, cetoglucosa, sedoheptulosa, trehalosa, tagatosa, sacarosa, alosa, treosa, xilulosa, hexosa, metiltiorribosa o metiltio-desoxi-ribulosa, o una cualquiera de sus mezclas.

25 **[0052]** Según una variante específica la concentración de sal de poliol o de azúcar, y preferentemente de glicerol, está comprendida entre el 1 y el 10 %. Ventajosamente, la concentración de sal de poliol o de azúcar, y preferentemente de glicerol, está comprendida entre el 1 y el 7 %. Ventajosamente, la concentración de sal de poliol o de azúcar es del 2 % al 5 %. Los valores se expresan en masa con respecto a la masa total de la composición.

30 **[0053]** Según una variante, la sal de glicerol es un glicerol fosfato, y más exactamente una sal de sodio, como por ejemplo glicerol fosfato de disodio.

35 **[0054]** La sal de poliol o de azúcar, y preferentemente el glicerol fosfato, se usa para llevar el pH a un pH básico, y después se ajusta el pH de la composición por la adición de un ácido, lo que presenta la ventaja de suministrar una composición termogelificable cuyo pH es modulable de manera muy fácil y precisa.

40 **[0055]** Cuando la composición termogelificable no comprende agente gelificante, el pH puede ajustarse con un ácido, y por ejemplo un ácido orgánico débil o un ácido mineral fuerte (ácido clorhídrico). Un ácido orgánico débil usado por ejemplo para ajustar el pH de la composición es el ácido acético o el ácido glutámico.

45 **[0056]** Así, la composición según la invención presenta un pH superior o igual a 7, por ejemplo superior o igual a 7,1, y por ejemplo un pH de 7,2 a 8,5.

50 **[0057]** El pH se mide en la composición termogelificable final en forma de solución, es decir, antes de la transición sol-gel. El pH se determina según el procedimiento descrito en la farmacopea europea (EP 2.2.3). El pHmetro usado es un pHmetro del intervalo Sartorius provisto de un electrodo combinado de vidrio (PY-P11). Las medidas de pH se realizan entre 20 y 25 °C.

[0058] Ventajosamente, el pH puede ajustarse en el intervalo comprendido entre 6,5 y 8,0.

55 **[0059]** Según una variante, el pH es superior a 7,40.

[0060] Según una variante específica, el pH es de 7,50 +/- 0,05.

[0061] Según otra variante específica, el pH es de 7,20 +/- 0,05.

60 **[0062]** Según otra variante específica, el pH es de 7,00 +/- 0,05.

[0063] Según una variante preferida, la composición de la invención presenta una transición sol-gel a una temperatura superior a 30 °C, preferentemente a una temperatura comprendida entre 30 y 50 °C, y preferentemente

entre 32 y 45 °C, y más preferentemente entre 35 y 40 °C.

[0064] Ventajosamente, la composición termogelificable de la invención está en forma fluida a temperatura ambiente, es decir, entre 20 y 25 °C.

5

[0065] Según una variante preferida, la composición de la invención es fluida a una temperatura inferior a 37 °C, preferentemente a una temperatura inferior a 35 °C, y más preferentemente a una temperatura comprendida entre 2 °C y 20 °C. Según una variante, la composición de la invención es fluida a la temperatura de conservación, por ejemplo de 2 a 8 °C, o a temperatura ambiente extendida, por ejemplo entre 15 y 30 °C.

10

[0066] Según una variante, la composición termogelificable de la invención es fluida a una temperatura superior a 0 °C y en forma de gel a una temperatura superior o igual a 10 °C. Según otra variante, la composición de la invención es fluida a una temperatura superior a 0 °C y en forma de gel a una temperatura superior o igual a 5 °C.

15

[0067] Según una realización, la composición presenta una osmolalidad de 100 a 700 mosm/kg, preferentemente de 200 a 650 mosm/kg, por ejemplo de 200 a 600 mosm/kg, o incluso por ejemplo de 200 a 550 mosm/kg, preferentemente de 200 a 500 mosm/kg. La osmolalidad puede expresarse en mosm/L, pero entonces se habla de osmolaridad. Cuando se trata de una composición acuosa, la densidad es cercana a aproximadamente 1, la osmolalidad es sustancialmente igual a la osmolaridad, como para las composiciones de la invención.

20

[0068] Según una variante, la composición termogelificable según la invención es isoosmolar.

25

[0069] Según una variante, cuando la composición de la invención está destinada a ser inyectada en el plasma de un ser humano, es preferible que la osmolalidad esté comprendida entre 250 y 400, y más específicamente entre 280 y 350 mosm/kg.

30

[0070] Según otra variante, cuando la composición de la invención está destinada a ser inyectada en el líquido sinovial de un ser humano, es preferible que la osmolalidad esté comprendida entre 300 y 490, y preferentemente entre 360 y 470 mosm/kg.

35

[0071] La determinación de la osmolalidad de las soluciones se efectúa con un micro-osmómetro automático (Osmometer Tipo 15M de la marca Lôser Messtechnik). El equipo se calibra previamente con una solución de 300 mosm/kg. La muestra se coloca en un recipiente previsto para este efecto, y se coloca a la temperatura estándar de la medida.

40

[0072] Ventajosamente, la composición termogelificable de la invención composición presenta en estado fluido una viscosidad aparente dinámica comprendida entre 20 y 800 mPa.s, por ejemplo de 40 a 500 mPa.s.

45

[0073] La viscosidad aparente dinámica se mide con ayuda de un viscosímetro móvil rotatorio, por ejemplo un viscosímetro móvil rotatorio de la marca Brookfield, por ejemplo provisto de una aguja («spindle») de tipo S18 a una velocidad de 5 vueltas/min y a una temperatura de 8 °C.

50

[0074] Según una variante, la composición de la invención presenta una viscosidad aparente que permite una inyección sencilla en un dispositivo de inyección como por ejemplo una jeringa, durante su llenado. Según una variante, la composición de la invención presenta una viscosidad aparente que permite una inyección sencilla a través de una aguja fina, por ejemplo una jeringa de calibre 22, a temperatura ambiente. Por inyección «sencilla» se entiende preferentemente que la fuerza que se ejerce en dicha jeringa es inferior a 50 newtons para hacer fluir la composición termogelificable a través de una aguja de calibre 22, preferentemente una fuerza inferior a 20 newtons.

55

[0075] La composición termogelificable según la invención puede diluirse, por ejemplo en agua, en su caso tamponada. Por ejemplo se puede diluir la composición de la invención en un tampón que permite ajustar el pH a un pH fisiológico. Más en particular se puede diluir por ejemplo la composición de la invención en un tampón de acetato (por ejemplo, un tampón de acetato de sodio trihidratado 10 M) para ajustar el pH a aproximadamente 7,5.

60

[0076] Para un gel, el módulo G' es superior a G'' . Para una solución, el módulo G' es inferior a G'' . La transición sol-gel se caracteriza por el cruzamiento de los módulos G' y G'' .

[0077] Cuando la solución presenta un carácter «termogelificable», el módulo G' se hace superior al módulo G'' por encima de una cierta temperatura y, en particular, a una temperatura inferior a la temperatura fisiológica (es

decir, la temperatura a la que se inyecta o se implanta el producto) o después de un cierto tiempo después de la implantación o inyección en el cuerpo a temperatura fisiológica.

[0078] El módulo G' y el módulo G'' se cruzan cuando aumenta la temperatura.

5

[0079] Los módulos G' y G'' se miden por ejemplo con ayuda de un reómetro de rotación con cizalla de Couette que aplica una cizalla del fluido entre dos cilindros coaxiales por ejemplo un reómetro ARES de la marca Rheometrics, por ejemplo con una frecuencia de 1 Hz y una deformación del 5%. Se puede realizar la medida de los módulos G' y G'' a una cierta temperatura. La medida de los módulos suministrada aquí se realiza partiendo del producto a una cierta temperatura, por ejemplo la temperatura de almacenamiento del producto de 4 °C. Se deja que el producto alcance una cierta temperatura naturalmente, por ejemplo la temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, sin controlar la velocidad a la que aumenta la temperatura.

10

[0080] Ventajosamente, el módulo de conservación G' está comprendido entre 0,001 y 1.000, el módulo de pérdida G'' está comprendido entre 0,001 y 1.000, G' es superior a G'' a la temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, después de gelificación.

15

[0081] Según una variante, ventajosamente, el módulo de conservación G' está comprendido entre 0,001 y 1.000, el módulo de pérdida G'' está comprendido entre 0,001 y 1.000, G' es inferior a G'' a temperatura de almacenamiento y/o a temperatura ambiente, y G' es superior a G'' a la temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, después de gelificación.

20

[0082] Ventajosamente, los módulos de conservación G' y de pérdida G'' se cruzan cuando el producto pasa de una temperatura de conservación en un refrigerador, por ejemplo 2 o 4 °C o de una temperatura ambiente, por ejemplo 18 °C a 25 °C, a una temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, lo que traduce la transición sol-gel y el carácter termogelificable del sistema, con un tiempo de transición sol-gel adaptado a la aplicación pretendida.

25

[0083] La gelificación puede realizarse con el mantenimiento a una temperatura suficiente y durante un tiempo suficiente para gelificar la solución de quitosano. Esta gelificación se efectúa por ejemplo en un horno mantenido por ejemplo a 40 °C. Según una variante, la composición termogelificable de la invención está en forma de gel a una temperatura de 15 °C. Según la presente invención la gelificación puede tener lugar *in situ*, es decir, por ejemplo después de la inyección en el cuerpo humano o animal (de sangre caliente). La gelificación permite especialmente colocar el gel de forma localizada.

30

[0084] Más en particular, el tiempo necesario para la transición sol-gel está comprendido generalmente entre 1 segundo y 48 horas después del paso de la temperatura de 2 o 4 °C (temperatura de almacenamiento) a 37 °C (temperatura fisiológica), es decir por ejemplo *in situ* después de la inyección de la solución en un cuerpo humano o animal.

35

[0085] Según una variante, la transición sol-gel se completa después de un tiempo que varía entre 5 segundos y 24 horas, preferentemente menos de 4 horas, más preferentemente menos de 2 horas después del paso de la temperatura de 2 o 4 °C a 37 °C.

40

[0086] Según otra variante, la gelificación tiene lugar instantáneamente (gelificación producida desde el aumento de temperatura (y antes de la medida)).

45

[0087] Según una variante, la composición termogelificable está en forma gelificada. Por ejemplo la composición de la invención se conserva en una jeringa en forma gelificada.

[0088] Según una variante, no hace falta que la composición se gelifique en la jeringa de inyección sino que se gelifica *in situ* en el lugar deseado. Es posible realizar varios ciclos de transición sol-gel ya que la composición según la invención presenta ventajosamente una transición sol-gel reversible. Esto permite esterilizar ventajosamente la composición según la invención mediante un ascenso de la temperatura, es decir, normalmente por autoclave. Esto permite suministrar ventajosamente una composición termogelificable cuya posibilidad de obtener la gelificación no se ve afectada por las variaciones de temperatura, especialmente durante el almacenamiento, el transporte o la esterilización.

50

[0089] Al estar la composición según la presente invención destinada especialmente a ser inyectada, las propiedades de gelificación están adaptadas a su inyección mediante una jeringa provista de una aguja de tamaño

variable en función de la aplicación pretendida, por ejemplo de calibre 19 a 30, por ejemplo de calibre 22. Normalmente, la persona que realiza la inyección debe empujar manualmente el émbolo de la jeringa. Así pues se necesita que la resistencia a la compresión del fluido no gelificado permita la inyección más fácil posible. Una vez inyectada la composición debe gelificarse para presentar las propiedades viscoelásticas requeridas.

5

[0090] Según una variante, la fuerza necesaria para el flujo de la composición fluida en el orificio de una aguja de calibre 22 está comprendida entre 1 y 20 newtons. Preferentemente esta fuerza está comprendida entre 2 y 15 newtons. Según una variante, esta fuerza está comprendida entre 2 y 8 newtons.

10 **[0091]** Según una variante, la fuerza necesaria para el flujo de la composición fluida en el orificio de una aguja de calibre 25 está comprendida entre 2 y 15 newtons. Según una variante, esta fuerza está comprendida entre 2 y 10 newtons.

15 **[0092]** Según una variante, la fuerza necesaria para el flujo de la composición fluida en el orificio de una aguja de calibre 27 está comprendida entre 1 y 20 newtons. Preferentemente esta fuerza está comprendida entre 2 y 15 newtons. Según una variante, esta fuerza está comprendida entre 2 y 10 newtons. La inyectabilidad se mide con ayuda de un banco de pruebas para la medida de propiedades mecánicas, por ejemplo de la marca Instron Bluehill, provisto de una celda de fuerza de 500 N. El sistema de inyección se ha diseñado específicamente para la medida de la fuerza necesaria para realizar la inyección de la solución empujando el émbolo de la jeringa, provista de la aguja con el diámetro deseado. El sistema presenta un cilindro metálico de una altura de 15 cm provisto de una ranura vertical de 4 cm de anchura. Sobre el cilindro se monta una placa metálica cuadrada de 10 cm de lado. Esta placa está provista de un orificio en su medio, de 0,5 cm de radio. La jeringa, provista de una aguja de diámetro de calibre 22 se pone a la temperatura de 4 °C. Se aplica una velocidad de bajada del émbolo de la jeringa constante de 1 mm por segundo.

25

[0093] Según una variante, la composición comprende un tampón, por ejemplo un tampón de acetato o un tampón de fosfato.

30 **[0094]** Los agentes de tampón son conocidos para el experto en la materia.

30

[0095] Preferentemente, la composición comprende un azúcar reductor, por ejemplo manitol o sorbitol.

35 **[0096]** Según una variante, la presente invención se refiere a una composición termogelificable que comprende del 0,1 al 5 % en masa de quitosano sustituido, y preferentemente del 1 al 7 % de sal de poliol o de azúcar, por ejemplo de glicerol fosfato, y en su caso del 0,1 al 10 % de azúcar reductor. Ventajosamente, la composición de la presente invención comprende del 0,1 al 1,9 % en masa de quitosano sustituido y del 2 al 6 % en masa de glicerol, preferentemente de glicerol fosfato, y en su caso del 0,1 al 2,5 % en masa de azúcar reductor, con respecto a la masa total de la composición.

40 **[0097]** Según una variante, la presente invención se refiere a una composición termogelificable que comprende del 0,1 al 5 %, y preferentemente del 0,5 al 2,5 %, en masa de quitosano sustituido, en su caso del 0,1 al 10 % de azúcar reductor, y en su caso del 0,1 al 5 %, y preferentemente del 0,5 al 2,5 %, de ácido hialurónico. Ventajosamente, la composición de la presente invención comprende del 0,1 al 2,5 % en masa de quitosano sustituido, en su caso del 0,1 al 2,5 % en masa de azúcar reductor, y en su caso del 0,1 al 5 %, y preferentemente del 0,5 al 2,5 %, de ácido hialurónico, con respecto a la masa total de la composición, de manera que dicha composición no presenta preferentemente glicerol o una sal de glicerol.

45

[0098] Resulta ventajoso usar al menos un poliol en la composición de la invención (además de la sal de poliol como glicerol fosfato, si está presente).

50

[0099] Dichos polioles pueden elegirse por ejemplo entre el grupo que consiste en: isopropanol, sorbitol, manitol, alquilenglicol como propilenglicol, poli(alquilglicol), por ejemplo un poli(etilenglicol), fructosa, galactosa, ribosa, glucosa, xilosa, ramnulosa, sorbosa, eritrolosa, desoxirribosa, cetosa, manosa, arabinosa, fuculosa, fructopiranososa, cetoglucosa, sedoheptulosa, trehalosa, tagatosa, sacarosa, alosa, treosa, xilulosa, hexosa, metiltiorribosa, metiltio-desoxirribulosa, y una cualquiera de sus mezclas.

55

[0100] Según una variante específica, el reactivo que permite la sustitución es anhídrido succínico. Según esta variante específica, el quitosano sustituido es un quitosano succinamida, es decir, un quitosano con grupos «succinilo» unidos de manera covalente al átomo de nitrógeno de los grupos amina de las unidades de D-

glucosamina.

[0101] El quitosano se modifica mediante sustitución según una reacción que implica a un quitosano y un agente de sustitución en el que el quitosano y el agente de sustitución se hacen reaccionar para obtener el 5 quitosano sustituido en los grupos D-glucosamina.

[0102] La invención se refiere igualmente a un procedimiento de preparación de quitosano sustituido. Este procedimiento comprende especialmente:

- 10 - una etapa de disolución del quitosano en una solución acuosa, preferentemente agua, ajustando preferentemente el pH a un pH ácido para el que el quitosano es soluble;
- una etapa de reacción de sustitución del quitosano con un agente de sustitución;
- una etapa de parada de la reacción de sustitución preferentemente en un grado de sustitución del quitosano comprendido entre el 10 y el 50 %, expresado en número de moles del sustituyente con respecto al número de 15 moles de unidades totales, por ejemplo por modificación del pH del medio de reacción, o por precipitación del quitosano en un «no disolvente» en el que el quitosano sustituido no es soluble;
- la purificación del quitosano sustituido.

[0103] Se entiende por «no disolvente» un disolvente en el que el quitosano situado no es soluble, es decir, 20 en el que es observable una turbiedad a simple vista. Dichos disolventes son por ejemplo disolventes polares como por ejemplo etanol, metanol, acetona, etc.

[0104] La etapa de disolución del quitosano en una solución acuosa puede efectuarse en agua añadiendo un 25 ácido apropiado.

[0105] Durante la etapa de reacción, la cantidad de agente de sustitución puede adaptarse en función del grado de sustitución deseado para el quitosano sustituido. Durante la etapa de reacción, el tiempo de reacción puede adaptarse en función del grado de sustitución deseado para el quitosano sustituido. Ventajosamente, la 30 reacción se interrumpe para poner fin a la reacción de sustitución del quitosano según el grado de sustitución deseado para el quitosano sustituido.

[0106] Se conocen diferentes reacciones para sustituir un quitosano. Se puede hacer referencia por ejemplo a la solicitud WO-2010/142.507 relativa especialmente a la preparación de derivados de quitosano.

35 **[0107]** El quitosano sustituido puede comprender unidades de D-glucosamina y N-acetil-glucosamina, en las que al menos algunas de las unidades están injertadas (o acopladas) por uno o varios grupos funcionales que pueden ser idénticos o diferentes.

[0108] Según una variante, el quitosano sustituido comprende unidades de glucosamina y N-acetil- 40 glucosamina, comprendiendo dichas unidades uno o varios grupos funcionales. Las modificaciones químicas se realizan por ejemplo por acoplamiento de una o varias funciones de las unidades de N-acetil-glucosamina, es decir, funciones hidroxil y/o funciones amina, y/o unidades de glucosamina, es decir, funciones hidroxil y/o funciones amina.

[0109] Según una realización en particular, los grupos funcionales presentes en el quitosano sustituido se 45 eligen entre el grupo que comprende, sin limitarse a ellos, grupos funcionales hidrófobos, grupos funcionales hidrófilos, grupos funcionales iónicos y una cualquiera de sus combinaciones. Según una variante particular, los grupos funcionales hidrófobos se eligen entre el grupo que consiste en los grupos alquilo, alqueno, aralquilo, alcarilo y una cualquiera de sus combinaciones. Estos grupos comprenden en general entre 1 y 100 átomos de carbono, y más generalmente entre 1 y 50 átomos de carbono, por ejemplo entre 1 y 25, o incluso entre 1 y 10 50 átomos de carbono, pudiendo uno o varios de los átomos de carbono estar sustituidos por ejemplo por un heteroátomo y/o un átomo elegidos entre boro, nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio, germanio, una función éster, amida, urea, uretano, y una cualquiera de sus combinaciones, y en los que uno o varios átomos de hidrógeno pueden ser sustituidos por ejemplo por un heteroátomo y/o un átomo elegido entre el grupo que consiste en átomos de halógeno, grupos alcoxi, amida, y una cualquiera de sus combinaciones.

55 **[0110]** Según otra realización, los grupos funcionales hidrófobos se eligen entre el grupo que consiste en ácidos carboxílicos, ácidos organosulfónicos, poliéteres, poliéteres de aminas, poliésteres, esteroides, porfirinas y una de sus combinaciones.

[0111] Según otra variante, los grupos funcionales hidrófilos se eligen entre el grupo que consiste en diaminas, poliaminas, dioles, polioles, diácidos, poliácidos, éteres de corona, glimas, polialqueniéteres, polialquencilaminas, polialquenieteraminas, ácidos poliacrílicos, polialcoholes vinílicos, y una cualquiera de sus combinaciones.

5

[0112] Según otra variante particular, los grupos funcionales iónicos se eligen entre el grupo que consiste en sales metálicas, sales de amonio, sales de fosonio, sales de sulfato, sales de ácidos carboxílicos, sales de fosfato, diácidos carboxílicos, poliácidos carboxílicos, usándose una función de ácido carboxílico para formar un enlace covalente con quitosano, diaminas, poliaminas, usándose una función amina para formar un enlace covalente con

10

[0113] Según una variante particular, el grupo funcional que sustituye al quitosano es un grupo aminoalquilo. Por ejemplo el grupo funcional que sustituye al quitosano es un grupo aminoetilo.

15 **[0114]**

Según una variante, el quitosano sustituido es:

- un quitosano amino-alquilo, tal como por ejemplo un quitosano amino-etilo, etc. y sus equivalentes;
- un quitosano N-alquilo o O-alquilo hecho hidrófobo, tal como por ejemplo un quitosano etanoilo, propanoilo, butanoilo, pentanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo o dodecanoilo y sus equivalentes;
- 20 - un quitosano cargado positivamente, tal como por ejemplo un quitosano trialquilamonio (por ejemplo, un trimetilquitosano o TMC) y sus equivalentes;
- un quitosano N-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamonio y su contraión tal como un cloruro y sus equivalentes;
- un quitosano cargado negativamente, tal como un quitosano succinamida (succinil quitosano), un quitosano N,O-carboxialquilo, un quitosano N,O-sulfoalquilo, y sus equivalentes;
- 25 - un quitosano neutro tal como por ejemplo el quitosano N,O-acetilo, un quitosano N,O-alquilo, etanoilo, propanoilo, butanoilo, pentanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, dodecanoilo, y sus equivalentes;
- un quitosano de ion bipolar, tal como por ejemplo un quitosano que comprende polímeros hidrófobos, tal como por ejemplo un poliéster alifático, tal como los homopolímeros y copolímeros de ácido láctico, ácido glicólico, épsilon-caprolactona, p-dioxanona de poliésteres alifáticos y/o aromáticos; poliamidas alifáticas; polímeros etilénicos y sus
- 30 copolímeros; polímeros y copolímeros de propileno; policarbonatos; poliacrilatos, y sus equivalentes.

[0115] Según una realización en particular, pueden usarse otros derivados en el marco de la presente invención y comprenden quitosanos O-sustituídos cuya sustitución se realiza en los grupos hidroxilo de las unidades de glucosaminas y/o N-acetil-glucosamina.

35

[0116] Según una variante, el quitosano presenta como sustituyente polímeros hidrófobos, elegidos preferentemente entre el grupo que consiste en poliésteres alifáticos, y poliamidas alifáticas, homopolímeros o copolímeros de alqueno, tales como por ejemplo polímeros de etileno o de propileno, policarbonatos, poliacrilatos, y una cualquiera de sus combinaciones.

40

[0117] Según una variante, el quitosano presenta como sustituyente un poliéster alifático y, en particular, una polilactida.

[0118] Como procedimiento de sustitución del quitosano se puede citar igualmente la reacción descrita en la

45

[0119] Se puede citar igualmente la patente US-3.953.608.

[0120] Según una variante, se puede usar como agente de sustitución por ejemplo un agente N-alquilante, o un anhídrido de alquilo, que comprende en su caso una o varias insaturaciones, que comprende en su caso uno o varios heteroátomos y/o funciones (como por ejemplo éter, tioéter, carboxi, éster, amida, etc.) que comprende en su caso uno o varios sustituyentes (como alquilo, amina, hidroxilo, carboxilo, ácido carboxílico, etc.).

50

[0121] Según una variante, se puede citar a modo de ejemplo el anhídrido succínico, el anhídrido glutámico, el anhídrido acetoxisuccínico, el anhídrido metilsuccínico, el anhídrido dicetiltárrico, anhídrido diglicólico, anhídrido maleico, anhídrido itacónico, anhídrido citracónico, y una cualquiera de sus mezclas.

55

[0122] En teoría, sería conveniente cualquier agente de sustitución que permita suministrar un quitosano soluble en la composición final, a pH neutro o fisiológico.

[0123] Cuando la etapa de parada de la reacción se realiza por precipitación, la purificación puede consistir en la separación del quitosano sustituido insoluble y del no disolvente.

5 **[0124]** Después de la purificación, el procedimiento de la invención puede comprender una etapa de secado del quitosano sustituido, y después en su caso de trituración del mismo para obtener un polvo.

[0125] Según una variante específica, el agente de sustitución es anhídrido succínico. El quitosano sustituido es un quitosano succinamida.

10

[0126] El quitosano succinamida puede obtenerse de la manera siguiente:

- Disolución del quitosano en una solución acuosa a pH inferior a 6,5;

- La solución se mantiene a una temperatura comprendida entre 0 °C y 100 °C preferentemente entre 20 °C y 50 °C y más preferentemente entre 25 °C y 35 °C.

15

- Después de la disolución del quitosano, adición de anhídrido succínico, por ejemplo en forma de polvo, a la solución de quitosano. La cantidad de anhídrido succínico y el número de adición de anhídrido succínico están adaptados en función del grado de sustitución del quitosano sustituido deseado.

20

- Después de un tiempo suficiente para que se alcance un grado de sustitución mínimo, por ejemplo después de un tiempo mínimo de 15 min, la reacción se detiene. La reacción puede detenerse por ejemplo mediante modificación del pH del medio de reacción o mediante una etapa de precipitación en un no disolvente tal como etanol, metanol, acetona,...

- A continuación el quitosano sustituido se purifica ventajosamente, por ejemplo por una técnica de diálisis, o por ciclos de precipitación/solubilización en un no disolvente, o por una técnica de filtrado tangencial.

25

- A continuación el producto purificado se seca preferentemente. Se puede secar el producto por ejemplo por pulverización-secado (atomización), o en un horno (al vacío o a presión atmosférica), o incluso por liofilización.

[0127] El pH de la solución acuosa de quitosano puede ajustarse por ejemplo con una solución de ácido débil, tal como ácido acético, ácido láctico, etc., para disolver el quitosano.

30

[0128] El grado de sustitución del quitosano puede variar ventajosamente del 10 al 30 %, preferentemente del 15 al 30 %, y más preferentemente del 15 al 25 %, expresado en número de moles del sustituyente con respecto al número de moles de unidades totales. En particular, la presente invención se refiere a una composición termogelificable que comprende un quitosano sustituido que presenta un grado de sustitución del 10 al 30 %, preferentemente del 15 al 30 %, y más preferentemente del 15 al 25 %, de manera que dicha composición no comprende glicerol fosfato.

35

[0129] El grado de sustitución del quitosano succinamida está correlacionado con la razón másica de los reactivos con respecto al quitosano al inicio de la reacción. Según una variante, se prefiere usar una razón másica de los reactivos superior a 0,13 en el caso de un quitosano succinamida. Según una variante, se prefiere usar una razón másica de los reactivos inferior a 0,2 en el caso de un quitosano succinamida.

40

[0130] Según una variante específica, el agente de sustitución es un agente de alquilación de los grupos aminos de las unidades de D-glucosamina. El quitosano sustituido es ventajosamente un quitosano alquilado en las unidades de D-glucosamina. Como agentes de alquilación se pueden citar los halogenoalquilos como los halogenometilos, como yoduro de metilo, bromuro de metilo, cloruro de acilo, como por ejemplo los que tienen uno o varios grupos carboximetilo, aminoetilo y/o trimetilo, etc.

45

[0131] Según esta variante, el quitosano sustituido es un quitosano N-alquilado. Según una variante específica, el quitosano sustituido es el quitosano que tiene un grupo de sustitución trimetilo (N,N,N-trimetilquitosano, abreviado como «TMC»).

50

[0132] Según una variante, el quitosano alquilado, preferentemente TMC, se obtiene con una razón molar de los reactivos comprendida entre 0,1 y 0,35, y preferentemente entre 0,15 y 0,30, expresado en número de moles de agente de alquilación con respecto al número de moles de grupos amina presentes inicialmente en el quitosano.

55

[0133] El quitosano se refiere por ejemplo con el número CAS 9012-76-4.

[0134] El quitosano usado para la invención es ventajosamente de origen fúngico y preferentemente obtenido

del micelio de un hongo del tipo *Ascomicetos* y, en particular, *Aspergillus niger*, y/o de un hongo *Basidiomiceto* y, en particular, *Lentinula edodes* (shiitake) y/o *Agaricus bisporus* (hongo de París). Preferentemente, el quitosano se obtiene de *Agaricus bisporus*. El quitosano es preferentemente muy puro, es decir, que contiene pocas impurezas derivadas de su origen fúngico, y de una calidad microbiológica compatible con su uso como implante o composición farmacéutica. Se describe un procedimiento de preparación del quitosano en las patentes WO-03/068.824 (EP-1.483.299; US-7.556.946).

5 **[0135]** El quitosano preparado puede tener diferentes masas moleculares, comprendidas generalmente entre 10000 y 300000.

10 **[0136]** Según una variante, la masa molecular media está comprendida entre 20000 y 60000.

[0137] Según otra variante, la masa molecular media está comprendida entre 60000 y 100000.

15 **[0138]** Según otra variante, la masa molecular media está comprendida entre 100000 y 120000.

[0139] Según otra variante, la masa molecular media está comprendida entre 120000 y 150000.

20 **[0140]** Según otra variante, la masa molecular media está comprendida entre 150000 y 220000.

[0141] Es posible hidrolizar el quitosano para reducir su masa molecular.

[0142] Preferentemente en este caso la masa molecular media es la masa molecular media en viscosidad (Mv), calculada a partir de la viscosidad intrínseca según la ecuación de Mark-Houwink. La viscosidad intrínseca se mide por viscosimetría capilar, con un viscosímetro capilar de tipo Ubbelohde, según el procedimiento de la monografía de la Farmacopea Europea EP2.2.9. Se mide el tiempo de flujo de la solución a través de un tubo capilar adaptado (Lauda, por ejemplo el tubo capilar Ubbelohde 510 01 de 0,53 mm de diámetro) con ayuda de un viscosímetro automático Lauda Visc, primero a la concentración inicial de quitosano y después para varias diluciones, por ejemplo según las recomendaciones del procedimiento EP2.2.9. De ello se deduce la viscosidad intrínseca reducida para cada una de las concentraciones. Se anota la viscosidad reducida en función de la temperatura, y se extrapola el valor a la concentración 0 para deducir la viscosidad intrínseca. Por ejemplo es preciso anotar la viscosidad reducida (η_{red} en ml/g) de las *i* diluciones en función de la concentración C de las *i* diluciones (g/ml) según la fórmula 5.

35 Fórmula 2. $[\eta_{red}] = (t_1 - t_0) - (1 - C)$

[0143] Para calcular la masa viscosimétrica media, se aplica la ecuación de Mark-Houwink con las constantes k y alfa recomendadas por Rinaudo *et al.* (Int. J. Biol. Macromol, 1993, 15, 281-285), según el valor de GA del quitosano, de acuerdo con una de las tres fórmulas siguientes.

40 Fórmula 3. $Mv = ([\eta]/0,082)^{(1/0,76)}$,

para un valor de GA del 2 %;

45 Fórmula 4. $Mv = ([\eta]/0,076)^{(1/0,76)}$,

para un valor de GA del 10 % (por ejemplo, 11,5 %);

50 Fórmula 5. $Mv = ([\eta]/0,074)^{(1/0,76)}$,

para un valor de GA del 20 % (por ejemplo, 21 %).

[0144] Para los valores de GA intermedios, se realiza una interpolación lineal para calcular la masa viscosimétrica media (Mv).

55 **[0145]** Preferentemente, el quitosano usado tiene una masa molecular media comprendida entre 120000 y 150000 o comprendida incluso entre 150000 y 220000.

[0146] Según una variante específica, el quitosano sustituido presenta preferentemente una masa molecular

media de 150000 a 220000 y un grado de sustitución comprendido entre el 10 y el 50 %, expresándose la masa molecular preferentemente antes de la sustitución.

[0147] Según otra variante específica, el quitosano sustituido presenta una masa molecular media de 120000 a 150000 de manera que el grado de sustitución está comprendido entre el 12 y el 40 %, preferentemente entre el 12 y el 30 %, en concreto entre el 20 y el 30 % expresándose la masa molecular preferentemente antes de la sustitución.

[0148] Ventajosamente, el quitosano presenta un grado de acetilación comprendido entre el 5 y el 50 %. El grado de acetilación se expresa en número de unidades de N-acetil-D-glucosamina con respecto al número de unidades totales N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina presentes. Según una variante, el grado de acetilación está comprendido entre el 20 y el 45 %.

[0149] Según una variante, el grado de acetilación está comprendido entre el 5 y el 20 %.

[0150] Según una variante, el grado de acetilación está comprendido entre el 15 y el 25 %.

[0151] Según una variante, el grado de acetilación está comprendido entre el 20 y el 30 %.

[0152] Según una variante, el grado de acetilación está comprendido entre el 25 y el 40 %.

[0153] El grado de acetilación se determina por potenciometría. El quitosano se disuelve en una solución de ácido clorhídrico. El exceso de ácido clorhídrico que no haya reaccionado con las funciones aminas del quitosano se dosifica mediante una solución valorada de hidróxido de sodio. De ello se deduce el número de moles de unidad D-glucosamina presentes en el quitosano y por tanto, por sustracción, el grado de acetilación.

[0154] El quitosano presenta ventajosamente un grado de acetilación controlado. Por «quitosano que tiene un grado de acetilación controlado» se entiende un producto cuyo grado de acetilación, es decir, la proporción de unidades de N-acetil-glucosamina, puede ajustarse de manera controlada.

[0155] Ventajosamente, la composición de la invención puede comprender igualmente otro biopolímero distinto al quitosano sustituido. Según una variante ventajosa, el biopolímero es un polisacárido, por ejemplo ácido hialurónico o hialuronato de sodio.

[0156] El ácido hialurónico puede presentar una masa molecular de hasta 4 MDa. La masa molecular del ácido hialurónico puede reflejarse en su viscosidad intrínseca. El ácido hialurónico puede presentar una viscosidad intrínseca comprendida entre 1 y 4 m³/kg, y caracterizarse por ejemplo como de masa molecular baja (por ejemplo, aproximadamente 1 a 2 m³/kg) o alta (por ejemplo, aproximadamente 2 a 4 m³/kg).

[0157] Ventajosamente, la concentración de ácido hialurónico es inferior al 4 %, por ejemplo inferior al 3 %, o más aún por ejemplo inferior al 2 % en masa con respecto a la masa total de la composición (m/m).

[0158] Según una variante específica, la concentración de ácido hialurónico es inferior al 1,9 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final. Ventajosamente, la concentración de ácido hialurónico está comprendida entre el 0,5 y el 1,5 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final. Según una variante particular, la concentración de ácido hialurónico es aproximadamente del 0,9 %, el 1,0 %, el 1,1 %, el 1,2 %, el 1,3 %, el 1,5 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.

[0159] La proporción entre quitosano y ácido hialurónico puede variar por ejemplo del 5 al 95 %, por ejemplo del 10 al 90 %, y más aún por ejemplo del 30 al 70 % de quitosano sustituido y del 5 al 95 %, por ejemplo del 10 al 90 %, y más aún por ejemplo del 30 al 70 % respectivamente, de ácido hialurónico, con los porcentajes expresados por la relación: masa seca de quitosano sustituido/masa seca de ácido hialurónico). Según una variante, esta proporción entre quitosano y ácido hialurónico es de 1/1 (el 50 % de quitosano y el 50 % de ácido hialurónico). Según otra variante, la proporción d entre el quitosano y el ácido hialurónico es de 1,5/0,5 (el 75 % de quitosano y el 25 % de ácido hialurónico).

[0160] Ventajosamente, la composición termogelificable a base de quitosano sustituido, en presencia de ácido hialurónico, forma un gel. Ventajosamente, según esta variante, las propiedades reológicas de la composición

termogelificable pueden modularse con la concentración, la relación entre quitosano y ácido hialurónico y la masa molecular del ácido hialurónico.

[0161] Ventajosamente las propiedades del gel se conservan en presencia de ácido hialurónico.

5

[0162] El gel que comprende el quitosano sustituido, en su caso en mezcla con el ácido hialurónico, permite ventajosamente presentar una buena cohesión y una buena capacidad de absorción de los golpes del gel a baja frecuencia de oscilación, por ejemplo a una frecuencia similar a la impuesta al líquido sinovial de una rodilla durante la marcha (representada por el valor del módulo G' a 0,6 Hz) y una buena capacidad de lubricación de una articulación (representada por la viscosidad en reposo).

10

[0163] La invención se refiere igualmente a un procedimiento de preparación de una composición termogelificable según la invención.

15 **[0164]**

Según una variante, el procedimiento comprende normalmente:

- la disolución de un quitosano sustituido en una solución acuosa, preferentemente agua, en su caso tamponada, preferentemente a pH comprendido entre 6,2 y 8,5 y preferentemente entre 6,5 y 7,5;
- el ajuste en su caso del pH a un pH fisiológico, por ejemplo por adición de un agente de tamponamiento;
- el ajuste en su caso de la osmolalidad de la composición;
- el ajuste en su caso de la viscosidad de la composición.

20

[0165] Según una variante, el procedimiento comprende normalmente:

- 25 - la disolución de un quitosano sustituido en una solución acuosa, preferentemente agua, en su caso tamponada, preferentemente a pH comprendido entre 6,2 y 8,5 y preferentemente entre 6,5 y 7,5;
- el ajuste en su caso del pH a un pH fisiológico;
- la mezcla con una solución de sal de azúcar o de polioliol, como por ejemplo una solución de sal de glicerol fosfato;
- el ajuste en su caso del pH a un pH fisiológico, por ejemplo por adición de un agente de tamponamiento;
- 30 - el ajuste en su caso de la osmolalidad de la composición;
- el ajuste en su caso de la viscosidad de la composición.

30

[0166] El procedimiento puede comprender la adición de otros componentes de la composición, si fuera necesario.

35

[0167] Según una variante la disolución del quitosano se efectúa en agua que comprende un azúcar reductor, como por ejemplo el manitol.

[0168] Según una variante, el agente de tamponamiento es un tampón de acetato.

40

[0169] Según una variante, el agente de tamponamiento es un tampón de fosfato.

[0170] Ventajosamente, el procedimiento comprende igualmente una etapa posterior de llenado de un dispositivo de inyección, como por ejemplo una jeringa, con la composición según la invención. Ventajosamente, el dispositivo de inyección, como por ejemplo una jeringa puede someterse a continuación a una esterilización al vapor. Este dispositivo, por ejemplo una jeringa, puede envasarse a continuación, preferentemente de manera estéril.

45

[0171] Resulta ventajoso usar un quitosano que presenta un grado de pureza suficiente para la aplicación planteada.

50

[0172] La presente invención se refiere más en particular a una composición inyectable que comprende o consiste en una composición termogelificable según la invención.

[0173] Según una variante, la composición según la invención se usa como composición farmacéutica inyectable o dispositivo médico inyectable o implantable.

55

[0174] La presente invención se refiere más en particular a una composición según la invención para un uso en un tratamiento terapéutico, que comprende por ejemplo la inyección por vía subcutánea, intradérmica, intraocular o intraarticular, de dicha composición, por ejemplo para la reparación o el relleno de al menos un tejido corporal que

necesita una reparación o un relleno.

[0175] Según una variante, el tejido corporal se elige entre los tejidos que pertenecen a las cuerdas vocales, músculos, ligamentos, tendones, cartílagos, órganos sexuales, huesos, articulaciones, ojos, dermis, epidermis, una o 5 varias capas de la piel, mesodermo o una cualquiera de sus combinaciones, y más en particular a las uniones articulares.

[0176] La presente invención se refiere más en particular a una composición según la invención para el tratamiento de una osteoartritis, o la reparación de un defecto de cartílago, por ejemplo mediante inyección en el 10 líquido sinovial o después de la mezcla con la sangre e implantación en el cartílago.

[0177] La presente invención se refiere más en particular a un dispositivo médico, por ejemplo un implante médico, caracterizado porque comprende o consiste en una composición según la invención.

15 **[0178]** La presente invención puede igualmente comprender uno o varios aditivos o excipientes que permiten modular sus propiedades. Según una variante específica la composición de la invención comprende una suspensión de partículas, por ejemplo partículas sólidas o de gel.

[0179] La presente invención se refiere igualmente a una composición según la invención para un uso en un 20 procedimiento de tratamiento o de estética mediante relleno dérmico («dermal filling»). Se trata especialmente por ejemplo de inyectar una composición según la invención de forma subcutánea o intradérmica.

[0180] La presente invención se refiere igualmente a una composición según la invención para un uso en un procedimiento de tratamiento superficial de la piel por inyección múltiple por vía intradérmica. Dichas composiciones 25 pueden usarse normalmente en dermatología, como tratamientos estéticos. Dicho procedimiento tiene por objeto por ejemplo esponjar la piel para hacerle perder un aspecto arrugado (tratamiento de las arrugas grandes y/o pequeñas). Dicho tratamiento puede aplicarse a un sujeto que desee dar a su piel un aspecto rejuvenecido.

[0181] La presente invención se refiere igualmente a una composición según la invención para un uso en un 30 procedimiento terapéutico o estético en la que la composición es un agente de viscosuplemento. Se trata en este caso por ejemplo de inyectar de forma intraarticular la composición de la invención especialmente para limitar el rozamiento de la membrana sinovial situada a ambas partes de la articulación.

[0182] La presente invención se refiere igualmente a una composición según la invención para un uso como 35 vector celular, de uno o varios tipos celulares, y/o uno o varios agentes activos. Puede tratarse de agentes activos desde un punto de vista farmacéutico o biológico. La composición de la invención puede ser compatible en la práctica con la presencia de células, preferentemente de células vivas. Entre las células vivas de interés, se puede citar por ejemplo: condrocitos (cartílago articular), fibrocondrocitos (menisco), fibroblastos del ligamento (ligamento), fibroblastos de la piel (piel), tenocitos (tendones), miofibroblastos (músculo), células madre mesenquimatosas, 40 glóbulos rojos (sangre) y queratinocitos (piel). La composición de la invención puede concebirse igualmente como vector terapéutico para el suministro guiado y/o de liberación controlada de al menos un agente terapéutico.

[0183] Según una variante, se añade sangre, o plasma, o un lisado plaquetario, o plasma rico en plaquetas, o cualquier fluido biológico de manera que la composición de la invención permite por ejemplo aumentar los 45 rendimientos del producto.

[0184] Según una variante, la composición según la invención se formula en una forma sólida (por ejemplo, una película o una espuma porosa), que se solubiliza una vez implantada.

50 **[0185]** Según una variante, la composición se formula en forma de una composición nebulizable (spray).

[0186] La presente invención se refiere igualmente a una composición según la invención para un uso en un procedimiento terapéutico o estético de uno o varios tejidos u órganos afectados por una temperatura excesiva, como en el caso de una quemadura.

55 **[0187]** La presente invención se refiere igualmente a una composición en forma de líquido sinovial artificial que comprende o consiste en la composición termogelificable según la invención.

[0188] La composición según la presente invención permite imitar un líquido sinovial sano o mejorar un

líquido sinovial sano o defectuoso buscando mejorar sus propiedades de absorción de los golpes (identificable por el módulo de elasticidad G'), a la vez que es fácil de inyectar para cargar una jeringa por ejemplo o para su inyección en el cuerpo humano o animal. A modo de indicación, el módulo elástico G' del líquido sinovial sano está comprendido entre 40 y 100 Pa, y su módulo de pérdida G'' está comprendido entre 1 y 10 Pa.

5

[0189] Según una variante, la composición termogelificable se inyecta en forma fluida, y después se gelifica *in situ*.

[0190] Según una variante, la composición termogelificable se inyecta en forma de gel. Ventajosamente, según esta variante, el gel es fácil de inyectar a través de una aguja fina.

10

[0191] En general los intervalos de valores de osmolalidad y pH buscados en las aplicaciones biomédicas se aproximan a los valores siguientes:

15 -Osmolalidad:

[0192]

- Iso-osmolar con el plasma: 285-295 mosm/kg;

20

Iso-osmolar con el líquido sinovial: 404 +/- 57 mosm/kg, según «Clin Orthop Relat Res, 1988, 235, 289-95» y «Biochem Biophys Res Comm, 2012, 422, 455-461»;

-pH:

25

[0193] Un pH fisiológico es en general superior a 6,8, en particular superior a 7,0 y, en particular, de 7,4 (por ejemplo, para el plasma o un líquido sinovial).

[0194] El pH del plasma es en general de 7,4. El pH del líquido sinovial es en general de 7,768 +/- 0,044 según «J Bone Joint Surg Br, 1959, 41-B(2), 388-400»; o de 7,3 según «Acta Orthop Scand, 1969, 40, 634-641», o también según «Clin Rheumatol 2006, 25, 886-888».

30

[0195] El pH sinovial en caso de osteoartrosis se considera en general más bajo que el del líquido sinovial sano.

35

[0196] De manera totalmente sorprendente, se ha descubierto que una composición termogelificable según la presente invención presenta muy buenas propiedades en mezcla con un líquido sinovial, en particular un líquido sinovial obtenido de la rodilla de un ser humano afectado de osteoartrosis.

[0197] A diferencia del efecto que se observa con las composiciones de la técnica anterior a base de ácido hialurónico, cuyas propiedades de viscosuplemento se degradan cuando el ácido hialurónico se diluye con el líquido sinovial de un paciente afectado de osteoartrosis, las composiciones termogelificables de la invención, en mezcla con un líquido sinovial conservan sus propiedades de gel, incluso después de que esta dilución esté en el líquido sinovial. De forma todavía más sorprendente, las composiciones termogelificables según la invención presentan propiedades reológicas reforzadas por la mezcla con un líquido sinovial, en particular un líquido sinovial obtenido de la rodilla de un ser humano afectado de osteoartrosis.

45

[0198] Se puede hablar de efecto sinérgico entre la composición termogelificable de la invención y un líquido sinovial.

50

[0199] Así, la presente invención se refiere a una mezcla de un líquido sinovial con una composición termogelificable tal como se define mediante la presente invención, por ejemplo según una relación de volumen entre composición termogelificable/líquido sinovial comprendida entre 20/80 y 80/20 (v/v), y por ejemplo de 50/50 (v/v).

55

[0200] La composición según la presente invención es estéril. Muy ventajosamente, la composición según la presente invención se esteriliza por aumento de la temperatura, preferentemente en autoclave.

[0201] Según una variante, las composiciones de la invención son transparentes o translúcidas.

- [0202]** Por «translúcida» se entiende que se puede distinguirse un objeto cuando la composición se coloca entre el ojo del observador y el objeto. Por «transparente» se entiende que se pueden distinguir caracteres alfanuméricos cuando la composición se coloca entre el ojo del observador y los caracteres observados. En general esta evaluación se realiza con un grosor de composición de aproximadamente 1 cm.
- [0203]** Según una variante, la composición de la invención es incolora, es decir, en particular un observador a simple vista no atribuye un color específico a la composición.
- 10 **[0204]** La invención se refiere en particular a artículos o envases, preferentemente estériles, que comprenden uno o varios dispositivos de inyección precargados con una composición termogelificable según la invención. Se trata normalmente de jeringas precargadas.
- 15 **[0205]** La composición de la invención se esteriliza. Según una variante, la composición de la invención se esteriliza al vapor, por ejemplo por una elevación de la temperatura a una temperatura superior a 100 °C, y preferentemente superior a 120 °C, por ejemplo entre 121 y 138 °C, en autoclave, durante un tiempo suficiente para la esterilización, por ejemplo en general de 15 a 20 minutos.
- 20 **[0206]** La invención cubre en particular una composición termogelificable esterilizada que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina y en su caso de las unidades de N-acetil-D-glucosamina sustituidas.
- 25 **[0207]** Ventajosamente, la composición termogelificable esterilizada presenta una transición sol-gel reversible.
- [0208]** Según una variante, la composición se esteriliza al vapor.
- 30 **[0209]** Según una variante, la composición se esteriliza por aumento de la temperatura, preferentemente en autoclave.
- [0210]** Ventajosamente, según una variante, la composición termogelificable esterilizada no se gelifica después de la esterilización.
- 35 **[0211]** Ventajosamente, según una variante, la composición termogelificable esterilizada es gelificada a una temperatura superior a 10 o 15 °C, antes y después de la esterilización.
- 40 **[0212]** Según una variante, la invención cubre una solución esterilizada, de manera que dicha solución está constituida por o comprende una composición termogelificable según la invención.
- [0213]** Según una variante la composición se esteriliza al vapor con una elevación de la temperatura a una temperatura superior a 100 °C, preferentemente bajo una cámara cerrada. Ventajosamente, se esteriliza mediante elevación de la temperatura a una temperatura superior a 120 °C en autoclave.
- 45 **[0214]** La invención se refiere según otro aspecto a un procedimiento de esterilización de dicha composición.
- [0215]** Más en particular la invención se refiere a un procedimiento de esterilización de una composición termogelificable, caracterizado porque comprende al menos las etapas siguientes:
- 50 - colocar una composición termogelificable que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina en la cámara de un autoclave;
- elevar y mantener la temperatura de la cámara del autoclave a una temperatura de esterilización y durante un tiempo de esterilización, siendo la temperatura y el tiempo de esterilización suficientes para esterilizar la composición
- 55 termogelificable;
- disminuir la temperatura de la cámara del autoclave;
- sacar la composición termogelificable esterilizada de la cámara del autoclave.
- [0216]** Según una variante la temperatura de la cámara se mantiene a una temperatura superior a 60 °C,

preferentemente superior a 100 °C, preferentemente superior a 120 °C.

- 5 [0217] Según una variante, la temperatura de esterilización va de 120 a 140 °C. Ventajosamente, el tiempo de esterilización es de al menos 3 minutos, preferentemente de al menos 10 minutos, preferentemente de al menos 15 minutos y más preferentemente de al menos 20 minutos.
- [0218] El tiempo de esterilización depende en general del volumen de muestra tratado.
- 10 [0219] De modo indicativo, según una variante, el tiempo de esterilización es de 15 o 20 minutos.
- [0220] Más específicamente, en general se postula que la esterilización se efectúe durante un mantenimiento a una temperatura de 121 °C a 138 °C durante un tiempo de 3 a 30 minutos, de acuerdo con la norma ISO17665.
- 15 [0221] Según una variante, la temperatura de esterilización se mantiene a una temperatura de 121 a 138 °C durante aproximadamente 20 minutos.
- [0222] La sobrepresión en la cámara del autoclave es igual a la presión del vapor en la cámara cerrada. En general es superior o igual a 2 bares durante el tiempo de esterilización. Más exactamente todavía, se postula que la esterilización se realice en autoclave a una presión de 100 kPa superior a la atmosférica durante un tiempo de 15 minutos o equivalente (valor F0).
- 20 [0223] Más específicamente, la esterilización al vapor tiene como objeto eliminar todos los gérmenes y/o los contaminantes.
- 25 [0224] Ventajosamente, la etapa de enfriamiento comprende el enfriamiento hasta la temperatura ambiente (20-25 °C). Ventajosamente, esta etapa comprende igualmente la disminución de la presión hasta la presión atmosférica.
- 30 [0225] Según una variante, el procedimiento de esterilización comprende uno o varios ciclos de esterilización al vapor.
- [0226] Se puede usar cualquier tipo de autoclave conveniente para la esterilización de productos destinados a su aplicación o inyección en el cuerpo humano o animal. Estos autoclaves son conocidos para el experto en la materia.
- 35 [0227] Según una variante, el autoclave usado es un autoclave para la esterilización de productos biológicos y/o terapéuticos.
- [0228] Ventajosamente, la composición de la invención se esteriliza en un recipiente, y más en particular en un dispositivo que permite su inyección en el cuerpo humano o animal.
- 40 [0229] Ventajosamente, para llenar un dispositivo que permita una inyección, y más específicamente una jeringa, se puede aplicar una contrapresión en el extremo opuesto del orificio de llenado para garantizar el mantenimiento del gel en el dispositivo, sin desbordamiento.
- 45 [0230] Según una variante, se coloca una jeringa que comprende la composición de la invención en la cámara de un autoclave para su esterilización.
- [0231] Se obtiene así una jeringa esterilizada precargada que contiene la composición de la invención esterilizada.
- 50 [0232] La presente invención se refiere especialmente a composiciones termogelificables que no son esterilizables por filtrado, especialmente porque la esterilización por filtrado no está adaptada a su viscosidad (en filtro de 0,22 µm).
- 55 [0233] Según una variante, las composiciones termogelificables de la invención presentan una viscosidad superior a 200 mPa.s.
- [0234] La invención cubre además una composición de la invención liofilizada. La liofilización puede tener

lugar antes y/o después de la esterilización.

[0235] La invención cubre además una composición de la invención en una forma seca, especialmente en una forma liofilizada.

5

[0236] En particular se puede (re)dispersar esta composición liofilizada antes de su uso.

[0237] La presente invención cubre igualmente una composición termogelificable esterilizada para su uso en un procedimiento de tratamiento terapéutico que comprende la inyección de dicha composición.

10

[0238] La presente invención cubre igualmente el uso de una composición según la invención para la preparación de una composición farmacéutica, en particular para un tratamiento terapéutico, por ejemplo tal como se define más específicamente por la invención.

15

[0239] La presente invención cubre igualmente un procedimiento de estética, en otros términos no terapéutico, que comprende el uso o la inyección de una composición según la invención. Se trata por ejemplo del relleno de arrugas o del relleno de una o varias zonas de tejido visible dañadas, por ejemplo a consecuencia de un accidente o de una intervención quirúrgica, con fines estéticos.

20

[0240] Un tejido es un conjunto de células semejantes y del mismo origen, agrupadas en conjunto funcional, es decir, que participan en una misma función. Entre los tejidos se puede citar: el tejido epitelial, el tejido conjuntivo, el tejido muscular y el tejido nervioso.

[0241] Por «composición según la invención» o términos equivalentes se entiende una composición definida tal como se indica en la presente invención, lo que comprende según una cualquiera de las variantes, realizaciones particulares o específicas, independientemente o según una cualquiera de sus combinaciones, lo que comprende según las características preferidas.

25

[0242] En las figuras:

30

La figura 1 representa un espectro de resonancia magnética nuclear del protón de un quitosano succinamida de la invención.

[0243] A partir de la lectura de la descripción explicativa que hace referencia a ejemplos que se proporcionan exclusivamente a título ilustrativo y que no limitarían en ningún modo el alcance de la invención, el experto en la materia deducirá claramente otros objetos, características y ventajas de la invención.

35

[0244] Los ejemplos forman parte integral de la presente invención y cualquier característica que parezca novedosa con respecto a un estado de la técnica anterior cualquiera a partir de la descripción tomada en su conjunto, incluidos los ejemplos, forma parte integral de la invención en su función y en su generalidad.

40

[0245] Así, todos los ejemplos tienen un alcance general.

[0246] Por otra parte, en los ejemplos, todos los porcentajes se expresan en masa, salvo que se indique lo contrario, y la temperatura se expresa en grados Celsius salvo que se indique lo contrario, y la presión es la presión atmosférica, salvo que se indique lo contrario.

45

Ejemplos

[0247] Los quitosanos precursores de los quitosanos sustituidos según la invención presentan masas moleculares medias en viscosidad (Mv, determinadas por viscosimetría capilar) y grados de acetilación (GA, proporción de unidad N-acetil-glucosamina, determinada por valoración potenciométrica) comprendidos en los intervalos de la tabla 1. La masa molecular de un quitosano puede definirse igualmente por medio de la viscosidad dinámica de una solución de concentración al 1 % (m/m) en quitosano en el ácido acético de concentración al 1 % (v/v), medida por viscosimetría móvil rotatoria, por ejemplo con un viscosímetro Brookfield, tal como se describe anteriormente.

50

55

Tabla 1. Características de los quitosanos precursores de los quitosanos sustituidos

Intervalo de masa molecular del quitosano	Intervalo de Mv	Intervalo de viscosidad al 1 % (mPa.s)	Intervalo de GA (% en moles)
ultrabajo	Aproximadamente 20000-60000	5-20	5-20 %
bajo	Aproximadamente 60000-120000	20-50	15-25 %
medio	Aproximadamente 120000-150000	50-80	20-30 %
alto	Aproximadamente 150000-220000	80-120	25-40 %

Ejemplo 1 - Preparación de un quitosano sustituido (quitosano succinamida, CSS)

5 [0248] Para obtener el quitosano succinamida de referencia CSS5 de la tabla 2, se disuelven 10 g de quitosano de masa molecular y de GA conocidos en 266 ml de una solución acuosa de ácido acético al 1 % (v/v). La solución se mantiene a una temperatura de 30 °C. Se añaden 6,75 g de anhídrido succínico (AS), lo que corresponde a una razón másica de anhídrido succínico en el quitosano (AS/quitosano) de 0/675, y a una razón molar de anhídrido succínico en los grupos NH₂ del quitosano (AS/NH₂) de 1/7. Después de 15 minutos, el pH del medio de reacción puede ajustarse en su caso a 7,5 por adición de sosa al 30 %. A continuación se precipita la solución en 2,5 litros de etanol. Se recupera el precipitado, y se solubiliza de nuevo en agua. El quitosano sustituido se somete a estas etapas de precipitación en etanol y después a solubilización en agua 3 veces. En la última precipitación, se recupera el precipitado, se prensa y se seca en un horno a 60 °C a presión atmosférica. Una vez seco el quitosano succinamida, se pulveriza para obtener un polvo. El grado de sustitución del quitosano se determina por RMN del protón según el procedimiento descrito anteriormente. En la Figura 1 se ilustra un espectro de RMN.

[0249] Los lotes de quitosano succinamida usados en los ejemplos se han preparado de la misma manera, con los parámetros de la tabla 2.

20

Tabla 2. Parámetros y características de los lotes de quitosano succinamida

N° CSS	Intervalo de Mv	Razón másica AS/quitosano	Razón molar AS/NH ₂	GS (% en moles)	Intervalo de pH para insolubilidad en agua
CSS1	medio	0,119	0,3	12	5,4-6,7
CSS2	medio	0,159	0,4	18	6,3-7,3
CSS3	medio	0,199	0,5	25	6,1-7,0
CSS4	medio	0,262	0,6	42	
CSS5	medio	0,675	1,7	52	< 5,5
CSS6	medio	0,178	0,45	21	5,8-6,9
CSS7	alto	0,19	0,5	17	
CSS8	alto	0,258	0,6	27	4,2-7,0
CSS9	alto	0,68	1,7	58	< 5,2
CSS10	medio	0,133	0,3	/	6,4-6,9
CSS11	medio	0,133	0,3	/	5,9-7,1
CSS12	medio	0,133	0,3	/	6,6-7,1
CSS13	medio	0,133	0,3	/	6,5-7,2
CSS14	medio	0,133	0,23	/	6,1-7,6
CSS15	medio	0,133	0,23	/	4,8-6,3
CSS16	medio	0,178	0,4	15	5,8-6,9
CSS17	medio	0,222	0,5	/	
CSS18	medio	0,172	0,4	/	5,5-7
CSS19	alto	0,2	0,5	/	5,2-6,3

[0250] Nota: Añadir beta-glicerol fosfato de sodio (65 %, Salfic-Alcan, abreviado como GP) permite solubilizar el CSS más allá del límite de solubilidad en agua. El CSS presenta un carácter de ion bipolar. Esto no supone ningún problema ya que se puede añadir una baja concentración de GP para obtener el carácter soluble del CSS.

Ejemplo 2 - Preparación de un quitosano sustituido (quitosano trimetilado, TMC)

[0251] Se prepara una suspensión de 50 g de quitosano en un volumen de 800 ml de agua. Se calienta la suspensión a 95 °C. Se añade un volumen de 26,27 ml del reactivo cloruro de 3-cloro-2-hidroxi-propiltrimetilamonio

30

(abreviatura CHTAC) gota a gota al medio, con una razón másica y molar CHTAC/quitosano de 0,31 y 0,5, respectivamente. Después de 4 horas de reacción, se diluye el medio de reacción con 400 ml de agua, y después se precipita en 8,4 litros de etanol. Se recupera el precipitado y se vuelve a solubilizar en agua. Se somete el quitosano sustituido 3 veces a esta etapa de solubilización/precipitación en etanol. En la última precipitación, se recupera el precipitado, se prensa y se seca en un horno a 60 °C a presión atmosférica. Una vez seco el quitosano trimetilado, se pulveriza para obtener un polvo.

[0252] Los lotes de quitosano trimetilado usados en los ejemplos se han preparado de la misma manera, con los parámetros de la tabla 3.

10

Tabla 3. Parámetros y características de los lotes de quitosano trimetilado

N° TMC	Intervalo de Mv del quitosano	Razón másica CHTAC/quitosano	Razón molar CHTAC/NH ₂	GS (% en moles)
TMC1	medio	0,37	0,5	16
TMC2	medio	0,79	1,05	17
TMC3	medio	0,37	0,5	22
TMC4	medio	0,37	0,5	26
TMC5	medio	0,37	0,5	28
TMC6	medio	0,61	0,8	36
TMC7	medio	1,21	1,5	75

[0253] Nota: Todos estos quitosanos trimetilados son perfectamente solubles en agua en el intervalo de GS del 16 al 75 %.

15

Ejemplo 3 - Ejemplo de preparación de una composición termogelificable

[0254] Se solubiliza en agua un quitosano succinamida (CSS2) obtenido según el ejemplo 1 en las proporciones siguientes: 0,195 g de quitosano succinamida CSS2 en 14,809 g de agua que contiene el 0,5 % (m/m) de manitol. Se prepara una solución de beta-glicerol fosfato de sodio (65 %, Salfic-Alcan, abreviado como GP) al 39,7 % (m/m). Con agitación magnética o mecánica, se añaden 1,49 ml de la solución de GP a la solución de quitosano succinamida. Se añaden 0,325 ml de tampón de acetato 0,5 M (pH 3) a la solución de quitosano succinamida/GP hasta obtener un pH dado, por ejemplo 7,5 en el caso de la solución N° 2 de la tabla 4. Se mide la osmolalidad de la solución final.

25

Ejemplo 4 - Capacidad de gelificar soluciones de quitosano succinamida a una concentración final del 1,14 % (m/m)

[0255] Las soluciones de la tabla 4 se preparan según el procedimiento descrito en el ejemplo 3.

30

Tabla 4. Soluciones a base de CSS de Mv «media» y «alta» a una concentración del 1,14 % (m/m), de GP a una concentración del 4,11 % (m/m) y de manitol a una concentración del 0,5 % (m/m); el pH se ajusta a 7,5

Intervalo de Mv	N° solución	N° CSS	Razón másica AS/quitosano	Razón molar AS/NH ₂	GS (% en moles)	Facilidad de inyección	Transición sol-gel a 37 °C
medio	1	CSS1	0,12	0,3	12	Sí	No
	2	CSS2	0,16	0,4	18	Sí	Sí
	3	CSS3	0,20	0,5		Sí	Sí
	4	CSS4	0,26	0,6	42	Sí	No
	5	CSS5	0,68	1,7	52	Sí	No
alto	6	CSS6	0,18	0,4		Sí	Sí
	7	CSS7	0,19	0,5		Sí	Sí
	8	CSS8	0,26	0,6		Sí	No
	9	CSS9	0,68	1,7		Sí	No

[0256] La capacidad de gelificación de la solución termogelificable depende en particular del grado de sustitución. El grado de sustitución está relacionado directamente con la razón molar entre las funciones amina presentes en el quitosano y la cantidad de anhídrido succínico usada durante la reacción de sustitución. Si el grado de sustitución es demasiado elevado, la gelificación no tiene lugar (caso de la solución n.º 5). La gelificación no tiene

35

lugar si el grado de sustitución es demasiado bajo (caso de la solución n.º 1).

[0257] La tabla 4 muestra que para el quitosano succinamida, la razón másica AS/quitosano óptima que conduce al carácter termogelificable se encuentra entre 0,12 y 0,26, lo que se traduce en un intervalo de GS del 10 al 45 %.

[0258] Además, las soluciones termogelificables de la tabla 5 se preparan a partir de lotes diferentes de quitosano succinamida, para mostrar la reproductibilidad de la preparación de los hidrogeles con una razón másica de 0,13, que permite obtener un GS entre el 14 y el 18 % en moles. Puede apreciarse que la osmolalidad de la solución final se encuentra entre 363 y 447 mosm/kg, y que todas las soluciones son fáciles de inyectar y termogelificables. La presencia de manitol (que es opcional para el efecto termogelificante) aumenta la osmolalidad.

Tabla 5. Soluciones a base de quitosano succinamida de Mv «media» a una concentración del 1,14 %, GP a una concentración del 4,11 % y manitol a una concentración del 0,5 %

Intervalo de Mv	N.º solución	N.º CSS	Osmolalidad (mosm/kg)	Facilidad de inyección	Gel a 37 °C
medio	10	CSS10	363	Sí	OK
	11	CSS11	382	Sí	OK
	12	CSS12	447	Sí	OK
	13	CSS13	405	Sí	OK
	14	CSS14		Sí	OK
	15	CSS15		Sí	OK

15

Ejemplo 5 - Capacidad del quitosano sustituido TMC de gelificarse a una concentración final del 0,9 % (m/m)

[0259] En el caso del quitosano trimetilado de masa molecular «media», el grado de sustitución óptimo para la formulación de gel termogelificante, por ejemplo a una concentración baja del 0,9 % (m/m), se encuentra entre el 10 y el 36 % (Tabla 6).

Tabla 6. Soluciones a base de TMC a una concentración del 0,9 % (m/m) y de GP a una concentración del 3,0 % (m/m) (sin manitol); el pH se ajusta a 7,5

N.º solución TMC	N.º TMC	GA (% en moles)	GS (% en moles)	Gel a 37 °C
1	TMC1	16	16	Sí
2	TMC2	16	17	Sí
3	TMC3	15	22	Sí
4	TMC4	18	26	Sí
5	TMC5	18	28	Sí
6	TMC6	17	36	No
7	TMC7	19	75	No

25 **Ejemplo 6 -** Capacidad de las soluciones de quitosano succinamida para gelificar a baja concentración, a valores de osmolalidad y pH fisiológicos

[0260] Se compara la solubilidad, el carácter inyectable y termogelificable de las soluciones a base de quitosano no sustituido (CS) con los de las soluciones a base de quitosano sustituido (quitosano succinamida CSS), preparadas según el procedimiento del ejemplo 2 (Tabla 7).

Tabla 7. Soluciones a base de quitosano (CS) o de quitosano succinamida (CSS)

CS o CSS	Intervalo de Mv	CS o CSS (% m/m)	GP (% m/m)	pH final (ajustado)	Facilidad de inyección	Gel a 37 °C
CS	alto	1,5 %	6 %	6,8-7,0	Sí	No
CS	alto	1,5 %	6 %	6,7-7,0	Sí	No
CS	alto	2 %	6 %	6,7-7,0	Sí	Sí
CS	alto	2 %	4,1 %	6,7-7,0	Sí	No
CS	medio	2 %	4,1 %	7,4	No (precipitado)	No
CS	bajo	2 %	4,1 %	7,4	No (precipitado)	No
CS	medio	1,5 %	4,1 %	7,4	No (precipitado)	No
CS	bajo	1,5 %	4,1 %	7,4	No (precipitado)	No

CSS	medio	1,5 %	4,1 %	7,4	Sí	Sí
-----	-------	-------	-------	-----	----	----

[0261] Con el quitosano no sustituido de la técnica anterior, se no llegan a respetar las especificaciones de osmolalidad, pH, solubilidad en agua, inyectabilidad y gelificación a 37 °C simultáneamente.

5 **[0262]** Con el quitosano sustituido por un grupo succinilo, se puede obtener la solubilidad, la inyectabilidad y el carácter sol-gel incluso a concentración más baja en GP (para una concentración de polímero igual), gracias al hecho de que el polímero de inicio es un quitosano sustituido soluble en agua, siendo la concentración en GP modulable para obtener el carácter gelificable, la osmolalidad y el pH deseados.

10 **Ejemplo 7** - Capacidad de las soluciones de quitosano succinamida de concentración final 0,88 % para gelificar en un intervalo de pH amplio

[0263] En este ejemplo, el pH de las soluciones se ha ajustado por adición de ácido acético concentrado (96 % m/v) con el fin de minimizar la dilución del hidrogel. Todas las soluciones son solubles y fáciles de inyectar.

15

Tabla 8. Solución a base de CSS a una concentración del 0,88 % (m/m) y de GP a una concentración del 4,16 %

Intervalo de Mv	N.º CSS	pH	Gel a 37 °C
medio	CSS 10	6,8	No
		7,0	No
		7,2	Sí
		7,5	Sí
		7,6	Sí
		8,0	Sí

[0264] Para una masa molecular y un grado de sustitución dados, es posible obtener el carácter gelificante en un intervalo de pH amplio, por ejemplo de 7,2 a 8,0, por ejemplo al comienzo de un CSS de masa molecular «media» y de una razón másica de 0,133.

20

Ejemplo 8 - Capacidad para disminuir la concentración en quitosano sustituido (CSS) conservando la capacidad de gelificar de la solución

25 **[0265]**

Tabla 9. Soluciones a base de CSS de baja concentración

Intervalo Mv	N.º CSS	CSS (% m/m)	pH	Intervalo de concentración en GP (% m/m)	Intervalo de osmolalidad	Gel a 37 °C
alto	CSS7	0,75 %	7,0	3,5-4,1	310-376	No
			7,5	3,4-4,2	300-375	Sí
		0,88 %	7,0	3,4-4,4	300-373	No
			7,5	3,4-4,4	300-380	Sí
		1,34 %	7,0	3-3,7	300-380	Sí
			7,5	3-3,7	300-380	Sí
medio	CSS17	0,88 %	7,0	3,4-3,8	300-375	No
			7,5	3,4-4,5	300-400	No
		1,35 %	7,0	2,4-2,7	300-360	No
			7,5	2,4-2,7	300-340	Sí
		1,35 %	7,0	2,4-2,7	300-360	No
			7,5	2,4-2,7	300-340	Sí

[0266] A veces resulta ventajoso formar soluciones de concentraciones finales bajas en quitosano sustituido en ciertas aplicaciones, por ejemplo por debajo del 1 %, por ejemplo el 0,85 %, conservando la capacidad de producir un gel a temperatura fisiológica, por ejemplo 7,5.

30

Ejemplo 9 - Inyectabilidad de los productos comerciales y de las soluciones de quitosano sustituido y GP a temperatura ambiente

35

[0267] Este ejemplo está dirigido a verificar que el producto puede inyectarse fácilmente a través de una jeringa equipada con una aguja de diámetro pequeño, como la usada para las inyecciones por ejemplo por vía intradérmica o intraarticular. En particular, es importante poder inyectar fácilmente en pequeñas articulaciones como

las de la mano.

[0268] Se evalúa la fuerza necesaria para inyectar las soluciones a temperatura ambiente en el curso de la inyección de la solución mediante una aguja de calibre 22, según el protocolo descrito en el texto. Se mide la fuerza necesaria para la inyección tras un desplazamiento del émbolo de la jeringa de aproximadamente 15 mm, lo que permite comparar fácilmente los diferentes productos entre sí. Se han sometido a ensayo tres soluciones de ácido hialurónico destinadas a la inyección intraarticular disponibles comercialmente, y se han comparado con soluciones de quitosano succinamida de masa molecular «media» y de concentración variable.

10 **Tabla 10.** Fuerza necesaria para la inyección tras un desplazamiento del émbolo de aproximadamente 15 mm para una aguja de calibre 22

Producto	Fuerza (N)
Agua pura	0,5
Solución comercial «A» (ácido hialurónico)	2 N
Solución comercial «C» (ácido hialurónico)	6-8 N
Solución a base de CSS18 a una concentración del 1,0 % a pH 7,5	3 N
Solución a base de CSS19 a una concentración del 1,5 % a pH 7,5	3 N

[0269] Se observa que las soluciones de quitosano succinamida son tan fáciles de inyectar a través de una aguja de calibre 22 como una solución comercial de ácido hialurónico (A) y más fáciles de inyectar que una solución comercial de ácido hialurónico (C).

Ejemplo 10 - Propiedades reológicas de los productos comerciales a base de ácido hialurónico y de las soluciones termogelificables a base de quitosano succinamida

20 **[0270]** Se miden los módulos G' y G'' de productos comerciales a base de ácido hialurónico a una temperatura comprendida entre 4 °C y 37 °C, en función del tiempo, con ayuda de un reómetro ARES, según el procedimiento descrito anteriormente. Después se determina el valor de los módulos G' y G'' a 60 minutos (Tabla 11).

25 **Tabla 11.** Módulos G' y G'' a 60 minutos

Producto	Sol o gel a 4 °C	G' a 37 °C (Pa)	G'' a 37 °C (Pa)	Sol o gel a 37 °C (G' versus G'')
Solución comercial (ácido hialurónico) «A»	Sol	0,1	1	Sol ($G' < G''$)
Solución comercial (ácido hialurónico) «B»	Gel	40	38	Gel ($G' > G''$)
Solución comercial (ácido hialurónico) «D»	Gel	640	120	Gel ($G' > G''$)
Solución a base de CSS16 a una concentración de 1,2 % a pH 7,5 (solución del ejemplo 12)	Sol	16	1	Gel ($G' > G''$)

30 **[0271]** Para las composiciones de la invención, por ejemplo para la composición a base de quitosano succinamida y de GP a pH = 7,5, el módulo G' cruza el módulo G'' al cabo de unos segundos, y G' es superior a G'' más allá del tiempo al que se produce el cruzamiento, lo que caracteriza una transición sol-gel rápida cuando el producto pasa de 4 °C a 37 °C.

[0272] Las composiciones comerciales a base de ácido hialurónico sometidas a ensayo no son termogelificables.

35 **Ejemplo 11 - Efecto de la inyección intraarticular de una solución de quitosano succinamida en el conejo después de transección del ligamento anterior**

40 **[0273]** La solución de este ejemplo es una solución esterilizada que comprende el 1,2 % (m/m) de quitosano succinamida de grado de sustitución del 15 % y de masa molecular «media» (n.º CSS16 de la tabla 2), el 3,5 % (m/m) de GP, el 0,4 % (m/m) de D-manitol y 11 mmol/l de acetato de sodio trihidratado. Se esteriliza la solución al vapor por autoclave, se ajusta la concentración por dilución de un factor de 1,33, y después se acondiciona la solución en una jeringa. Después de la esterilización y la dilución, el pH es igual a 7,5, la osmolalidad es igual a 380 mosm/kg y la viscosidad dinámica aparente es igual a 126 mPa.s a 9 °C.

45 **[0274]** Una transección del ligamento anterior, denominada «transección del ligamento cruzado anterior

(TLCA)», en el conejo conlleva de manera consistente y bien documentada modificaciones sintomáticas de la osteoartritis (OA), es decir, fisuras del cartilago, lesiones y una inflamación de la membrana sinovial importantes sin pérdida de cartilago en toda la altura de la articulación. Este modelo se usa en particular para estudiar los efectos de las nuevas terapias como los viscosuplementos inyectados por vía intraarticular en la estructura del cartilago, pudiendo tener las lesiones de partida un origen y una naturaleza muy variables (en Laverty *et al.* Osteoarthr Cartil, 2010; Edouard *et al.* Phys Ther Sport, 2013; Mainil-Varlet *et al.* Cartilage, 2013; Oprenyeshk *et al.* Osteoarthr Cartil, 2013).

[0275] En este modelo, aparece una erosión del cartilago desde las 4 semanas después de la intervención quirúrgica que consiste en efectuar una transección del ligamento anterior de la rodilla derecha. Se recomienda realizar el estudio hasta 8 semanas después de la intervención, lo que permite obtener una erosión del cartilago en al menos el 40 % de los cóndilos femorales. La inyección intraarticular del producto para ensayo se realiza antes de la aparición de los primeros signos de osteoartritis, es decir, 1 semana después de la intervención quirúrgica en la rodilla que se ha sometido a la transección. La rodilla derecha de los 10 animales del grupo de prueba ha recibido una inyección de 600 µl de la solución termogelificable para ensayo. La rodilla derecha de los 9 animales del grupo de «control» ha recibido una inyección de 600 µl de solución salina al 0,9%. Los productos se inyectan en la articulación de la rodilla de los conejos mediante una jeringa provista de una aguja de calibre 22.

[0276] Se caracteriza la capacidad del producto para ralentizar o detener la progresión de la osteoartritis inducida por la intervención quirúrgica mediante el estudio de varios indicadores macroscópicos, histológicos y radiológicos, caracterizados de acuerdo con las puntuaciones recomendadas por la OARSI (en Laverty *et al.* Osteoarthr Cartil 2010). Los resultados de la radiología de las articulaciones se evalúan según la escala de Kellgren y Lawrence, con base en la presencia de osteófitos y del espacio interarticular.

[0277] El estudio se realiza en doble ciego, es decir, ni el cirujano que procede a la intervención y a la inyección de los productos para ensayo, ni las personas que realizan las observaciones macroscópicas a lo largo de la vida de los animales y en el momento de su eutanasia, ni las personas que analizan los resultados macroscópicos o histológicos y establecen los cálculos estadísticos conocen la correspondencia entre los números de los animales y los grupos por producto sometido a ensayo. Esta correspondencia solo se comunica una vez que los cálculos han sido terminados y redactados por una persona independiente. Los resultados se refieren en las tablas 11 a 13.

[0278] Con respecto a la inyección de una solución salina, la inyección de la solución termogelificable HG permite disminuir de manera estadísticamente significativa todos los indicadores de osteoartritis a las 8 semanas, tal como muestra una disminución del espacio interarticular y la presencia de osteófitos visibles en la exploración radiológica (Tabla 12, según la escala de Kellgren y Lawrence), la disminución de la gravedad y el tamaño de las lesiones del cartilago que aparecen en el lado lateral de las articulaciones (Tabla 13), y la disminución de los infiltrados inflamatorios de la membrana sinovial (Tabla 14). No se detecta ningún efecto secundario no deseable de la solución termogelificable con respecto al grupo de control, lo que traduce la buena tolerancia del producto en las condiciones del estudio.

Tabla 12. Puntuación radiológica según la escala de Kellgren y Lawrence (de 0 a 4) que evalúa el espacio interarticular y la presencia de osteófitos (valor p calculado por el procedimiento no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney)

Puntuación radiológica según K&L (0-4)	Solución salina	Solución termogelificable
Número de animales	9	10
N.º observación	9	10
Puntuación media	2,0	0,0
Puntuación mediana	1,8	0,4
Puntuación mínima	0,0	0,0
Puntuación máxima	3,0	3,0
Desviación media	0,7	0,6
Diferencia entre los 2 grupos y valor p (probabilidad)	-	Estadísticamente significativa Valor p = 0,0079

45

Tabla 13. Puntuación macroscópica global que evalúa el tamaño y la gravedad de las lesiones de los compartimentos laterales del cartílago de las placas tibiales y los cóndilos femorales (valor p calculado por el procedimiento no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney)

Puntuación macroscópica global (tamaño y gravedad de las lesiones)	Solución salina	Solución termogelificable
Número de animales	9	10
N.º observación	18	20
Puntuación media	32,0	17,5
Puntuación mediana	32,8	21,4
Puntuación mínima	3,0	3,0
Puntuación máxima	68,0	44,0
Desviación media	13,4	10,2
Diferencia entre los 2 grupos y valor p (probabilidad)	-	Estadísticamente significativa Valor p < 0,0041

5 **Tabla 14.** Puntuación del infiltrado inflamatorio de la membrana sinovial evaluado por histología (valor p calculado por el procedimiento no paramétrico de la prueba U de Mann-Whitney)

Puntuación del infiltrado inflamatorio (0-5)	Solución salina	Solución termogelificable
Número de animales	9	10
N.º observación	27	28
Puntuación media	2,0	1,4
Puntuación mediana	2,6	1,8
Puntuación mínima	1	0,5
Puntuación máxima	5	5,0
Desviación media	1,0	1,0
Diferencia entre los 2 grupos y valor p (probabilidad)		Estadísticamente significativa Valor p = 0,0011

Ejemplos 12-24

10 **[0279]** En los ejemplos 12 a 24, se han usado los procedimientos y los protocolos siguientes:

Propiedades reológicas

[0280] Las propiedades reológicas se miden con ayuda de un reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument; véase por ejemplo: <http://www.tainstruments.com>), equipado con una placa Peltier (Peltier Plate) y una trampa de disolventes. La geometría usada es la placa Peltier de acero de 25 mm de diámetro, y la distancia entre la placa y el Peltier se fija en 0,7 mm. Las medidas se realizan a 37 °C, salvo para la experiencia de barrido en la temperatura descrita en el ejemplo 12. Las medidas se realizan según los protocolos siguientes:

20 - Identificación de la región lineal viscoelástica por barrido en deformación

[0281] Primero se realiza una prueba de barrido en deformación para identificar la región lineal viscoelástica (LVER) de cada producto, a 37 °C.

25 - Barrido en frecuencia en modo oscilatorio débil

[0282] Se realiza un barrido en frecuencia entre 0,01 rad/s y 100 rad/s en la región «LVER» de cada producto, a una deformación del 0,9 %, con el modo oscilatorio de baja amplitud («small amplitude oscillatory shear», SAOS) a 37 °C. Se miden las características siguientes en función de la frecuencia de barrido: módulo de elasticidad (G'), módulo de pérdida (G''), frecuencia de cruzamiento de los módulos G' y G'' («frecuencia de crossover») y viscosidad compleja (η^*). En particular, se determina el valor del módulo de elasticidad G' a la frecuencia de 0,6 Hz, que corresponde a la frecuencia aplicada al líquido sinovial de la rodilla durante la marcha.

- Barrido en flujo

35

[0283] Se determina la viscosidad en reposo mediante el modo de barrido en flujo. Se equilibra el producto durante 1 minuto a 37 °C. Se aplica una tasa de cizalla de 0,001 s⁻¹ a 10 s⁻¹ para medir la viscosidad en función de

la tasa de cizalla. A partir de la curva obtenida en este intervalo de tasa de cizalla, se determina la viscosidad en reposo extrapolando el valor de la viscosidad a cizalla nula. En el caso en que el coeficiente de correlación sea inferior a 0,98, se refiere la viscosidad a la tasa de cizalla más baja (0,001 s⁻¹).

5 - Grado de sustitución (medida RMN)

[0284] El grado de sustitución se determina en los ejemplos que se muestran a continuación por espectrometría de resonancia magnética (RMN) del protón en solución en medio acuoso, con ayuda de un espectrómetro de resonancia magnética, por ejemplo un espectrómetro Bruker de frecuencia 400 MHz. Las muestras se preparan de la manera siguiente: se disuelven 5 a 6 mg de quitosano sustituido en 1 ml de agua deuterada. Se añaden 2 µl de ácido clorhídrico deuterado o de borato de sodio a la solución de quitosano sustituido con el fin de alcanzar una zona de pH apropiada para el análisis. La zona de pH apropiada depende de la naturaleza del sustituyente y puede ser de 8,5 por ejemplo con borato de sodio y entre 3 y 4 con HCl 12 M. Se registra el espectro a una temperatura de 70 °C, con un número de barridos comprendido entre 64 y 256 y un tiempo de relajación comprendido entre 1 y 8 segundos. Se trata el espectro obtenido por desconvolución con el fin de determinar el valor de la integral de las áreas de las señales de interés para poder calcular el grado de sustitución del quitosano sustituido.

[0285] Los quitosanos sustituidos que se han usado en los ejemplos 12 a 24 se han preparado y caracterizado según los procedimientos descritos anteriormente (tabla 15). La masa molecular del quitosano se define por la viscosidad de una solución de concentración en quitosano del 1% (m/m) en ácido acético de concentración al 1% (v/v).

Tabla 15 - Características de los quitosanos sustituidos y de los quitosanos precursores de estos quitosanos sustituidos

Quitosanos sustituidos		Quitosanos precursores		
Referencia	GS (% en moles)	Referencia	Intervalo Pm	Viscosidad al 1% (mPa.s)
Quitosano succinamida				
CSS20	29**	CS1	Medio	40
CSS21	18*	CS2		60
CSS22	19**	CS3		63
CSS23	19**			72
CSS24	20**	CS4		78
CSS25	20*	CS5		
CSS26	20*			
CSS27	25*			
CSS28	30*			
CSS29	20**			
CSS30	28**	CS4	72	
Trimetil-quitosano				
TMC8	26**	CS2	Medio	60

*Grado de sustitución estimado a partir del objeto durante la reacción de sustitución; **grado de sustitución medido por RMN del protón según el procedimiento descrito anteriormente.

[0286] En los ejemplos que se muestran a continuación, las formulaciones de quitosano sustituido se preparan según el protocolo siguiente:

- Solubilizar el polvo de quitosano sustituido a la concentración buscada que contiene la concentración deseada de sorbitol o de manitol;
- Añadir una solución madre de tampón de fosfato (100 mM) con el fin de obtener una osmolalidad comprendida entre 280 y 400 mosm/kg;
- Añadir ácido acético glacial, hasta obtener un pH entre 7,2 y 8,5.

[0287] Todos los ejemplos siguientes se refieren a formulaciones esterilizadas por autoclave, salvo cuando se indica «antes de autoclave», según el protocolo siguiente:

- Poner la solución en un recipiente apropiado y esterilizar por autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

[0288] La tabla 16 contiene la lista de las formulaciones a base de quitosano sustituido descritas en los ejemplos 12 a 22.

5

Tabla 16 - Formulaciones a base de quitosano sustituido

Formulación (referencia)	Quitosano sustituido		Ácido hialurónico		GP	Azúcar	
	Ref.	Concentración (% m/m)	Ref.	Concentración (% m/m)		Manitol o sorbitol	Concentración (% m/m)
Quitosano succinamida							
17-008		2 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
16-27A	CSS29	1,75 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
16-27B		1,5 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
8-147D	CSS2	2 %	/	/	/	Manitol	0,5 %
17-032-1	CSS26	2 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
17-032-2		1,25 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
17-033C-1	CSS27	2 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
17-033C-2		1,25 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
17-033B-1	CSS28	2 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
17-033B-2		1,25 %	/	/	/	Sorbitol	0,5 %
8-145A	CSS25	2 %	/	/	/	Manitol	0,5 %
8-147B		2 %	/	/	/	Manitol	0,5 %
8-147C		2 %	/	/	/	Manitol	0,5 %
16-008A	CSS23	2 %			/	Sorbitol	0,5 %
16-008B		2 %	/	/	Sí	Sorbitol	0,5 %
14-084	CSS29	1 %	H34	1 %	/	/	/
14-49A1	CSS25	0,33 %	H34	1,67 %	/	/	/
14-49A3		0,5 %		1,5 %	/	/	/
14-49A2		0,67 %		1,33 %	/	/	/
14-49A4		1,0 %	1,0 %	/	/	/	
14-49A5		0,5 %	H22	1,5 %	/	/	/
14-49A6		1,0 %		1,0 %	/	/	/
013-009	CSS21	1 %	/	/	Sí	/	/
13-006E4		1,3 %	/	/	Sí	/	/
13-010		1,5 %	/	/	Sí	/	/

Ejemplo 12 - Carácter termogelificante de las formulaciones a base de quitosano succinamida

[0289] Se realiza un barrido en temperatura con el fin de seguir la evolución de los módulos de elasticidad (G') y de pérdida (G'') de diferentes formulaciones a base de quitosano succinamida en función de la temperatura (tabla 17), con ayuda del reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument) equipado con un Peltier y una geometría de tipo placas paralelas de acero de 25 mm, con una distancia de 0,7 mm. El aumento de temperatura está precedido por una precizalla para estandarizar las diferencias entre las muestras durante la colocación de la muestra en el reómetro. La deformación, la velocidad del aumento de la temperatura y la frecuencia se ajustan en función de cada muestra sometida a ensayo (tabla 17).

Tabla 17 - Módulo de elasticidad (G') y módulo de pérdida (G'') de formulaciones a base de quitosano succinamida a diferentes temperaturas

Referencia (formulación)	Precizalla (frecuencia, duración)	Deformación (%)	Frecuencia (rad/s)	Aumento de temperatura ($^{\circ}$ C/min)	G' ; G'' (Pa)				
					5 $^{\circ}$ C	10 $^{\circ}$ C	20 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C	37 $^{\circ}$ C
17-008	10 rad/s 30 s	250 %	2,5	5	G' =29 G'' =23	G' =34 G'' =32	G' =43 G'' =23	G' =47 G'' =25	G' =54 G'' =36
16-27A	25 rad/s 90 s	160 %	3	5	G' =9 G'' =7	G' =10 G'' =7	G' =14 G'' =6	G' =16 G'' =6	G' =23 G'' =7
16-27B	25 rad/s 90 s	160 %	3	5	G' =6 G'' =7	G' =8 G'' =7	G' =11 G'' =6	G' =13 G'' =5	5 G' =21 G'' =5
14-084	20 rad/s 120 s	25 %	0,1	1,5	G' =46 G'' =51	G' =51 G'' =50	G' =52 G'' =48	G' =52 G'' =47	G' =62 G'' =42

[0290] A partir de este ejemplo se comprende que para todas las formulaciones a base de quitosano succinamida sometidas a ensayo, el módulo de elasticidad G' se hace superior al módulo de elasticidad G'' a partir de una cierta temperatura, lo que muestra el carácter termogelificante de las formulaciones. La temperatura a la que G' aumenta a G'' varía en función de la composición de la formulación y de las características moleculares del quitosano succinamida.

Ejemplo 13 - Formulaciones de baja concentración en quitosano sustituido, con vistas a la inyección a través de agujas muy finas (29G y 30G)

10

[0291] Se miden los módulos de elasticidad (G') y de pérdida (G'') de las formulaciones a base de quitosanos sustituidos (succinamida y trimetilado) con ayuda de un reómetro ARES con una geometría Peltier de «cono-placa» a una distancia de 50 μm y un ángulo de 0,04 radianes, a una frecuencia de 10 Hz a 37 °C, con una deformación del 3 %, según el procedimiento descrito anteriormente (Tabla 18a). La viscosidad dinámica se mide con ayuda de un viscosímetro móvil rotatorio (Brookfield), tal como se describe anteriormente (tabla 18a). La fuerza necesaria para la inyección de las formulaciones a través de las agujas de calibre 29 y 30 se mide tal como se describe anteriormente (tabla 18b).

Tabla 18a - Propiedades reológicas y viscosidad

Formulación (referencia)	Tipo	Gel ($G' > G''$)	G' a 900 s (Pa)	Viscosidad dinámica (mPa.s)
13-009	CSS 1%	Gel después de 40 s	100	439
13-006E4	CSS 1,3 %	Gel	153	744
13-010	CSS 1,5 %	Gel	95	1621
13-008	TMC 1,1 %	Gel	70	241
13-006F4	TMC 1,3 %	Gel	137	418

20

Tabla 18b - Inyectabilidad (fuerza necesaria para la inyección) en newtons

Ref.	Tamaño de la aguja	
	29G	30G
	Pared fina	Pared normal
13-009	3,6 N	7,5 N
13-006E4	6 N	11 N
13-010	5,75 N	12,5 N
13-008	2,7 N	5,5 N
13-006F4	4,1 N	8,9 N

[0292] Se deduce que se obtienen formulaciones fáciles de inyectar a través de agujas muy finas, adaptadas por ejemplo a inyecciones subcutáneas, intradérmicas o incluso microinyecciones aplicadas en la epidermis especialmente para el rejuvenecimiento de la piel, o incluso inyecciones intracamerales para oftalmología, conservando las propiedades de gel con una buena elasticidad y viscosidad.

Ejemplo 14 - Propiedades reológicas de viscosuplementos comerciales

[0293] Se miden las propiedades reológicas de productos comerciales a base de ácido hialurónico de tipo no reticulado (VS1 y VS2) o reticulado por enlaces covalentes (VS3), destinados a la viscosuplementación, con ayuda del reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument) a 37 °C en modo oscilatorio, según los procedimientos descritos anteriormente. Se determina la frecuencia de cruzamiento («crossover») entre los módulos G' y G'' , el valor de G' a la frecuencia de 0,6 Hz que corresponde a la frecuencia de trabajo. Se determina la viscosidad en reposo en modo de barrido en flujo, según el procedimiento descrito anteriormente.

35

Tabla 19 - Propiedades reológicas de viscosuplementos comerciales

Referencia	Tipo de reticulación	Concentración HA	Frecuencia de crossover (Hz)	G' a 0,6 Hz (Pa)	Viscosidad en reposo (Pa.s)
VS1	Sin reticulación	2 %	5,2 Hz	114	212
VS2	Sin reticulación	1 %	Sin cruzamiento	0,05	7
VS3	Reticulación covalente	0,8 %	Sin cruzamiento	114	835

[0294] A partir de este ejemplo se comprende que el comportamiento reológico de los viscosuplementos a base de ácido hialurónico depende de su composición y de las características moleculares del ácido hialurónico, especialmente de la estructura reticulada por enlaces covalentes o no.

5 **Ejemplo 15 - Formulaciones de quitosano succinamida a diferentes concentraciones en glicerofosfato**

[0295] Se miden las propiedades reológicas de formulaciones a base de quitosano succinamida de masa molecular «media» (referencia CSS25) a la concentración del 2 % (m/m) y de glicerofosfato (GP) de concentración variable, con ayuda del reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente (tabla 20).

Tabla 20 - Propiedades reológicas de las formulaciones a base de quitosano succinamida al 2 % (m/m) en función de la concentración en GP

Formulación (referencia)	GP % (m/m)	G' > G'' a 0,6 Hz	Frecuencia de crossover	G' a 0,6 Hz (Pa)	Viscosidad en reposo (mPa.s)
8-145A	4 %	Sí	Sin cruzamiento	526	8160
8-147B	2 %			298	29000
8-147C	1 %			164	14460
8-147D	0 %			184	12034

15 [0296] A partir de este ejemplo se desprende que:

- Una solución de quitosano succinamida de grado de sustitución del 20 % y una masa molecular de tipo «medio» puede formar un gel sin adición de GP;
- Se puede aumentar la cohesión del gel añadiendo GP en concentración creciente;
- 20 - La capacidad de lubricación (viscosidad en reposo) alcanza un máximo cuando se aumenta la proporción en GP.

Ejemplo 16 - Formulaciones a base de quitosano succinamida de grado de sustitución y de concentración variables

25 [0297] Se preparan soluciones de quitosano succinamida de concentración variable tal como se describe anteriormente, al principio quitosano succinamida de grados de sustitución (GS) diferentes (referencia CSS26, CSS27, CSS28) y de igual masa molecular («media»), sin GP. Se miden las propiedades reológicas de las formulaciones con ayuda del reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente (tabla 21).

30

Tabla 21 - Propiedades reológicas de las formulaciones a base de quitosano succinamida en función del GS

Formulación (referencia)	Concentración (% m/m)	CSS (referencia)	GS* (% en moles)	G' > G'' a 0,6 Hz	G' a 0,6 Hz (Pa)	Viscosidad en reposo (mPa.s)	Frecuencia de crossover
17-032-1	2 %	CSS26	20 %	Sí	299	10500	Sin cruzamiento
17-032-2	1,25 %				58	3400	
17-033C-1	2 %	CSS27	25 %		52	2500	
17-033C-2	1,25 %				9	200	
17-033B-1	2 %	CSS28	30 %		30	1000	
17-033B-2	1,25 %				10	130	

*GS estimado tal como se describe anteriormente

[0298] Se desprende que:

35

- Se obtienen geles para todas las formulaciones preparadas al principio de CSS de GS del 20, el 25 y el 30 %;
- Se modula la cohesión y la viscosidad en reposo haciendo variar el GS y la concentración en CSS, para una misma masa molecular (media).

40 **Ejemplo 17 - Formulaciones a base de quitosano succinamida y de ácido hialurónico**

[0299] Se prepara una solución de quitosano succinamida (referencia CSS25) al 2 % (m/m) tal como se describe anteriormente. Se prepara una solución de ácido hialurónico (HA) al 2 % (m/m) solubilizando HA y manitol

en un tampón de fosfato, para obtener una osmolaridad entre 280 y 400 mosm/kg y un pH entre 7,2 y 8,5. Se usa un HA de alta masa molecular (referencia H34, viscosidad intrínseca de 3 m³/kg, tal como suministra el fabricante) o de baja masa molecular (referencia H22, viscosidad intrínseca de 1,55 m³/kg). A continuación se mezclan las soluciones en diferentes proporciones en masa. Se esterilizan por autoclave tal como se describe anteriormente. Se miden las propiedades reológicas de las formulaciones con ayuda del reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente (tabla 22).

Tabla 22 - Propiedades reológicas de las formulaciones a base de quitosano succinamida y de ácido hialurónico

Formulación (referencia)	HA (referencia)	Conc. en CSS (% m/m)	Conc. en HA (% m/m)	Frecuencia de crossover	G' a 0,6 Hz (Pa)	Viscosidad dinámica a 0,6 Hz (mPa.s)
8-147D	/	2,0 %	/	Sin cruzamiento	650	164
49-A1	H34	0,33 %	1,67 %	1,2 Hz	48	19
49-A3		0,5 %	1,5 %	1,2 Hz	36	14
49-A2		0,67 %	1,33 %	1,1 Hz	35	14
49-A4		1,0 %	1,0 %	Sin cruzamiento	47	15
49-A5	H22	0,5 %	1,5 %	13	7	5
49-A6		1,0 %	1,0 %	0,1	13	5

10 **[0300]** A partir de los resultados se comprende que las propiedades reológicas de los geles formados por la mezcla CSS y HA pueden modularse con la concentración, la proporción entre CSS y HA y la viscosidad intrínseca del HA. El HA de alta viscosidad permite obtener el gel que tiene los valores más elevados de G' y viscosidad dinámica a la frecuencia de trabajo (0,6 Hz). Además, en algunas condiciones, no hay cruzamiento de los módulos G' y G", lo que demuestra que se forma un gel con independencia de cuál sea la frecuencia de cizalla.

15

Ejemplo 18 - Sinergia con el líquido sinovial de la rodilla de pacientes con osteoartritis

20 **[0301]** Con su consentimiento, se extrae líquido sinovial (SF) de cuatro pacientes adultos voluntarios afectados de osteoartritis de la rodilla antes de la implantación de una prótesis (SF1 a SF4). Se mezcla con diferentes soluciones a base de quitosano succinamida o con diferentes viscosuplementos comerciales a una razón másica de 1/1, y después se miden las propiedades reológicas de las mezclas con ayuda del reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente (tabla 23).

Tabla 23 - Propiedades reológicas del líquido sinovial de la rodilla de cuatro pacientes afectados de osteoartritis, y formulaciones de quitosano succinamida o de viscosuplementos comerciales, antes y después de la mezcla con el líquido sinovial a un proporción en volumen de 50/50 (v/v).

Formulación (referencia)	Formulación en solitario				Formulación mezclada con líquido sinovial				
	G' a la frecuencia 0,6 Hz (Pa)	Viscosidad en reposo (Pa.s)	SF (referencia)	G' > G'' a frecuencia 0,6 Hz	G' a frecuencia 0,6 Hz (Pa)	Viscosidad en reposo (Pa.s)	SF (referencia)	Frecuencia de crossover (Hz)	
/	/	/	SF1	Sí	3	ND		0,04 Hz	
/	/	/	SF2	Sí	1	ND		0,3 Hz	
/	/	/	SF3	Sí	0,8	7		0,4 Hz	
/	/	/	SF4	Sí	1	1		0,6 Hz	
VS1	115	210	SF2	No	10	20		1,9 Hz	
VS2	0	7	SF2	No	0	20		0,8 Hz	
VS3	115	830	SF2	Sí	9	90			
8-147D	130	2580	SF2	Sí	89	11100		Sin cruzamiento	
14-63B7	150	5400	SF4	Sí	41	1400			
8-145D	30	4200	SF1	Sí	12	1500			
8-145C	60	5600	SF1	Sí	55	6650		Sin cruzamiento	
8-145A	520	8200	SF1	Sí	450	64500			

[0302] A partir de este ejemplo se desprende que:

- el líquido sinovial de los pacientes afectados de osteoartritis en la rodilla es un gel de propiedades reológicas débiles; los viscosuplementos y las formulaciones a base de quitosano succinamida tienen propiedades superiores;
- 5 - los viscosuplementos a base de HA ven descender sus propiedades reológicas al diluirlos con el SF;
- las formulaciones a base de CSS conservan sus propiedades de gel después de la dilución en el líquido sinovial;
- las formulaciones a base de CSS tienen propiedades reológicas reforzadas por la mezcla con el líquido sinovial de un adulto voluntario afectado de osteoartritis, al contrario que los viscosuplementos comerciales a base de HA reticulado o no. Se produce probablemente una interacción con los componentes del líquido sinovial, por ejemplo
- 10 ácido hialurónico o agreganos.

Ejemplo 19 - Reproducibilidad de las formulaciones a base de quitosano succinamida al inicio de varios lotes de quitosano succinamida

15 [0303] Se preparan soluciones de quitosano succinamida de concentración variable tal como se describe anteriormente, al inicio de diferentes lotes de CSS de grados de sustitución similares del 19 al 28% (referencias CSS22, CSS24, CSS25, CSS29 y CSS30) y de masas moleculares similares (medias), sin GP. Se miden sus propiedades reológicas con ayuda del reómetro «Discovery Hybrid DHR-2» (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente, antes y después de tratamiento por autoclave (tablas 24a y 24b).

20

Tabla 24a - Antes de autoclave

Ref. CSS	GS (% en moles)	Formulación (referencia)	Frecuencia de crossover (Hz)	G' a frecuencia 0,6 Hz (Pa)	Viscosidad en reposo (Pa.s)
CSS25	20	2 (008-147E)	Sin cruzamiento	170	12300
CSS29	20	5 (016-013A)		159	8000
CSS30	28	1	ND	ND	ND
CSS24	20	3 (016-006B)	Sin cruzamiento	75	3600
CSS22	19	4a (016-006C1)		95	4000
		4b (016-008A)		106	4800

Tabla 24b - Después de autoclave

Formulación (referencia)	Frecuencia de crossover	G' a frecuencia 0,6 Hz (Pa)	Viscosidad en reposo (Pa.s)	Inyectabilidad (aguja 27G, N)
2	ND	ND	ND	ND
5 (016-014A)	Sin cruzamiento	129	6745	ND
1	ND	ND	ND	9 N
3 (016-010B)	Sin cruzamiento	133	8400	9 N
4a (016-010C)		167	7800	10 N
4b (016-010D)		109	5500	13 N

25 [0304] En este ejemplo se observa que:

- El tratamiento al autoclave conserva el carácter de gel, el módulo de elasticidad y la viscosidad en reposo de las formulaciones;
- Se pueden preparar de manera reproducible formulaciones cuyas propiedades reológicas y de inyectabilidad son
- 30 similares, al inicio de varios lotes de CSS diferentes, que provienen de quitosanos de lotes diferentes en el intervalo de masa molecular «media».

Ejemplo 20 - Inyectabilidad de las formulaciones de quitosano succinamida y de viscosuplementos comerciales

35

[0305] Se mide la fuerza necesaria para inyectar diferentes formulaciones a base de quitosano succinamida y de viscosuplementos comerciales a través de agujas para inyección de diferentes tipos y adaptadas a la inyección intraarticular, a temperatura ambiente según el procedimiento descrito anteriormente (tabla 25). Los tamaños de los diferentes tipos de agujas se definen en el ejemplo 23.

40

Tabla 25 - Fuerza necesaria para inyectar las formulaciones a través de agujas para inyección de diferentes tamaños (en newtons)

Formulación		Tipo de aguja («pared normal»)			
		21G	22G	25G	27G
017-008	CSS 2% (sin GP)	2,5	/	5	9
014-084	CSS1%/HA 1% (sin GP)	/	4	8	13
016-008B	CSS 2% (con GP)	/	/	/	13
VS1	VS1	9	/	/	20
VS2	VS2	2,5	/	/	9
VS3	VS3	4	7	15	Difícilmente inyectable*

*presencia de fragmentos de gel

- 5 **[0306]** A partir de este ejemplo se comprende que las formulaciones de geles a base de quitosano succinamida son fáciles de inyectar a través de finas agujas a temperatura ambiente, teniendo características reológicas elevadas a temperatura fisiológica de 37 °C.

Ejemplo 21 - Susceptibilidad a la degradación *in vitro* en condición de estrés oxidativo

10

[0307] En este ejemplo, se ponen formulaciones a base de quitosano succinamida y viscosuplementos comerciales en condición de estrés oxidativo *in vitro* para simular un entorno inflamatorio, según un protocolo adaptado a partir de la publicación de Mendoza *et al.* (Carb Res 342, 96, 2007). El protocolo consiste en generar radicales libres hidroxilo por la reacción de Femton entre iones cúpricos y peróxido de hidrógeno, y en ponerlos en presencia de geles durante 24 horas a temperatura de 37 °C. Se extraen los geles y se mide su módulo de elasticidad G' y su viscosidad dinámica para caracterizar el impacto de la incubación.

15

[0308] Brevemente, se colocan 800 µg de una formulación de gel a base de CSS o de un viscosuplemento comercial a base de HA en un tubo de ensayo. Se añaden 100 µg de una solución de EDTA de concentración 220 µM y 70 µg de una solución de sulfato de seguimiento de concentración 1 mM. Se homogeneiza la mezcla, y se deja la mezcla en incubación a 37 °C durante 24 horas. Se añaden 30 µg de una solución de peróxido de hidrógeno 0,03 M, y después se extrae solución en diferentes intervalos de tiempo, y se miden las propiedades reológicas con ayuda del reómetro Discovery H-2 (TA) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente.

20

- 25 **[0309]** Se calcula el módulo de elasticidad relativo (G'_R) y la viscosidad dinámica relativa (η_R) según las fórmulas 1 y 2, respectivamente:

$$\text{Fórmula 1. } G'_R = G' \text{ en el instante } t / G' \text{ en el instante cero } \times 100$$

30 (tabla 26a)

$$\text{Fórmula 2. } \eta_R = \eta \text{ en el instante } t / \eta \text{ en el instante cero } \times 100$$

(tabla 26b)

35

Tabla 26a - Módulo de elasticidad relativo (G'_R) de los geles a una frecuencia de 0,6 Hz (3,98 rad/s), en función del tiempo de incubación en medio oxidante

Formulación (referencia)	Tipo	0 h	2 h	4 h	24 h
017-008	Gel CSS (2%)	100 %	127 %	125 %	92 %
014-084	Gel CSS (1%)/HA (1%)	100 %	99 %	42 %	51 %
VS1	Viscosuplemento a base de HA no reticulado	100 %	45 %	9 %	14 %
VS3	Viscosuplemento a base de HA reticulado	100 %	78 %	11 %	10 %

Tabla 26b - Viscosidad dinámica relativa (η_R) de los geles en función del tiempo de incubación en medio oxidante

Formulación (referencia)	0 h	2 h	4 h	24 h
017-008	100 %	129 %	128 %	92 %
014-084	100 %	99 %	46 %	51 %
VS1	100 %	51 %	22 %	13 %
VS3	100 %	86 %	14 %	10 %

40

[0310] Las formulaciones de gel a base de CSS de este ejemplo son significativamente más resistentes a la degradación en medio oxidante que las formulaciones comerciales a base de ácido hialurónico reticulado (VS2) o no reticulado (VS1), y conservan su capacidad de absorber los golpes (G') y su poder lubricante (η) durante un tiempo prolongado, de al menos 24 horas.

5

Ejemplo 22 - Osmolalidad de las soluciones acuosas de beta-glicerofosfato de sodio

[0311] Se disuelven 10 g de beta-glicerofosfato de sodio en 100 ml de agua de ósmosis. Se agita la solución hasta disolución total, y después se diluye a diferentes concentraciones mediante adición de agua. La osmolalidad de las soluciones de quitosano succinamida de concentración variable se mide según el procedimiento descrito anteriormente (tabla 27).

Tabla 27 - Osmolalidad de soluciones de beta-glicerofosfato de sodio (GP) en agua

Concentración en GP (g/100 mL)	Osmolalidad (mosmol/kg)
2 %	155
4 %	296
6 %	438
7 %	512
8 %	590
9 %	658
10 %	745

15 **[0312]** Se deduce así que la osmolalidad aumenta con la concentración de glicerofosfato en dichas composiciones. Así una composición que comprende más del 10 % de glicerofosfato presenta una osmolalidad situada por encima de la osmolalidad deseada para las aplicaciones planteadas en la presente invención.

20 **[0313]** En particular las publicaciones de YUHUA Chang *et al.*, («Preparation and properties of a novel thermosensitive N-trimethyl chitosane hydrogel, Polymer Bulletin, Springer, Berlín, DE, 63, 531) y de WU J. *et al.* (A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate, International Journal of Pharmaceutics, Elsevier, BV, NL, 315, n.º 1-2, páginas 1-11) describen composiciones que comprenden más del 10 % en masa de glicerofosfato. La osmolalidad de estas composiciones es así superior a 700 mosmol/kg y muy superior a 500 mosmol/kg.

25

30 **[0314]** Se puede hacer referencia especialmente al documento relativo a la seguridad sanitaria del producto Nuflexxa® (Savient Pharmaceuticals, Inc.; osmolalidad de 258-381 mosm/kg) y de Negoro *et al.* (Effect of osmolarity on glycosaminoglycan production and cell metabolism of articular chondrocyte under three-dimensional culture system, Clinical and Experimental Rheumatology 2008, 26, 534-541) para la importancia del intervalo de osmolalidad. Una osmolalidad de aproximadamente 400 mosm/kg es un valor terapéuticamente excelente ya que ejerce una fuerte influencia en la proliferación de células como los condrocitos, los osteocitos y los fibroblastos.

Ejemplo 23 - Diámetros de las agujas para inyección

35 **[0315]** Los tamaños de las agujas para inyección se definen por la norma ISO9262:1991 y la modificación ISO9262:1991/Amd.1:2001(E). El diámetro exterior se fija con una tolerancia en el valor (intervalo mín.-máx.), mientras que el diámetro interior de las agujas depende del grosor de las paredes, que son de grosor normal («pared normal»), fino («pared fina») o extrafino («pared extrafina») según los tipos de aguja y las aplicaciones. La tabla 28 retoma los diámetros exteriores (mín./máx.) e interiores mínimos de los tipos de agujas disponibles comercialmente.

40

Tabla 28 - Intervalo de agujas de diferentes grosores para inyección y tolerancia de los diámetros internos y externos, según la norma ISO9262:1991/Amd.1:2001 (E).

Tipo (Gauge)*	Tamaño (mm)	Diámetro externo (µm)		Diámetro interno (µm)		
				«Pared normal» o «regular»	«Pared fina»	«Pared extrafina»
				Min	Min	Min
		Min	Max	Min	Min	Min
32	0,23	229	241	89	105	/
31	0,25	254	267	114	125	/
30	0,30	298	320	133	165	/
29	0,33	324	351	133	190	/
28	0,36	349	370	133	190	/
27	0,40	400	420	184	241	/
26	0,45	440	470	232	292	/
25	0,5	500	530	232	292	/
24	0,55	550	580	280	343	/
23	0,60	600	673	317	370	460
22	0,70	698	730	390	440	522
21	0,80	800	830	490	547	610
20	0,90	860	920	560	635	687
19	1,10	1030	1100	648	750	850
18	1,20	1200	1300	790	910	1041

*para información

5 Ejemplo 24 - Recomendaciones en los tipos de agujas para inyección

[0316] La tabla 29 recoge una lista de los tipos de agujas que se recomiendan para la inyección de diferentes productos comerciales para la reparación, el tratamiento o el relleno, por ejemplo en forma intraarticular de diferentes productos de viscosuplementación comerciales, en forma intradérmica o subcutánea para productos comerciales de relleno de la dermis, en forma intradérmica superficial para productos comerciales destinados a la regeneración de la piel, o incluso en forma intracameral para oftalmología. Los diámetros externos e internos de estos tipos de agujas se indican en el ejemplo 23.

Tabla 29 - Tipos de agujas recomendadas para la administración por inyección, según el sitio y el tipo de inyección y el producto considerado

Producto	Tipo y sitio de inyección	Tamaño de aguja recomendado
Viscosuplemento intraarticular (VS1)	Intraarticular/rodilla	Calibre 19 a 21
Viscosuplemento intraarticular (VS2)	Intraarticular/rodilla	Calibre 20
Viscosuplemento intraarticular (VS3)	Intraarticular/rodilla	Calibre 18 a 20
Viscosuplemento intraarticular (VS4)	Intraarticular/dedos	Calibre 19 a 25
Reparación del cartílago por artroscopia*	Artroscopia/rodilla, cadera	Calibre 18
Relleno de arrugas a base de ácido hialurónico reticulado	Intradérmico/cara	Calibre 25 a 27
Relleno de arrugas a base de micropartículas biorreabsorbibles	Intradérmico/cara	Calibre 26
Rejuvenecimiento de la piel a base de ácido hialurónico no reticulado	Subcutáneo o intradérmico/cara, manos, cuello	Calibre 30 a 32**
Profilaxis antibiótica	Intracameral/cámara anterior del ojo	Calibre 30

* en: Stanish *et al.* 2006; **por ejemplo aguja de tipo «pen needle» Micro-Fine™ Ultra 4 mm (32G) comercializada por BD.**Ejemplo 25 - Prueba de esterilización al vapor**

[0317] La solución de este ejemplo es una solución que comprende el 1,2 % (m/m) de quitosano succinamida de grado de sustitución del 15 % y masa molecular «media» (n.º CSS16 de la tabla 2), el 3,5 % (m/m) de beta-glicerol fosfato de sodio, 0,4 % (m/m) de D-manitol y 11 mol/l de acetato de sodio trihidratado (véase ejemplo 11). Esta solución se esteriliza según el protocolo siguiente:

[0318] Se colocan 400 ml de hidrogel en un frasco de Schott y después se coloca la muestra en un autoclave (modelo Systec DX-23) con un ciclo líquido a 121 °C durante 20 minutos, según una operación clásica de esterilización postulada por la norma ISO17665.

5 **Tabla 30. Características de una solución de quitosano succinamida antes y después de la esterilización al vapor**

	Antes de la esterilización	Después de la esterilización
pH	7,5	7,51
Viscosidad dinámica aparente (Brookfield S18, 5 vueltas/min a 8 °C)	470 mPa.s	370 mPa.s
Osmolalidad	488 mosm/kg	507 mosm/kg

[0319] Después de la esterilización, el hidrogel según la presente invención presentaba un pH, una viscosidad y una osmolalidad totalmente convenientes para su uso en un ser humano o un animal, especialmente como composición inyectable a través de una aguja. La medida de la osmolalidad se realiza tal como se describe anteriormente.

Ejemplo 26 - Ciclo de transición sol-gel

15 [0320] Las muestras se han sometido a un ciclo de esterilización tal como se describe en el ejemplo 25. Se han colocado varias muestras así esterilizadas a una temperatura inicial de 4 °C. Estas muestras son fluidas: cuando se devuelven al tubo, se constata visualmente que la solución es fluida en el interior del tubo. A continuación se han sometido las muestras a un ciclo de gelificación colocándolas en un horno durante una hora a 37 °C. Se gelifican las muestras. Se constata visualmente la presencia de un gel invirtiendo el tubo: el gel no fluye.

20 [0321] Las mismas muestras experimentan un enfriamiento y se mantienen durante una hora como mínimo a 4 °C. Las muestras son fluidas: cuando se invierte el tubo, se constata visualmente que la solución es fluida en el interior del tubo.

25 [0322] Las muestras pueden experimentar a continuación varias transiciones sol-gel y presentan así una reversibilidad de la transición sol-gel.

[0323] Las muestras se han sometido a 3 ciclos de gelificación-desgelificación.

30 **Ejemplo 27- Prueba de gelificación después de la esterilización**

[0324]

Tabla 31.

Descripción	Gelificación antes de la esterilización			Gelificación después de la esterilización	
	pH	Gelificación a 37 °C	Inyectabilidad	Gelificación a 37 °C	Inyectabilidad
Solución CsS/GP sodio	8,2	OK	OK	OK	OK
Solución CsS hidrogel Na	7,6	OK	OK	OK	OK
Solución CsS testigo (sin esterilización)	7,55	OK	OK	OK	OK
Solución CsS/GP sodio	7,92	OK	OK	OK	OK
Solución CsS testigo (sin esterilización)	7,55	OK	OK	OK	OK

35 La inyectabilidad se mide tal como se describe anteriormente. Las soluciones se presentan en forma de un gel a 37 °C.

Ejemplo 28 - Prueba de contaminación microbiana

40 [0325] Se han introducido composiciones termogelificables de la invención en jeringas de plástico de uso médico único, y después se han esterilizado al vapor de acuerdo con la esterilización descrita anteriormente. A continuación se han realizado pruebas de crecimiento microbiano: se colocan las jeringas esterilizadas que comprenden las composiciones termogelificables bien en una gelosa Columbia con el 5 % de sangre de cordero

(gelosa COS) y gelosa Chocolat PolyViteX (gelosa PVX), en condiciones aerobias a 35 °C con el 5 % de CO₂, o bien en tubos de tioglicolato (TIO) a 35 °C subcultivados en la gelosa Columbia. No se ha detectado ninguna contaminación microbiana: las pruebas de crecimiento son todas negativas.

- 5 **[0326]** El ciclo de esterilización se adapta a continuación para esterilizar composiciones termogelificables según la invención, por ejemplo para un uso inyectable en un ser humano o un animal.

REIVINDICACIONES

1. Composición termogelificable esterilizada que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina y en su caso unidades de N-acetil-D-glucosamina sustituidas.
5
2. Composición termogelificable esterilizada, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la transición sol-gel es reversible.
- 10 3. Composición termogelificable esterilizada, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** se esteriliza al vapor.
4. Composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** no se gelifica después de la esterilización.
15
5. Solución esterilizada, estando dicha solución constituida por o comprendiendo una composición termogelificable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Procedimiento de esterilización de una composición termogelificable, **caracterizado porque**
20 comprende al menos las etapas siguientes:
- colocar una composición termogelificable que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina en la cámara de un autoclave;
 - 25 - elevar y mantener la temperatura de la cámara del autoclave a una temperatura de esterilización y durante un tiempo de esterilización, siendo la temperatura y el tiempo de esterilización suficientes para esterilizar la composición termogelificable;
 - reducir la temperatura de la cámara del autoclave;
 - sacar la composición termogelificable esterilizada de la cámara del autoclave.
- 30 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, **caracterizado porque** la temperatura de la cámara se mantiene a una temperatura superior a 60 °C, preferentemente superior a 100 °C, preferentemente superior a 120 °C.
- 35 8. Procedimiento, según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado porque** el tiempo de esterilización es de al menos 3 minutos, preferentemente de al menos 10 minutos, preferentemente de al menos 15 minutos y más preferentemente de al menos 20 minutos.
9. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado porque** comprende
40 uno o varios ciclos de esterilización al vapor.
10. Composición inyectable **caracterizada porque** comprende o consiste en una composición termogelificable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o susceptible de obtenerse según un procedimiento tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
45
11. Composición inyectable, según la reivindicación 10, **caracterizada porque** se usa como composición farmacéutica inyectable o dispositivo médico inyectable o implantable.
12. Composición según la reivindicación 11, para un uso para un procedimiento de tratamiento terapéutico
50 que comprende la inyección por vía subcutánea, intradérmica, intraocular o intraarticular, de dicha composición, o para un uso para la reparación o el relleno de al menos un tejido corporal que necesita una reparación o un relleno.
13. Composición para su uso según la reivindicación 12, **caracterizada porque** el tejido corporal se elige entre los tejidos que pertenecen a las cuerdas vocales, los músculos, los ligamentos, los tendones, los cartílagos, los
55 órganos sexuales, los huesos, las articulaciones, los ojos, la dermis o una cualquiera de sus combinaciones, y más en particular a las uniones articulares.
14. Composición según la reivindicación 12 o 13, para su uso en un procedimiento de tratamiento de una osteoartritis, o la reparación de un defecto de cartílago, por ejemplo por inyección en el líquido sinovial o después

de la mezcla con la sangre y la implantación en el cartílago.

15. Dispositivo médico, por ejemplo implante médico, **caracterizado porque** comprende o consiste en una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14.

5

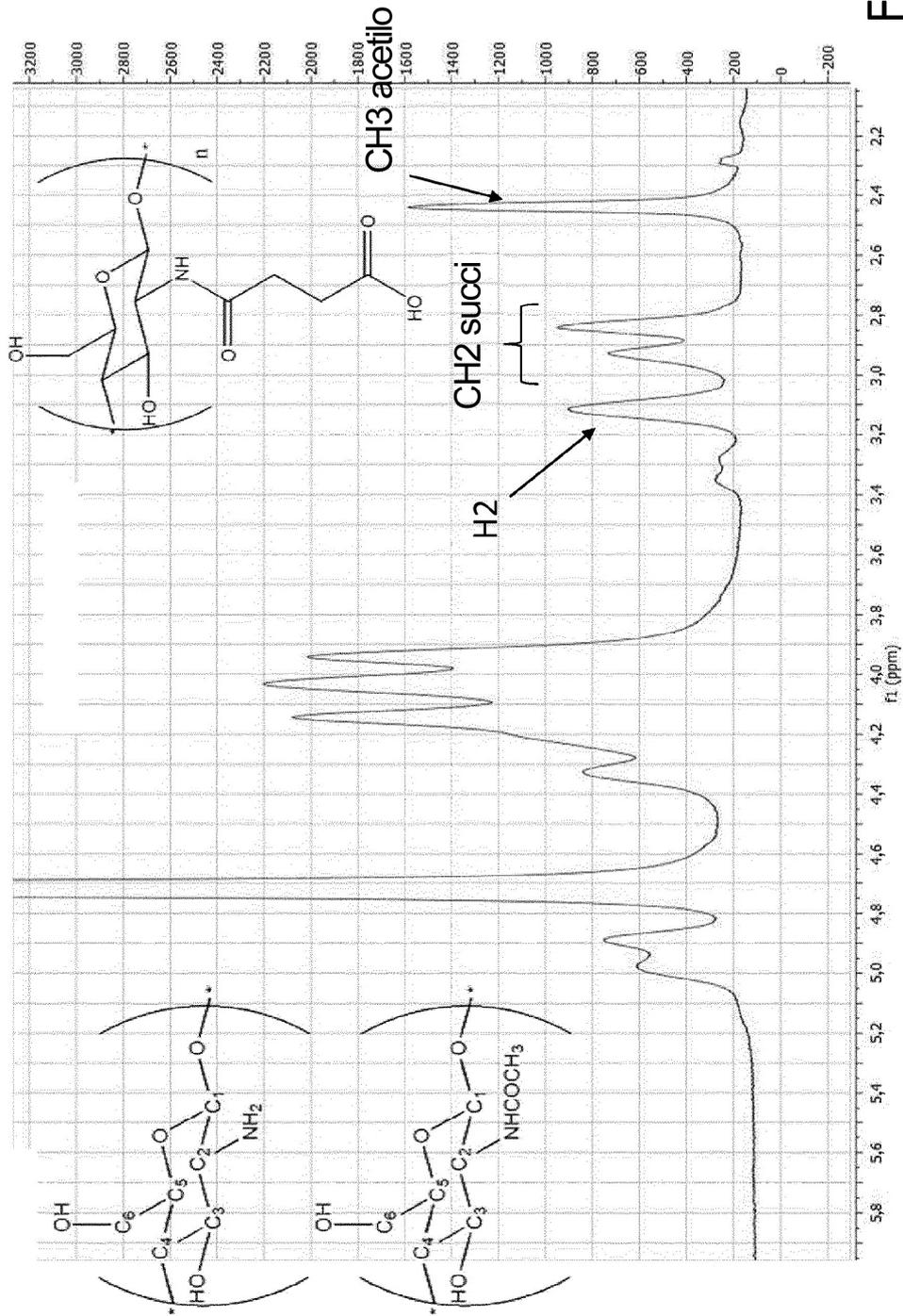


FIG.1