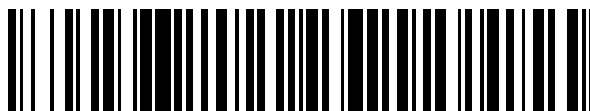


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 456**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2014** **PCT/EP2014/065237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015** **WO15007773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2014** **E 14753022 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 3021881**

54 Título: **Ácido hialurónico reticulado, proceso para la preparación del mismo y uso del mismo en el campo estético**

30 Prioridad:

16.07.2013 IT MI20131193

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

13.09.2017

73 Titular/es:

I.R.A. ISTITUTO RICERCHE APPLICATE S.R.L.
(100.0%)

Via del Lavoro 4A/6
20040 Usmate Velate, IT

72 Inventor/es:

CITERNESI, UGO RAFFAELLO;
BERETTA, LORENZO y
CITERNESI, LORENZO

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 632 456 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

Ácido hialurónico reticulado, proceso para la preparación del mismo y uso del mismo en el campo estético

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al uso de un ácido hialurónico reticulado en el campo estético y al proceso de preparación del mismo.

10 [0002] En particular, la presente invención se origina en el campo de los rellenos dermatológicos y de materiales poliméricos biológicamente compatibles útiles en los procedimientos estéticos no quirúrgicos en el cuerpo humano.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 [0003] El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfato, que es un polisacárido lineal que consiste en unidades monoméricas de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina.

[0004] En un principio, el ácido hialurónico se extrajo y luego se purificó a partir de crestas de gallos o cordón umbilical de ciertos mamíferos. Con estas técnicas, se obtuvo un polímero que tenía un peso molecular variable entre 1 y 6 millones de Dalton. Actualmente, el ácido hialurónico se obtiene microbiológicamente mediante fermentación bacteriana con cepas bacterianas adecuadamente seleccionadas. El peso molecular medio del polímero obtenido por las técnicas microbiológicas puede variar entre miles y millones de Dalton. La viscosidad de una solución acuosa de ácido hialurónico aumenta a medida que aumenta el peso molecular y la concentración, determinando un aumento de las características elásticas.

25 [0005] El ácido hialurónico, en particular en forma salificada con sodio, es soluble en agua y está naturalmente presente al nivel de la matriz extracelular y en diferentes tejidos del organismo humano, tal como el tejido nervioso epitelial, conectivo, y está presente además en los fluidos sinovial e interarticular.

30 [0006] A nivel del epitelio, el ácido hialurónico tiene numerosas funciones, por ejemplo, contribuye a su hidratación, a la organización de la matriz extracelular, participa también en los mecanismos de reparación del tejido epidérmico y de los tejidos dérmicos y conectivos, así como y además tiene la función de un material de relleno. Sin embargo, el nivel de ácido hialurónico presente en las diversas capas de piel disminuye con el tiempo debido al proceso de envejecimiento natural del organismo. Este proceso también puede verse afectado por factores externos, como la exposición a los rayos ultravioletas del sol y a las sustancias contaminantes y, en general, a las sustancias que tienen una actividad oxidante.

40 [0007] La reducción en la cantidad de ácido hialurónico y sales del mismo en la piel aceleran el envejecimiento de la misma. Aunque el envejecimiento de la piel está determinado por múltiples factores, entre los cuales se encuentran el estilo de vida, la dieta, el consumo de alcohol y tabaco, la influencia ejercida por los agentes atmosféricos sobre la piel tiene una importancia significativa. El envejecimiento de la piel típicamente se muestra con atrofia, sequedad y pérdida de elasticidad de la piel y la aparición de arrugas y rugosidad.

45 [0008] En varios casos, el envejecimiento de la piel determina la formación de pequeños fallos estructurales, la creación de depresiones o el ablandamiento de los tejidos, especialmente a nivel de la piel y la cara.

[0009] Una de las técnicas destinadas a obviar estos inconvenientes estéticos proporciona el uso de rellenos dérmicos, productos a base de polímeros. Su uso en el campo cosmético-dermatológico está dirigido a reemplazar o integrar la pérdida de polímeros naturalmente presentes en la matriz endógena o a reequilibrar la función de los polímeros de la matriz de tejido cutáneo que todavía están intactos.

50 [0010] Entre los materiales de relleno ampliamente utilizados en el campo estético, se conoce desde hace mucho tiempo el uso de colágeno y, en tiempos recientes, el ácido hialurónico. Generalmente, estas cargas a base de polímero se aplican por medio de un implante o inyección subcutánea.

55 [0011] Para estos tipos de aplicación, los rellenos poliméricos dérmicos se formulan generalmente en una forma adecuada para ser inyectada por vía subcutánea en las áreas en las que es necesario obtener un efecto de relleno o estructuración.

60 [0012] Inicialmente, el ácido hialurónico usado como relleno dérmico consistió en el polímero de origen natural que típicamente tiene una forma no reticulada.

[0013] Sin embargo, el ácido hialurónico de origen natural, a pesar de tener la ventaja de ser altamente compatible

con los tejidos del cuerpo humano, tener una alta afinidad con el agua y realizar una fuerte función hidratante, no tiene las propiedades bio-mecánicas adecuadas. Por esta razón, no desempeña una función estructuradora adecuada y sólo ejerce mínimamente el efecto requerido para las principales aplicaciones en el campo estético.

[0014] Se encontró, de hecho, que la alta solubilidad del ácido hialurónico determina una eliminación rápida del mismo. Cuando el ácido hialurónico se inyecta en los tejidos de la piel, existe una rápida degradación *in vivo* tanto por hialuronidasas (degradación enzimática) como por radicales libres (degradación química) presentes en los tejidos del cuerpo humano. Este proceso de degradación obliga a usar aplicaciones frecuentes de ácido hialurónico para mantener constante el efecto hidratante y estructurante.

[0015] Con el fin de superar estos inconvenientes, se han hecho nuevos rellenos dermatológicos a base de ácido hialurónico reticulado, dotados de mayor consistencia en comparación con el ácido hialurónico de origen natural. Estos polímeros reticulados tienden a permanecer más tiempo en el área de implantación y, en consecuencia, determinan una mejora en las cualidades de relleno de los tejidos de la piel.

[0016] Los polímeros a base de ácido hialurónico reticulados se obtienen con métodos que permiten formar enlaces covalentes o iónicos que crean una red ordenada de cadenas de ácido hialurónico.

[0017] Dependiendo de los propósitos, es entonces posible producir ácido hialurónico reticulado con diferentes grados de reticulación. Por ejemplo, para aplicaciones médicas, tales como en cirugía oftálmica, se utilizan polímeros lineales reticulados, mientras que para la formación de implantes estructurales se utiliza ácido hialurónico ramificado.

[0018] Los ejemplos típicos de agentes de reticulación utilizados actualmente para generar ácido hialurónico reticulado son divinil sulfona (DVS), 1,4-butanodiol diglicidil éter, carbodiimidas solubles en agua y agentes de reticulación que contienen múltiples grupos amina.

[0019] Sin embargo, se encontró que estos agentes de reticulación no tienen una biocompatibilidad adecuada con los tejidos del organismo, por lo que cuando se implantan en la piel, pueden determinar la aparición de reacciones adversas o una cierta toxicidad celular.

[0020] La solicitud de patente GB 2 151 244 A desvela preparaciones insolubles en agua de ácido hialurónico (HA) que se utilizarán para aplicaciones en diversos dispositivos protésicos, incluyendo válvulas cardíacas artificiales e injertos vasculares. Esta solicitud también desvela un método para preparar un ácido hialurónico reticulado que comprende someter HA o una sal de adición de ácido del mismo a un tratamiento con un agente de reticulación seleccionado entre formaldehído, dimetilurea, dimetiloetileno urea, óxido de etileno, poliaziridina, poliisocianato y divinilsulfona.

[0021] La solicitud internacional WO 2012/028863 desvela una composición biocompatible para el aumento de tejido que comprende una mezcla de proteína de tipo gelatina reticulada y HA reticulado en una relación en masa en el intervalo de 60:40 y 5:95 y que tiene un tiempo de degradación de al menos un mes. Los agentes de reticulación adecuados incluyen bis(2-cloroetilurea).

[0022] Por consiguiente, todavía existe la necesidad de proporcionar nuevos polímeros reticulados útiles como rellenos dermatológicos que tengan una alta biocompatibilidad con tejidos de la piel.

[0023] Uno de los propósitos de la presente invención, por lo tanto, es proporcionar un polímero reticulado implantable o inyectable en las áreas de la piel afectadas por los signos del envejecimiento de la piel que es tanto compatible con el tejido de la piel como posee propiedades de relleno adecuadas. Otro objeto de la invención es proporcionar un polímero reticulado inyectable biocompatible que tenga aplicaciones como material de reestructuración y de relleno en el campo estético.

RESUMEN

[0024] Dentro del alcance de la presente invención, se proporciona, por lo tanto, un biopolímero reticulado altamente compatible con el tejido de la piel, métodos para la preparación del mismo y usos en el campo estético del tipo cosmético o médico.

[0025] La presente invención se origina por haber encontrado una forma de obtener ácido hialurónico en la forma reticulada usando un agente de reticulación biocompatible seleccionado y haber encontrado que un polímero reticulado con urea es altamente biocompatible y resistente a la degradación enzimática o química.

[0026] En vista de los objetivos anteriores, la presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un biopolímero

reticulado compatible con los tejidos del organismo humano a base de ácido hialurónico reticulado con urea.

[0027] Típicamente, el biopolímero reticulado de la invención es inyectable o implantable en los tejidos del organismo humano, tal como por ejemplo la piel.

[0028] Típicamente, el biopolímero reticulado de la invención es una matriz macromolecular reticulada altamente biocompatible y/o fisiológicamente aceptable.

[0029] De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un biopolímero reticulado que comprende la reticulación de ácido hialurónico y urea. Típicamente, la reacción de reticulación del método de la invención tiene lugar en catálisis de ácido.

[0030] En ciertas realizaciones, el ácido hialurónico y la urea se reticulan en condiciones de reacción en las que ambas sustancias son inicialmente solubles en una solución acuosa.

[0031] De acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención proporciona un biopolímero reticulado compatible con los tejidos del organismo humano a base de ácido hialurónico reticulado con urea para su uso en el campo estético, tal como, por ejemplo, en las aplicaciones en el campo de la medicina estética.

[0032] En ciertas realizaciones, el biopolímero reticulado a base de ácido hialurónico reticulado con urea es para uso externo, por ejemplo, mediante aplicación a la piel, en una cantidad cosméticamente eficaz.

[0033] En algunas realizaciones, el biopolímero biocompatible reticulado a base de ácido hialurónico reticulado con urea se inyecta o se implanta en un tejido del organismo humano en una cantidad adecuada para determinar un efecto estético.

[0034] En un aspecto, la presente invención proporciona un método cosmético o estético para el aumento de tejido en un sujeto que comprende la inyección en la piel del sujeto de un biopolímero reticulado basado en o que consiste esencialmente en ácido hialurónico reticulado con urea.

[0035] En ciertas realizaciones, el tejido es un tejido blando del cuerpo humano.

[0036] En ciertas realizaciones, el método cosmético o estético para el aumento de tejido es para el tratamiento de líneas, arrugas, pliegues o surcos asociados con el envejecimiento facial de un sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0037] La presente invención se describirá en detalle a continuación y con referencia a las figuras, en las que:

La figura 1 ilustra las curvas de flujo relativas a la tensión de cizallamiento - Tensión de cizallamiento τ - en función de la velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ del biopolímero reticulado ácido hialurónico - urea (Ej. 1 y 3)

La figura 2 muestra curvas de flujo (ensayo de barrido de amplitud) relativas a la viscosidad expresada como mPa en función de la Velocidad de cizallamiento de acuerdo con el Ejemplo 3;

La figura 3 muestra la curva de flujo relativa a la viscosidad η en función de la velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ del biopolímero esterilizado del Ejemplo 4;

La figura 4 muestra el patrón del módulo de elasticidad (almacenamiento) del módulo viscoso (pérdida) del polímero en función de determinados valores de deformación: el ensayo indica cómo prevalece el módulo elástico (y consecuentemente el comportamiento elástico) sobre el módulo meramente viscoso.

La figura 5 muestra la curva de flujo relativa a la tensión de cizallamiento - Tensión de cizallamiento τ - en función de la velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ de acuerdo con el Ejemplo 4.

La figura 6 ilustra el gráfico en barrido de frecuencia del producto considerado en el Ejemplo 4.

La figura 7 ilustra curvas relativas a la viscosidad η en función de la velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ del biopolímero liofilizado del Ejemplo 5;

la figura 8 muestra la curva de flujo relativa a la tensión de cizallamiento - Tensión de cizallamiento τ - en función de la velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ del biopolímero liofilizado del Ejemplo 5.

La figura 9 ilustra un gráfico en Barrido de Amplitud del producto liofilizado del Ejemplo 5.

La figura 10 ilustra un gráfico en Barrido de frecuencia del producto liofilizado del Ejemplo 5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0038] El solicitante encuentra que se obtiene un biopolímero a base de ácido hialurónico reticulado utilizando como agente de reticulación una sustancia fisiológicamente disponible en el cuerpo humano que es altamente compatible con los tejidos del organismo humano.

[0039] De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un biopolímero biocompatible reticulado para su uso para el aumento de tejido o relleno dérmico para la mejora de la apariencia estética de una característica anatómica de un individuo en el que dicho biopolímero se basa en ácido hialurónico reticulado con urea.

[0040] De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un biopolímero de aumento de relleno de tejido blando que comprende ácido hialurónico reticulado con urea y el uso del mismo como relleno dérmico para tratar el envejecimiento, especialmente el envejecimiento facial.

[0041] En algunas realizaciones, el biopolímero reticulado a base de ácido hialurónico reticulado con urea tiene un peso molecular comprendido en el intervalo de 100.000 a 20.000.000 Dalton, 500.000 a 10.000.000 Dalton, 1.000.000 a 6.000.000 Dalton, típicamente de 2.000.000 a 4.000.000 Dalton.

[0042] Típicamente, el ácido hialurónico a partir del cual se obtiene el biopolímero reticulado de la invención es un polisacárido que consiste esencialmente en unidades alternas de ácido glucurónico y N-acetil glucosamina capaces de retener agua y soportar tensiones hidrostáticas.

[0043] En ciertas realizaciones, el ácido hialurónico de partida no es inmunogénico y tiene la ventaja de ser fisiológicamente aceptable y compatible con los tejidos del cuerpo humano.

[0044] El agente de reticulación utilizado para obtener el biopolímero reticulado de la invención se basa en urea (carbamida), un compuesto orgánico que tiene dos funcionalidades amino ($-NH_2$) unidas entre sí con un grupo funcional carbonilo ($C=O$). La urea desempeña un papel clave en el metabolismo del nitrógeno de muchos mamíferos, siendo el principal compuesto nitrogenado que se encuentra en la orina de dichos mamíferos y aparece como una sustancia inodora e incolora soluble en agua, sustancialmente no tóxica. La urea tiene además una alta solubilidad en un medio acuoso, debido a la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con agua.

[0045] El biopolímero reticulado de la invención puede prepararse mediante la reticulación de ácido hialurónico o una sal del mismo con urea, preferiblemente en un entorno ácido.

[0046] De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona así un método para producir un biopolímero a base de ácido hialurónico reticulado con urea que comprende una etapa de polimerización de ácido hialurónico o una sal del mismo con urea en condiciones ácidas.

[0047] En ciertas condiciones ambientales, el ácido hialurónico y la urea se pueden combinar en un líquido a base de agua en el que ambos componentes son solubles. El ácido hialurónico y las sales del mismo y la urea pueden reticularse mientras ambos se disuelven en un líquido a base de agua para formar el biopolímero de la invención.

[0048] Los líquidos adecuados utilizados en el método de la invención comprenden agua y una solución salina.

[0049] En general, el método de la invención proporciona una etapa de disolución en la que el ácido hialurónico o una sal del mismo, se disuelve en un líquido, típicamente agua.

[0050] En algunas realizaciones, al final de la etapa de disolución, el ácido hialurónico en solución está presente en una cantidad que varía de 2 mg/ml a 120 mg/ml, 5 a 25 mg/ml, típicamente de 7 a 20 mg/ml.

[0051] Dentro del alcance de la invención, la expresión sal de ácido hialurónico se refiere a cualquier sal soluble en agua de ácido hialurónico tal como, por ejemplo, sal sódica, potásica o cálcica.

[0052] Dentro del alcance de la invención, el término biopolímero significa un polímero fisiológicamente aceptable, es decir, compatible con los tejidos del organismo humano.

[0053] En ciertas realizaciones, el ácido hialurónico de partida o una sal del mismo, tiene un peso molecular como se ha descrito previamente para el biopolímero a base de ácido hialurónico reticulado con urea, obtenido al final del proceso de reticulación.

[0054] El método de la invención comprende además una etapa de disolución de urea en una solución acuosa, preferiblemente a pH ácido, por ejemplo de 3 a 6,8, típicamente de 3,5 a 4.

[0055] De acuerdo con algunas realizaciones, la urea en solución acuosa ácida está presente en una concentración de 1 a 100 mg/ml, de 3 a 50 mg/ml, típicamente de 5 a 25 mg/ml.

[0056] En una etapa posterior del método, la solución a base de ácido hialurónico y la solución que típicamente es

una solución ácida a base de urea se ponen en contacto para formar una mezcla para dar el biopolímero reticulado con un enlace de tipo amídico. De acuerdo con ciertas realizaciones, la mezcla obtenida se agita para obtener un biopolímero a base de ácido hialurónico reticulado con urea.

5 **[0057]** Típicamente, las condiciones de reacción del método de la invención, tales como, por ejemplo, la concentración de los dos componentes, el pH de la solución, se pueden ajustar para evitar la formación de complejos que precipitan a partir de la solución e impedir o ralentizar la reticulación.

10 **[0058]** Por ejemplo, la relación en peso de ácido hialurónico o una sal del mismo con respecto a urea en la solución acuosa o en la mezcla de reacción de reticulación puede estar en el intervalo de 0,3 a 10, 0,8 a 5, 1 a 3.

[0059] En algunas realizaciones, la mezcla obtenida tiene un pH en el intervalo de 3 a 6,8, preferiblemente de 3,5 a 4. En algunas realizaciones, para obtener el pH ácido de la solución, se añade una solución ácida, tal como por ejemplo un HCl solución acuosa. Opcionalmente, si la mezcla tiene un pH fuera del intervalo de 3,5-4, es posible añadir un agente de ajuste del pH, tal como una solución de un ácido, por ejemplo HCl, o una base, por ejemplo NaOH.

20 **[0060]** En algunas realizaciones, para ajustar el pH en el intervalo de 3,5-4, es posible añadir un tampón, tal como, por ejemplo, ácido acético y acetato sódico. El Solicitante también encuentra que con la realización de la reacción a un pH ácido en el intervalo de 3,5 a 4 se logra una reticulación inesperada de ácido hialurónico de alta velocidad.

[0061] En algunas realizaciones, la mezcla se ajusta térmicamente, por ejemplo, a 35(+/- 2) °C durante 20-24 horas, y posteriormente se somete a un hinchamiento para eliminar el exceso de urea presente en la solución.

25 **[0062]** De acuerdo con algunas realizaciones, el pH del producto obtenido está en el intervalo de 5,5 a 7,5, típicamente de 5,5 a 6,8. Si el pH no está dentro del intervalo de 5,5-7,5, es posible ajustarlo añadiendo una solución de NaOH 0,2 M, en una o más porciones, hasta que esté dentro del intervalo deseado.

30 **[0063]** En ciertas realizaciones, al final de la reacción de reticulación, el biopolímero reticulado biocompatible obtenido se reduce a partículas o se homogeneiza pasando a través de un tamiz que tiene un tamaño de poro adecuado, por ejemplo de 5 a 150 micrómetros, o de 40 a 80 micrómetros para formar un hidrogel o una suspensión inyectable.

35 **[0064]** De acuerdo con algunas realizaciones, el biopolímero recién formado a partir de la reacción de polimerización está en forma de hidrogel.

[0065] En algunas realizaciones, el biopolímero biocompatible reticulado a base de ácido hialurónico reticulado con urea obtenido con el método de la invención se esteriliza o se liofiliza.

40 **[0066]** El biopolímero reticulado biocompatible a base de ácido hialurónico reticulado con urea tiene aplicación tanto en el campo cosmético, por ejemplo, como un relleno de arrugas o rugosidad de la piel, como en el campo médico estético, por ejemplo, como un relleno dermatológico o para la fabricación de implantes subcutáneos. El biopolímero reticulado de la invención es también adecuado para la reconstitución de tejidos del organismo humano que se han eliminado después de la cirugía, como, por ejemplo, en el caso de la extirpación quirúrgica del tejido mamario o la liposucción.

50 **[0067]** De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de tratamiento cosmético o estético o médico para la mejora de la apariencia estética de una característica anatómica de una zona del cuerpo de un individuo, comprendiendo dicho método la aplicación, inyección o implantación sobre un tejido de un biopolímero hecho de ácido hialurónico reticulado con urea. En ciertas realizaciones, el método es un método de tratamiento no quirúrgico.

55 **[0068]** La mejora de la apariencia estética de una característica anatómica de un individuo incluye la mejora de cualquier tipo de cualidad estética que incluya la apariencia externa, sensación táctil, en particular de la piel de cualquier región del cuerpo, tal como, por ejemplo, cara, labios, área periocular, senos, glúteos.

60 **[0069]** En ciertos aspectos, se proporciona un biopolímero que consiste esencialmente en ácido hialurónico reticulado con urea para su uso en el tratamiento del envejecimiento facial, especialmente para el tratamiento de líneas, arrugas, pliegues o surcos asociados con el envejecimiento facial, en el que el biopolímero se aplica o se inyecta en un tejido blando de un cuerpo humano. En ciertas realizaciones, el biopolímero de la invención se aplica sobre la piel o se inyecta o se implanta preferiblemente en la epidermis, la dermis o la hipodermis.

[0070] El método de la invención comprende implantar o inyectar una cantidad cosméticamente eficaz del

biopolímero biocompatible reticulado descrito anteriormente en el presente documento en un tejido del cuerpo humano para mejorar la calidad estética de una característica anatómica.

[0071] En ciertas realizaciones, el tejido del cuerpo humano es un tejido blando.

[0072] En algunas realizaciones, el biopolímero inyectado o implantado en el tejido del cuerpo humano está en forma de un hidrogel o suspensión.

[0073] La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1

[0074] Método de preparación de ácido hialurónico reticulado con urea de la invención. Se disuelven 8 g de hialuronato sódico en 72 g de solución salina. Se prepara una solución separada disolviendo 4 g de urea en 16 g de HCl 0,2 M.

[0075] Las dos soluciones preparadas se mezclan hasta que la solución final es homogénea; se mide el pH que tiene que estar en el intervalo de 3,5 a 4.

[0076] El producto se ajusta térmicamente a 35(+/- 2) °C durante 20-24 horas, después el exceso de urea se elimina; una vez purificado, se midió el pH del producto obtenido, que estaba comprendido entre 5,5 y 7,5.

[0077] Si el pH no está dentro del intervalo de 5,5-7,5, se ajusta añadiendo una solución de NaOH 0,2 M hasta que esté dentro del intervalo deseado.

EJEMPLO 2

[0078] Ejemplo comparativo de preparación de ácido hialurónico reticulado con urea, se realizó el mismo procedimiento de reticulación del Ejemplo 1 en catálisis básica usando una solución de NaOH 0,2 M.

[0079] Se disuelven 8 g de hialuronato sódico en 72 g de solución salina. Se prepara una solución separada disolviendo 4 g de urea en 16 g de NaOH 0,2 M. Las dos soluciones preparadas se mezclan hasta que la solución final es homogénea. El producto ajustado térmicamente a 35(+/- 2) °C durante 20-24 horas no se reticula, sino que se hidroliza dando lugar a una rotura en las moléculas de ácido hialurónico, por lo que el producto pierde sus propiedades viscoelásticas.

EJEMPLO 3

[0080] Propiedades físico-químicas del ácido hialurónico reticulado con urea obtenido por el método del Ejemplo 1.

Características

[0081] El producto obtenido se sometió a los siguientes ensayos.

- Análisis reológico del producto
- Determinación de la viscosidad η
- Determinación del módulo de almacenamiento G' y del módulo de pérdida G''
- Prueba de resistencia a la esterilización
- Ensayo de resistencia a la liofilización

[0082] Los análisis reológicos llevados a cabo se realizaron de acuerdo con los siguientes modos:

1. Análisis de la viscosidad η y de la tensión de cizallamiento τ en función de la velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ con los siguientes parámetros curva de avance de 400 s que consiste en 50 puntos x 8 s con velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ de 1 a 50 1/s; estiramiento constante de 120 s consistente en 12 puntos x 10 s con velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ constante a 50 1/s; curva de retroceso de 400 s que consiste en 50 puntos x 8 s con la velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma}$ de 50 a 1/s
2. Análisis de barrido de amplitud con los siguientes parámetros: 21 puntos con una frecuencia de muestreo establecida por el instrumento, frecuencia angular ω constante a 10 rad/s con Deformación γ variable del 0,001 al 100 %
3. Análisis de barrido de frecuencia con los siguientes parámetros: 16 puntos con una frecuencia de muestreo establecida por el instrumento, Deformación γ y constante al 0,7 % con una frecuencia angular ω

variable de 0,1 a 100 rad/s.

[0083] Los primeros ensayos se realizaron sobre el producto no esterilizado del que emerge un comportamiento viscoelástico con la presencia de un área de histéresis. En cambio, el análisis de la viscosidad (figura 1) muestra cómo el producto obtenido es homogéneo, y el grado de reticulación está incluso dentro del producto sin presencia de coágulos o agregados, tanto macroscópicos como microscópicos.

[0084] En la misma muestra se realizó el análisis en Barrido de Amplitud que, como se muestra en la Fig. 2, muestra cómo prevalece esta característica elástica, un dato destacado por valores más altos de G' y la ausencia de un punto de cruce entre la curva de G' y G'' .

EJEMPLO 4

[0085] El producto del Ejemplo 1 se sometió a esterilización terminal por medio de autoclave durante 20 minutos a 121 °C, después del tratamiento, parece menos viscoso que el producto de partida, pero conserva algunas características reológicas que muestran una vez más cómo la característica elástica prevalece en comparación con la disipativa. También en los gráficos ilustrados en las figuras 4, 4, relativas al producto sometido a esterilización, se muestra la presencia de un área de histéresis y el valor del módulo G' más alto que G'' .

[0086] La gráfica de la curva de flujo relativa a la Velocidad de Cizallamiento $\dot{\gamma}$, ilustrada en la Fig. 5, muestra en cambio la homogeneidad perfecta del producto y cómo el producto es capaz de volver al estado inicial incluso cuando se somete a altas Velocidades de Cizallamiento $\dot{\gamma}$.

[0087] El ensayo en el Barrido de Frecuencia ilustrado en la Fig. 6, por otra parte, muestra cómo el producto disminuye su viscosidad total $|\eta^*|$ tras el aumento de la frecuencia angular ω tal como se espera por un producto viscoelástico; también debe observarse cómo el cruce de $G'-G''$ sólo tiene lugar a valores muy altos de la frecuencia angular ω , demostrando una vez más que el producto estéril no pierde sus propiedades elásticas.

EJEMPLO 5

[0088] El producto del Ejemplo 1 también es resistente a la liofilización, de hecho, el procedimiento de eliminación del agua y la posterior rehidratación permiten obtener un producto con características similares al que no se somete a liofilización.

[0089] El ensayo ilustrado en las figuras 7 y 8 muestra cómo el producto liofilizado todavía tiene valores muy altos de viscosidad, demostrando la capacidad del producto de no degradarse con la liofilización. En cuanto a la tensión de cizallamiento, por otro lado, es posible ver cómo el producto permanece en su totalidad homogéneo, pero hay áreas en las que el grado de reticulación se degrada ligeramente.

[0090] Las gráficas en el Barrido de Amplitud y el Barrido de Frecuencia notificadas en las figuras 9 y 10, con respecto al producto liofilizado del Ejemplo 1, muestran cómo el producto no experimenta un deterioro sustancial en su estructura total, pero, como se ha mencionado anteriormente, existe una ligera degradación del grado de reticulación.

[0091] El producto aparece además fácilmente esparcible y moldeable en diferentes formas dependiendo del uso objetivo. La forma en la que se conforma se mantiene en el proceso de liofilización que, como se ha descrito anteriormente, es no destructivo y es capaz de conservar las características primarias de los mismos productos.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un biopolímero biocompatible reticulado para su uso para el aumento de tejido para mejorar la apariencia estética de una característica anatómica de un individuo en el que dicho biopolímero se basa en ácido hialurónico reticulado con urea.
- 10 **2.** Un biopolímero para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el biopolímero tiene un peso molecular en el intervalo de 100.000 a 20.000.000 Dalton, o de 2.000.000 a 4.000.000 Dalton.
- 15 **3.** Un biopolímero para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el biopolímero está en forma de un hidrogel o de partículas.
- 20 **4.** Un biopolímero para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el biopolímero se inyecta o se implanta en un tejido blando de un cuerpo humano.
- 25 **5.** Un biopolímero para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, como implante o inyección subcutánea de relleno en un tejido blando del cuerpo humano para el tratamiento del envejecimiento, especialmente el envejecimiento facial.
- 30 **6.** Un método para la fabricación de un biopolímero a base de ácido hialurónico reticulado con urea, **caracterizado por que** comprende una etapa de polimerización de ácido hialurónico o una sal del mismo con urea en catálisis de ácido.
- 35 **7.** Un método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende las etapas de
 - a) disolver el ácido hialurónico o una sal del mismo, en un líquido para formar una solución que contiene ácido hialurónico,
 - b) disolver la urea en un líquido para formar una solución de urea
 - 40 c) mezclar las soluciones de ácido hialurónico y urea para obtener una mezcla o solución que tiene un pH en el intervalo de 3 a 6,8, obteniendo la reticulación del biopolímero.
- 45 **8.** Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el pH de la mezcla o la solución de la etapa c) es de 3,5 a 4.
- 50 **9.** Un método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la solución ácida de urea contiene HCl preferiblemente en una concentración en el intervalo del 20 al 30 % en peso.
- 55 **10.** Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que el ácido hialurónico disuelto en solución está en forma de sal sódica o cálcica.
- 60 **11.** Un biopolímero de aumento de relleno de tejido blando que comprende ácido hialurónico reticulado con urea para su uso como relleno dérmico para tratar el envejecimiento, especialmente el envejecimiento facial.
- 65 **12.** Un método cosmético o estético para el aumento de tejido en un sujeto que comprende la inyección en la piel del sujeto de un biopolímero a base de ácido hialurónico reticulado con urea, con la condición de que están excluidos los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia.
- 70 **13.** El método cosmético o estético de la reivindicación 12 para el tratamiento cosmético o estético de líneas, arrugas, pliegues o surcos asociados al envejecimiento facial de un sujeto que necesita un tratamiento estético.

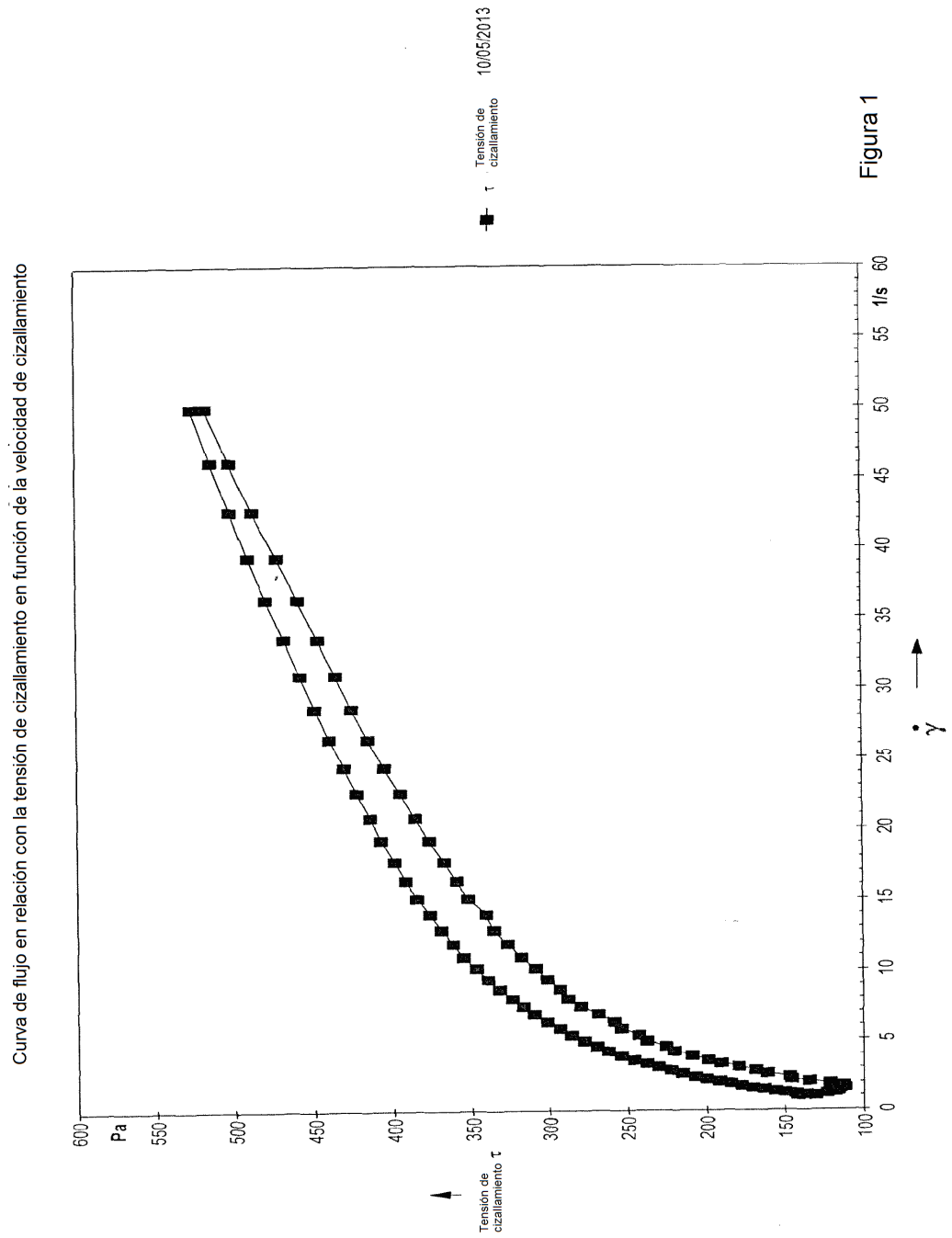


Figura 1

Curva de flujo en relación con la viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento

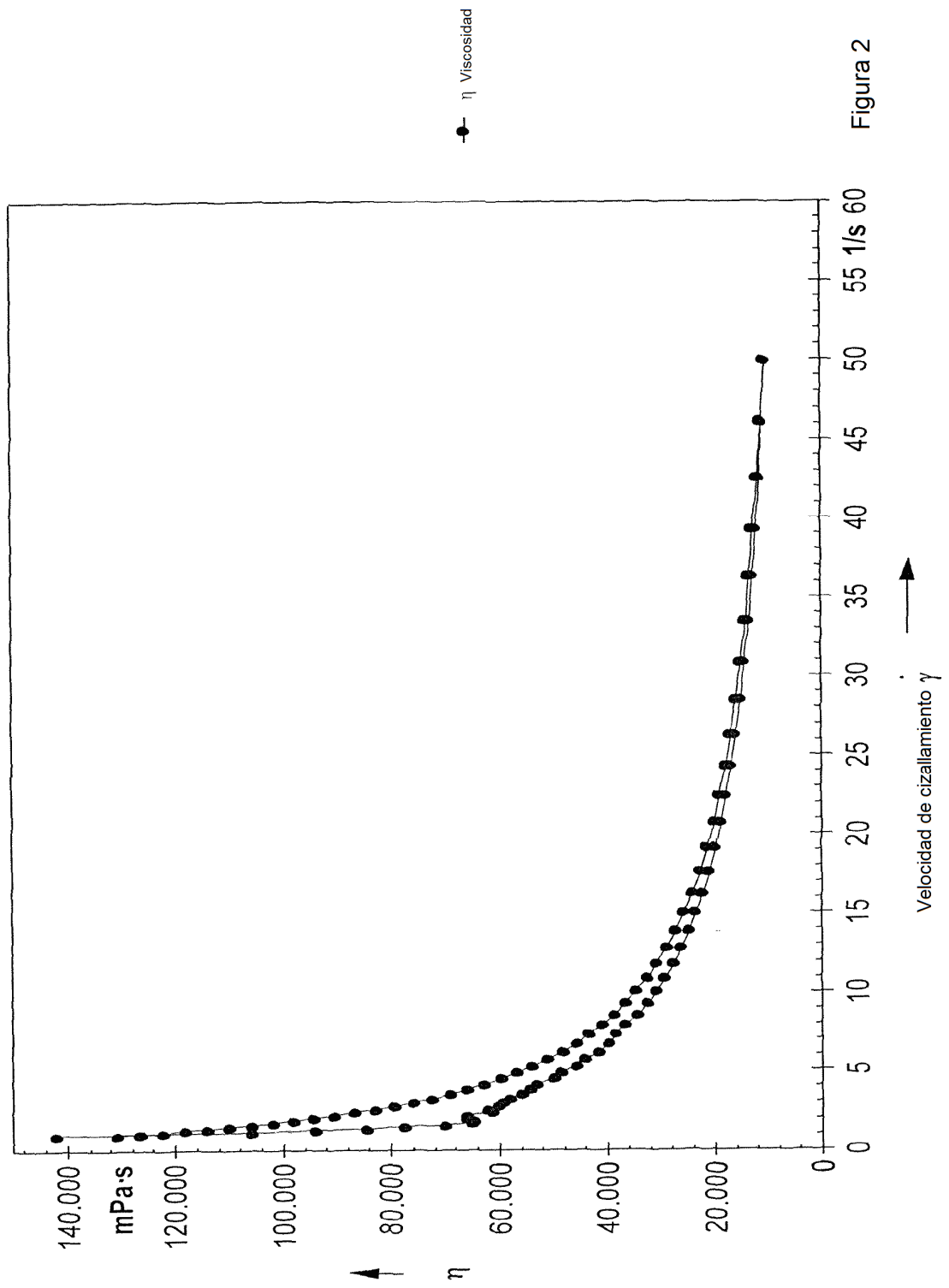


Figura 2

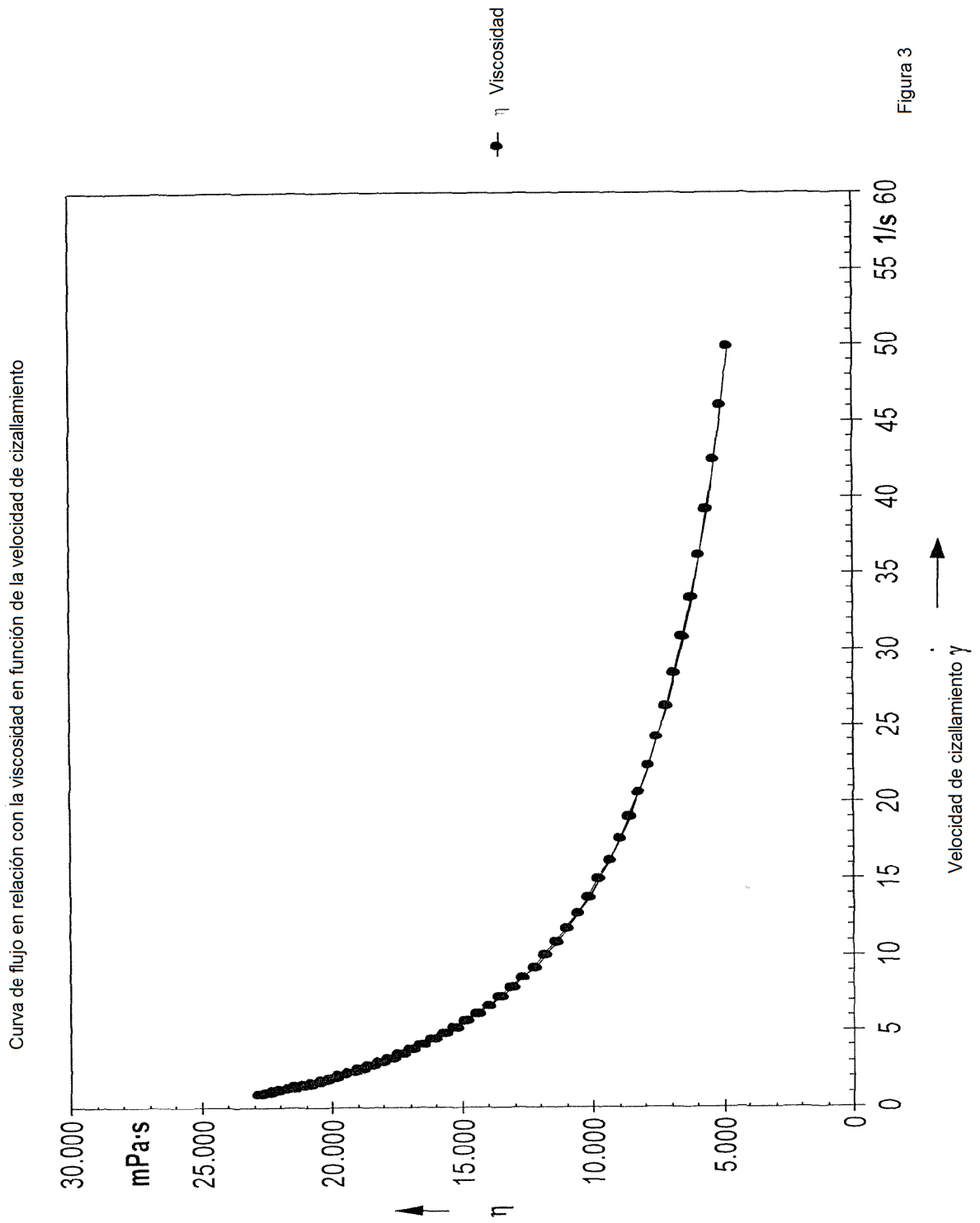


Figura 3

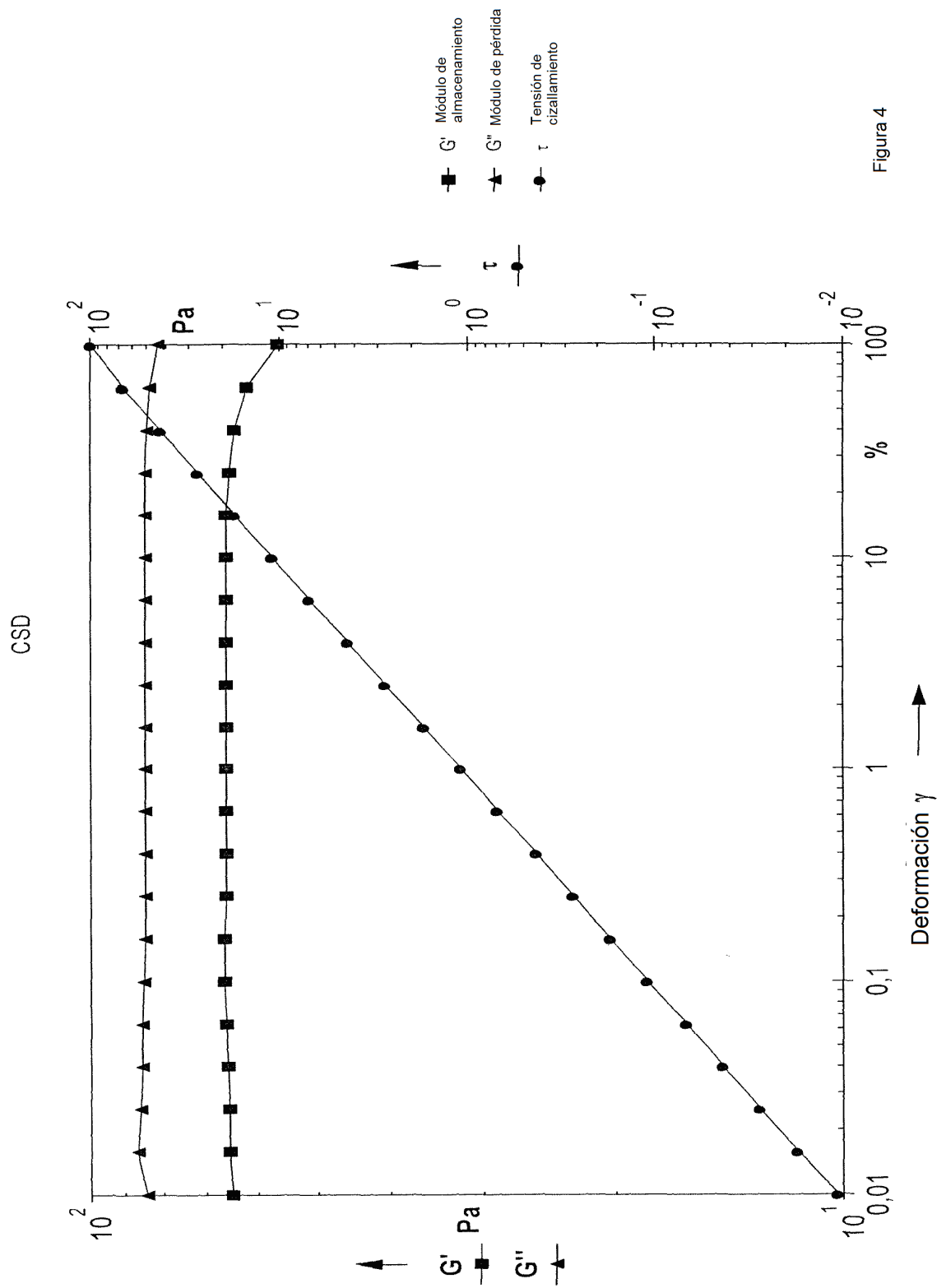


Figura 4

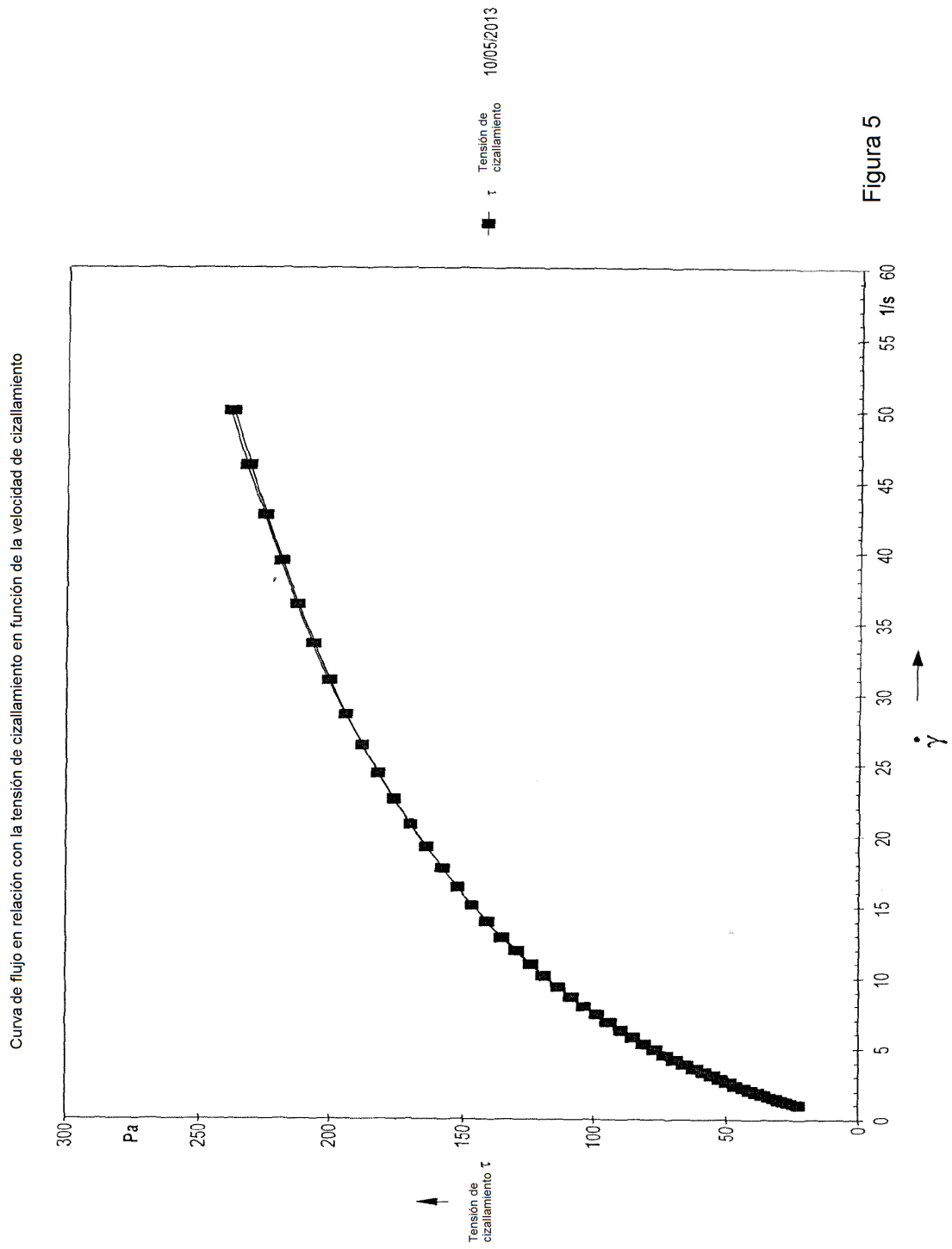


Figura 5

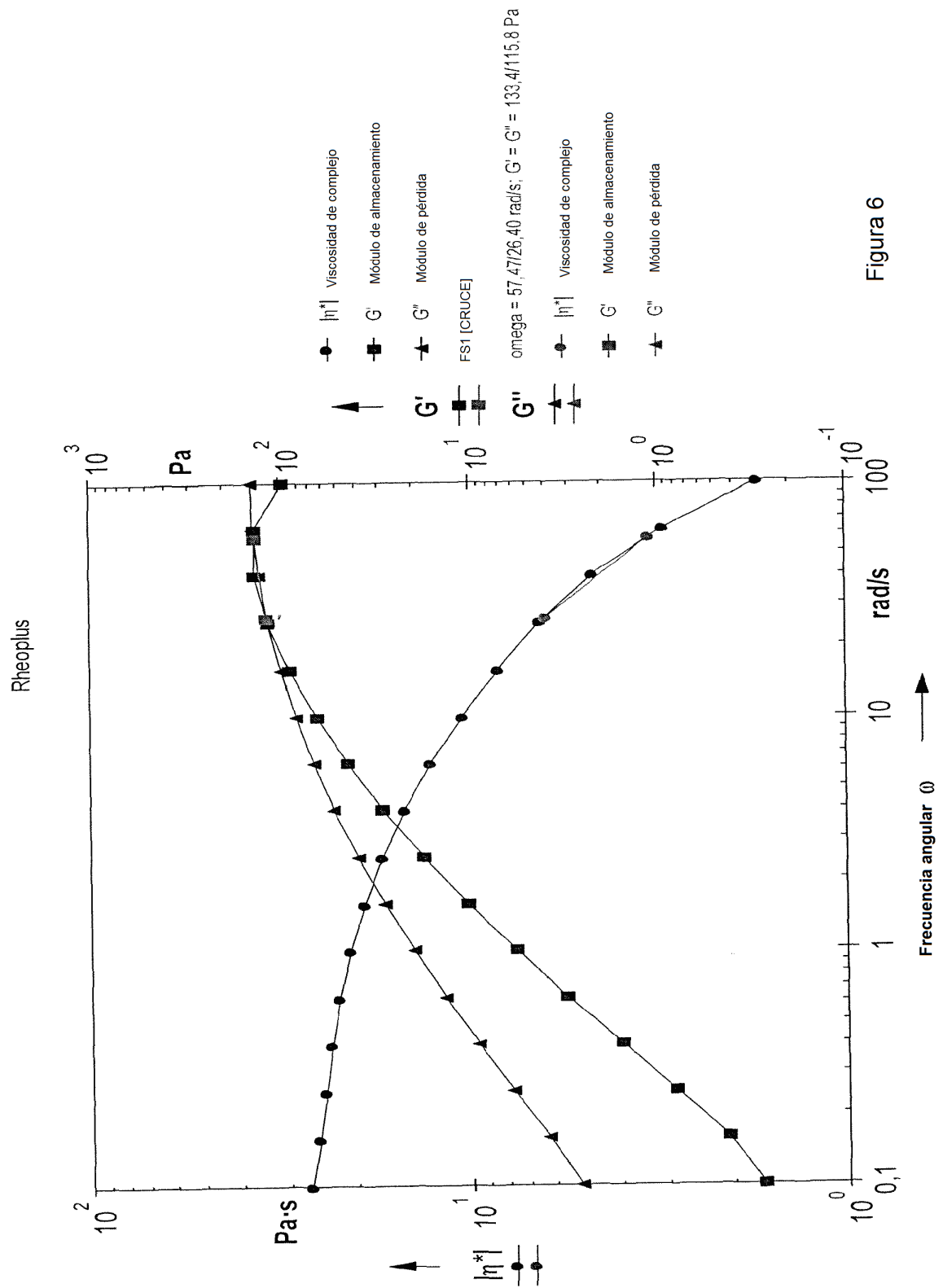


Figura 6

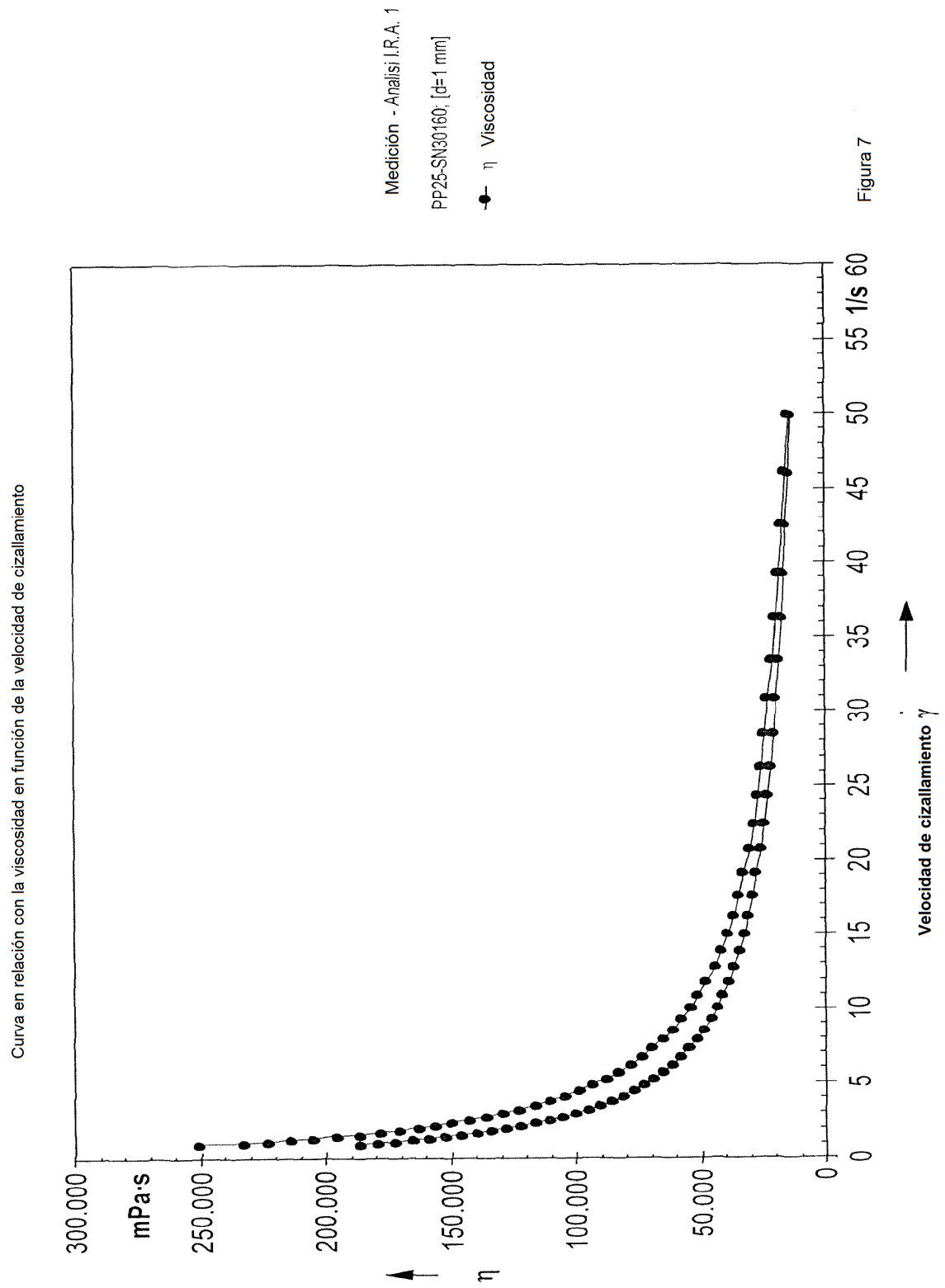


Figura 7

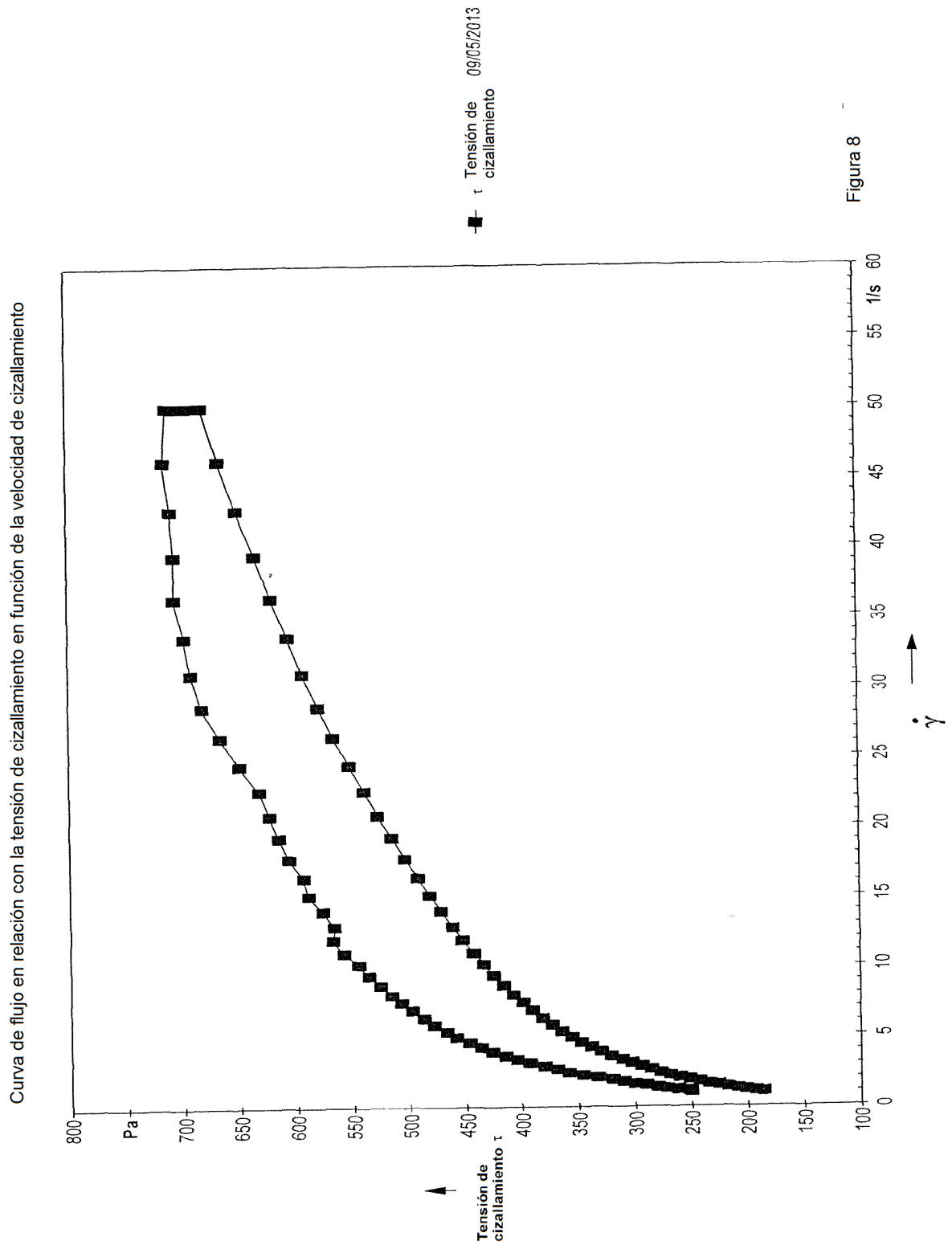


Figura 8

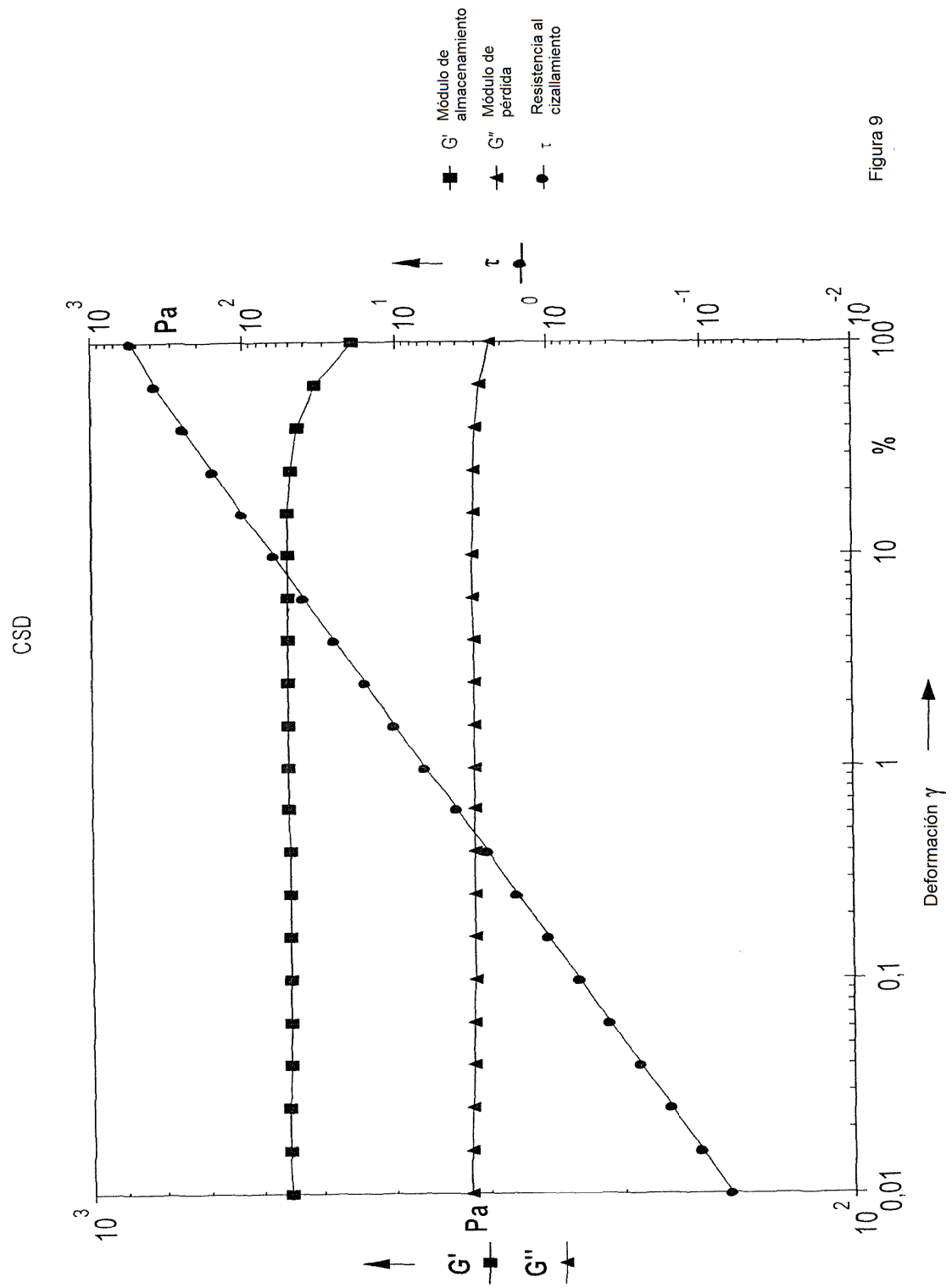


Figura 9

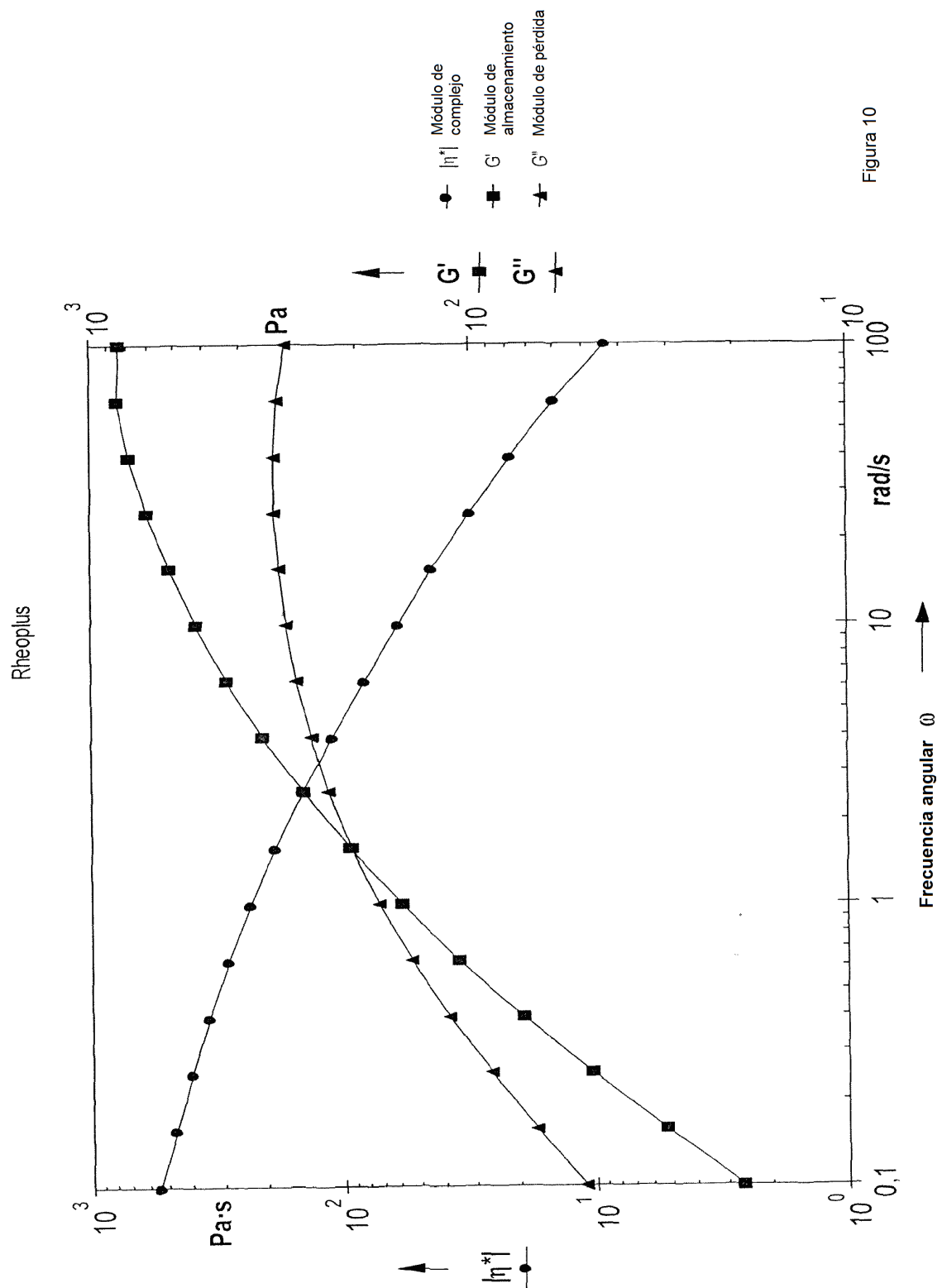


Figura 10

z