(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 636 998**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08	(2006.01)
C08J 3/075	(2006.01)
A61K 8/00	(2006.01)
A61K 9/48	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61L 15/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2005** **PCT/DK2005/000753**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2006** **WO06056204**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2005** **E 05804061 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 1817347**

(54) Título: **Método de reticulación de ácido hialurónico con divinil sulfona**

(30) Prioridad:

24.11.2004 DK 200401824

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2017

(73) Titular/es:

ALBUMEDIX A/S (100.0%)
Lottenborgvej 26
2800 Kgs. Lyngby, DK

(72) Inventor/es:

LONGIN, FANNY y
SCHWACH-ABDELLAOUI, KHADIJA

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 636 998 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

Método de reticulación de ácido hialurónico con divinil sulfona

Antecedentes

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ácido hialurónico modificado (AH), en particular AH reticulado, para uso en aplicaciones cosméticas, biomédicas y farmacéuticas.

[0002] El ácido hialurónico (AH) es un polímero de carbohidrato natural y lineal que pertenece a la clase de los glucosaminoglicanos no sulfatados. Está compuesto por beta-1, 3-N-acetil glucosamina y ácido beta-1,4-glucurónico y repite las unidades disacáridas con un peso molecular (MW) de hasta 6 MDa. El AH está presente en el cartílago hialino, líquido sinovial de las articulaciones y tejidos de la piel, tanto dermis como epidermis. El AH puede extraerse de tejidos naturales incluyendo el tejido conjuntivo de vertebrados, desde el cordón umbilical humano hasta la cresta de gallo. Sin embargo, hoy se prefiere prepararlo mediante métodos microbiológicos para minimizar el riesgo potencial de transferir agentes infecciosos, y para aumentar la uniformidad de producto, calidad y disponibilidad (WO 03/0175902, Novozymes).

[0003] Se han identificado numerosas funciones de AH en el cuerpo. Juega un importante papel en el organismo biológico, como soporte mecánico para las células de muchos tejidos, tales como la piel, tendones, músculos y cartílago. AH está implicado en procesos biológicos clave, tales como el humedecimiento de tejidos, y lubricación. También se supone que tiene un papel en múltiples funciones fisiológicas, tales como la adhesión, el desarrollo, la motilidad celular, el cáncer, la angiogénesis, y cicatrización de una herida. Debido a las propiedades físicas y biológicas únicas del AH (incluyendo viscoelasticidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad), el AH se emplea en un rango amplio de aplicaciones en desarrollo actuales dentro de cosméticos, oftalmología, reumatología, administración de fármacos, cicatrización de una herida e ingeniería de tejido. El uso de AH en algunas de estas aplicaciones está limitado por el hecho de que AH es soluble en agua a temperatura ambiente, es decir, a aproximadamente 20°C, se degrada rápidamente por hialuronidasa en el cuerpo, y resulta difícil de procesar en biomateriales. La reticulación de AH por lo tanto se ha introducido para mejorar las propiedades físicas y mecánicas del AH y su periodo de permanencia in vivo.

[0004] La patente de EEUU nº 4.582.865 (Biomatrix Inc.) describe la preparación de geles reticulados de AH solo o mezclado con otros polímeros hidrofílicos, que utilizan divinil sulfona (DVS) como el agente de reticulación. La preparación de una AH reticulada, sal del mismo, que utiliza un compuesto epóxico polifuncional se descrirbe en EP 0 161 887 B1. Otros reactivos bifuncionales o polifuncionales que se han empleado en AH reticulada a través de conexiones covalentes incluyen formaldehído (EEUU 4,713,448, Biomatrix Inc.), poliaziridina (WO 03/089476 A1, Genzyme Corp.), L-aminoacidos o ésteres de L-amino (WO 2004/067575, Biosphere S.P.A.). También se han proporcionado carbodiimidas para la reticulación de AH (EEUU 5,017,229, Genzyme Corp. EEUU 6,013,679, Anika Reasearch, Inc). Los ésteres reticulados totales o parciales de AH con un alcohol alifático, y sales de tales ésteres parciales con bases inorgánicas u orgánicas, se describen en US 4,957,744.

[0005] La solicitud de patente internacional WO86/00079A divulga un sustituto de humor vítreo destinado a usos oftalmológicos y que consiste en un gel de ácido hialurónico reticulado y en unos métodos donde el humor vítreo se ha cambiado completa o parcialmente para tal gel.

[0006] La solicitud de patente internacional WO2005/112888A divulga métodos para la preparación de hidrogeles inyectables, particularmente hidrogeles que contienen hialuronano. También se describen productos de hidrogel realizados mediante estos métodos.

Resumen de la invención

[0007] Un problema por resolver mediante la presente invención es cómo producir hidrogeles de base de agua con propiedades mejoradas, tales como una mayor homogeneidad, un aumento de suavidad, y/o una inyectabilidad más fácil.

[0008] Los geles reticulados producidos mediante el método de la invención muestran una homogeneidad aumentada y un aumento de suavidad en comparación con los hidrogeles estándar de AH reticulados con DVS. Los geles resultantes del método inmediato también son más fáciles de inyectar a través de una jeringa, como se muestra en los ejemplos.

[0009] Por consiguiente, en un primer aspecto la invención se refiere a un método que produce un hidrogel que comprende ácido hialurónico, o sal del mismo, reticulado con divinil sulfona (DVS), dicho método comprendiendo las etapas de:

(a) proporcionar una solución alcalina de ácido hialurónico, o sal del mismo;

(b) añadir DVS a la solución de la etapa (a) con agitación, donde el ácido hialurónico, o sal del mismo, está reticulado con DVS para formar un gel;
(c) tratar el gel de la etapa (b) con un tampón, donde el gel aumenta y forma un hidrogel que comprende ácido hialurónico, o sal del mismo, reticulado con DVS,

donde la temperatura de la solución en la etapa (b) se mantiene en el rango de 15°C - 30°C y luego se calienta a 35°C - 60°C y se mantiene en el rango de la temperatura de 35°C - 60°C durante un periodo de al menos 5 minutos.

[0010] En un segundo aspecto, la invención se refiere a un hidrogel que comprende ácido hialurónico, o sal del mismo, reticulado con divinil sulfona (DVS), que es suficientemente homogénea para inyectarse a partir de una jeringa de un 1 ml a través de una aguja $27G^{1}/_{2}$ sobre una distancia de 55 mm a una velocidad de 12,5 mm/min con una fuerza de inyección estable, que después de los 40 segundos iniciales de la inyección y hasta que la jeringa esté vacía, varía en no más de aproximadamente 5 Newton (N), preferiblemente no más de alrededor de 4 N, más preferiblemente 3 N, 2 N, o de la forma más preferible no más de alrededor de 1 N.

[0011] En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un hidrogel tal y como se define en el segundo aspecto, y una sustancia activa, preferiblemente la sustancia activa es un agente farmacológicamente activo.

[0012] Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye una cantidad efectiva de un hidrogel tal y como se define en el segundo aspecto, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente.

[0013] Un quinto aspecto se refiere a una composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz de un hidrogel tal y como se define en el segundo aspecto como un vehículo, junto con un agente farmacológicamente activo.

[0014] Un sexto aspecto se refiere a un artículo cosmético que comprende como una sustancia activa una cantidad eficaz de un hidrogel tal y como se define en el segundo aspecto o una composición tal y como se define en cualquiera del tercer, cuarto, o quinto aspecto.

[0015] En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un artículo sanitario, médico o quirúrgico que comprende un hidrogel como se define en el segundo aspecto o una composición tal y como se define en cualquiera del tercer, cuarto, o quinto aspecto, preferiblemente el artículo es un pañal, una compresa, una esponja quirúrgica, una esponja de cicatrización de una herida, o una parte comprendida en una tirita u otro material de vendaje de heridas.

[0016] Un aspecto importante se refiere a una cápsula o microcápsula de medicamento que comprende un hidrogel tal y como se define en el segundo aspecto o una composición tal y como se define en cualquiera del tercer, cuarto o quinto aspecto.

[0017] Un número de aspectos se refieren a usos de un hidrogel tal y como se definen en el segundo aspecto o una composición tal y como se define en cualquiera del tercer, cuarto, o quinto aspecto, para la producción de un medicamento para el tratamiento de osteoartritis, cáncer, la producción de un medicamento para un tratamiento oftalmológico, la producción de un medicamento para el tratamiento de una herida, la producción de un medicamento para angiogénesis, la producción de un medicamento para el tratamiento de pérdida capilar o calvicie, la producción de un hidratante o un cosmético, o en un tratamiento cosmético.

Definiciones

[0018] El término "ácido hialurónico" se utiliza en la literatura científica para referirse a polisacáridos ácidos con diferentes pesos moleculares constituido por residuos de D-glucurónico y ácidos de N-acetil-D-glucosamina, que se dan naturalmente en superficies celulares, en sustancias extracelulares básicas del tejido conjuntivo de vertebrados, en el líquido sinovial de las articulaciones, en el fluido endobulbar del ojo, en el tejido del cordón umbilical humano y en las crestas de gallos.

[0019] El término "ácido hialurónico" en realidad se utiliza normalmente como significado de una serie entera de polisacáridos con residuos alternantes de D-glucurónico y ácidos de N-acetil-D-glucosamina con pesos moleculares variables o incluso de fracciones degradadas del mismo, y parecería por lo tanto más correcto utilizar el término plural de "ácidos hialurónicos". El término singular se utilizará, no obstante, de la misma manera en esta descripción; además, la abreviatura "AH" se utilizará frecuentemente en lugar de este término colectivo.

[0020] "Ácido hialurónico" se define aquí como un glicosaminoglicano no sulfatado compuesto por unidades de disacáridos que se repiten de N-Acetilglucosamina (GlcNAc) que se repiten y ácido glucurónico (GlcUA) unidos

mediante enlaces glucosídicos beta-1,4 and beta-1,3 alternantes. El ácido hialurónico también se conoce como hialuronano, hialuronato, o AH. Los términos hialuronano y ácido hialurónico se utilizan de forma intercambiable aquí.

[0021] Las crestas de gallo son una fuente comercial significativa para el hialuronano. Los microorganismos son una fuente alternativa. La patente de EE.UU. nº 4.801.539 divulga un método de fermentación para la preparación de ácido hialurónico que implica una cepa de Streptococcus zooepidemicus con rendimientos proporcionados de aproximadamente 3,6 g de ácido hialurónico por litro. La patente europea nº EP0694616 divulga procesos de fermentación que utilizan una cepa mejorada de Streptococcus zooepidemicus con rendimientos proporcionados de aproximadamente 3,5 g de ácido hialurónico por litro. Como se describe en el documento WO 03/054163 (Novozymes), el cual se incorporada aquí en su totalidad, el ácido hialurónico o las sales del mismo pueden producirse de manera recombinada, p. Ej., en un huésped de Bacillus grampositivo.

[0022] Las hialuronano sintasas se han descrito a partir de vertebrados, patógenos bacterianos, y virus algales (DeAngelis, P. L., 1999, Cell. Mol. Life Sci. 56: 670-682). El documento WO 99/23227 divulga un Grupo I de hialuronato sintasa a partir de Streptococcus equisimilis. Los documentos WO 99/51265 y WO 00/27437 describen un Grupo II hialuronato sintasa a partir de Pasturella multocida. Ferretti et al. divulga el operón de hialuronano sintasa de Streptococcus pyogenes, que está compuesto por tres genes, AHsA, AHsB, y AHsC, que codifican la hialuronato sintasa, la glucosa deshidrogenasa UDP, y la UDP-glucosa pirofosforilasa, respectivamente (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98,4658-4663,2001). WO 99/51265 describe un segmento de ácido nucleico que tiene una región de codificación para un hialuronano sintasa de Streptococcus equisimilis.

[0023] Debido a que el hialuronano de una célula de Bacillus recombinante se expresa directamente al medio de cultivo, se puede utilizar un simple proceso para aislar el hialuronano desde el medio de cultivo. En primer lugar, las células de Bacillus y detrito celular se eliminan físicamente del medio de cultivo. El medio de cultivo se puede diluir primero, si se desea, para reducir la viscosidad del medio. Hay muchos métodos conocidos para aquellos expertos en el arte de la eliminación de células de un medio de cultivo, como la centrifugación o la microfiltración. Si se desea, se puede entonces filtrar el sobrenadante restante, por ejemplo por ultrafiltración, para concentrar y eliminar las pequeñas moléculas del hialurano. La siguiente eliminación de células y detrito celular, una simple precipitación del hialuronano desde el medio se realiza mediante mecanismos conocidos. Se pueden utilizar sal, alcohol, o combinaciones de sal y alcohol para precipitar el hialuronano desde el filtrado. Una vez reducido para un precipitado, el hialuronano puede aislarse fácilmente de la solución por medios físicos. El hialuronano puede secarse o concentrarse de la solución de filtrado mediante el uso de técnicas evaporativas conocidas por la técnica, tales como la liofilización o el secado por atomización.

Células huésped

[0024] Una forma de realización preferida se refiere al método del primer aspecto, donde el ácido hialurónico o sal del mismo se produce de manera recombinada, preferiblemente por una bacteria grampositiva o célula huésped, más preferiblemente por una bacteria del género *Bacillus*.

[0025] La célula huésped puede ser cualquier célula de *Bacillus* adecuada para producción recombinante de ácido hialurónico. La célula huésped de *Bacillus* puede ser una célula *Bacillus* de tipo salvaje tipo o un mutante del mismo. Las células de Bacillus útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no están limitatas a, las células de *Bacillus agaraderhens*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*. Las células mutantes *Bacillus* subtilis particularmente adaptadas para expresión recombinante se describen en el documento WO 98/22598. Las células de Bacillus no encapsuladas son particularmente útiles en la presente invención.

[0026] En una forma de realización preferida, la célula huésped de Bacillus es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o de *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus clausii*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula *Bacillus lentus*. En otra forma de realización más preferida, La célula de Bacillus es una célula de *Bacillus licheniformis*. En otra forma de realización más preferida, la célula de Bacillus es una célula de *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la célula huésped de Bacillus es *Bacillus subtilis* A164?5 (ver patente de EE.UU. nº 5.891.701) o *Bacillus subtilis* 168□Δ4.

Peso molecular

[0027] El contenido de ácido hialurónico puede determinarse según el método de carbazol modificado (Bitter y Muir, 1962, Anal Biochem. 4: 330-334). Además, el peso molecular medio del ácido hialurónico se puede determinar mediante el uso de métodos estándar en la técnica, tales como los descritos por Ueno et al., 1988,

Chem. Pharm. Bull. 36,4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; y Wyatt Technologies, 1999, "Light Scattering University DAWN Course Manual" y "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California.

[0028] En una forma de realización preferida, el ácido hialurónico, o sal del mismo, de la presente invención tiene un peso molecular de alrededor de 10.000 a alrededor de 10.000.000 Da. En una forma de realización más preferida tiene un peso molecular de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 5.000.000 Da. En una forma de realización más preferida, el ácido hialurónico tiene un peso molecular de alrededor de 50.000 a alrededor de 3.000.000 Da.

[0029] En una forma de realización preferida, el ácido hialurónico o sal del mismo tiene peso molecular de entre el rango de entre 300.000 y 3.000.000; preferiblemente en el rango de entre 400.000 y 2.500.000; más preferiblemente en el rango de entre 500.000 y 2.000.000; y de la forma más preferible en el rango de entre 600.000 y 1.800.000.

[0030] En otra forma de realización preferida, el ácido hialurónico o sal del mismo tiene un peso molecular medio bajo en el rango de entre 10.000 y 800.000 Da; preferiblemente en el rango de entre 20.000 y 600.000 Da; más preferiblemente en el rango de entre 30.000 y 500.000 Da; aún más preferiblemente en el rango de entre 40.000 y 400.000 Da; y más preferiblemente en el rango de entre 50.000 y 300.000 Da.

Sales y AH reticulado

[0031] Una forma de realización preferida se refiere a un método del primer aspecto, que comprende una sal inorgánica de ácido hialurónico, preferiblemente hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de amonio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de zinc, o hialuronato de cobalto.

Otros ingredientes

[0032] En una forma de realización preferida, el producto producido por el método de la invención también puede comprender otros ingredientes, preferiblemente una o más sustancias activas, preferiblemente una o más sustancias activas farmacológicamente, y también preferiblemente un excipiente hidrosoluble, tal como lactosa o azúcar derivado no biológicamente.

[0033] Ejemplos no limitativos de una sustancia activa o sustancia activa farmacológicamente que se pueden usar en la presente invención incluyen vitamina(s), proteína y/o fármacos de péptido, tales como, hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento bovino, hormona del crecimiento porcino, hormona/péptido de liberación de hormona del crecimiento, factor estimulante de colonia de granulocitos, factor estimulante de colonia de macrófagos de granulocito, factor estimulante de colonia de macrófagos, eritropoyetina, hueso morfogénico, proteína, interferón o, derivado del mismo, insulina o derivado de la misma, atriopeptin-III, anticuerpo monoclonal, factor de necrosis tumoral, factor de activación de macrófago, interleucina, factor de degeneración de tumor, factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento epidérmico, activador del t-plasminógeno, factor IIV, factor IIIV, y uroquinasa.

[0034] Un excipiente hidrosoluble puede incluirse con motivo de estabilizar la(s) sustancia(s) activa(s), tal excipiente puede incluir una proteína, por ejemplo, albúmina o gelatina; un aminoácido, tal como glicina, alanina, ácido glutámico, arginina, lisina y una sal de la misma; carbohidrato tal como glucosa, lactosa, xilosa, galactosa, fructosa, maltosa, sacarosa, dextrano, manitol, sorbitol, trehalosa y sulfato de condroitina; una sal inorgánica tal como fosfato; un tensioactivo tal como TWEEN® (ICI), polietilenoglicol, y una mezcla de los mismos. El excipiente o estabilizador se puede utilizar en una cantidad que varía de 0,001 a 99% por el peso del producto.

[0035] Diferentes aspectos de la invención se refieren a varias composiciones y fármacos que comprenden, entre otros constituyentes, una cantidad eficaz del producto de AH reticulado y una sustancia activa, preferiblemente la sustancia activa es un agente activo farmacológicamente; un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente, preferiblemente un excipiente hidrosoluble, y más preferiblemente lactosa.

[0036] Una forma de realización preferida de la invención se refiere a productos o composiciones de la invención comprendidas en una pastilla efervescente, que puede de otro modo formularse como se describe en la técnica. Por ejemplo, una pastilla efervescente puede comprender ácido cítrico, bicarbonato sódico, y un oligosacárido u otro azúcar. Las pastillas efervescentes son fáciles por almacenar, y con el producto de disolución rápida de la presente invención, se disuelven rápidamente y así proporcionan unos medios ideales de administración oral.

[0037] Además, los aspectos de la invención se refieren a artículos que comprenden un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en los aspectos y formas de realización de arriba, p. ej., un artículo cosmético, un artículo sanitario, un artículo médico o quirúrgico. En un aspecto final la invención se refiere a una cápsula o microcápsula de medicamento que comprende un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en otros aspectos y formas de realización de

la invención.

Figuras

[0038] La Figura 1 ilustra la pérdida de peso de hidrogeles DVS-AH resultantes de degradación de hialuronidasa en función del tiempo. Los hidrogeles DVS-AH preparados con un paso de calentamiento ('calentados'), como se describe en el Ejemplo 2, se compararon con los hidrogeles DVS-AH que se han tratado con calor ('no calentados').
La Figura 2 muestra el curso temporal del valor de pH de un conjunto de hidrogeles de AH reticulado con DVS con proporciones o grados de la reticulación diferentes, durante el aumento en el tampón fosfato (pH=7.0), como se describe en detalle en el Ejemplo 6 debajo.
La Figura 3 muestra el módulo elástico (G'), marcado con un círculo, y la pérdida de corte o módulo viscoso (G"), marcado con un cuadrado, de dos hidrogeles AH preparados según la invención, uno preparado con una proporción de AH/DVS de 10:1 y el 6% de AH, y el otro con una proporción AH/DVS de 15:1 y 6% de AH, como se describe en detalle en el Ejemplo 7 debajo. El módulo elástico (G: círculo) del hidrogel AH/DVS 10:1 es la línea superior (eje y) en todas las frecuencias (eje x), y el módulo de pérdida de corte (G": cuadrado) del hidrogel AH/DVS 10:1 es la línea inferior, excepto en lado extremo de la mano izquierda del eje x, dónde es la línea superior.

La Figura 4 muestra la inyectabilidad de hidrogeles de AH reticulados con DVS (AH/DVS 10:1, peso) preparados siguiendo el proceso descrito en el ejemplo 2 de aquí ('new; heated'), y un hidrogel preparado según el estado de la técnica (ver patente US 4.582.865, ejemplo 1) sin calentamiento, como se describe en el ejemplo 9 debajo. El eje y muestra la fuerza de inyección en Newton, empezando en 0.0 con incrementos de 2.5, y acabando en 35.0.

La Figura 5 muestra la inyectabilidad de hidrogeles de DVS de AH reticulado (AH/DVS 15:1, peso) preparados siguiendo el proceso descrito en ejemplo 2 aquí ('nuevo; calentado'), y un hidrogel preparado según el estado de la técnica (véase la patente US 4, 582,865, ejemplo 1) sin calentamiento, como se describe en el ejemplo 9 debajo. El eje y muestra la fuerza de inyección en Newton, empezando en 0.0 con incrementos de 2.5, y acabando en 30.0.

Descripción detallada de la invención

[0039] El primer aspecto de la invención se refiere a un método para producir un hidrogel que comprende ácido hialurónico, o sal del mismo reticulado con divinil sulfona (DVS), comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) proporcionar una solución alcalina de ácido hialurónico, o sal del mismo;
(b) añadir DVS a la solución de la etapa (a), donde el ácido hialurónico, o sal del mismo, se reticula con el DVS para formar un gel;
(c) tratar el gel de la etapa (b) con un tampón, donde el gel aumenta y forma un hidrogel que comprende ácido hialurónico, o sal del mismo, reticulado con DVS.

[0040] Se ha descrito previamente cómo producir ácido hialurónico de manera recombianda en una célula huésped de *Bacillus*, véase el documento WO 2003/054163, Novozymes A/S, que está incorporado aquí en su totalidad.

[0041] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, la invención se refiere al método del primer aspecto, donde el ácido hialurónico, o sal del mismo, se produce de manera recombinada en una célula huésped de *Bacillus*.

[0042] Varias fracciones de peso molecular de ácido hialurónico se han descrito como ventajosas para usos específicos.

[0043] Una forma de realización preferida de la invención se refiere a un método del primer aspecto, donde el ácido hialurónico o sal del mismo, tiene un peso molecular medio de entre 100 y 3.000 kDa, preferiblemente entre 500 y 2.000 KDa, y de la forma más preferible entre 700 y 1.800 kDa.

[0044] La concentración inicial de ácido hialurónico, o una sal del mismo, en el método de la invención influye en las propiedades del gel reticulado resultante, y del hidrogel hinchado.

[0045] Por lo tanto, una forma de realización preferida de la invención se refiere a un método del primer aspecto, donde la solución alcalina comprende ácido hialurónico disuelto, o sal del mismo, en una concentración de entre 0.1% - 40% (p/v).

[0046] El valor de pH durante la reacción de reticulación también influye en los resultados, así en una forma de realización preferida la invención se refiere a un método del primer aspecto, donde la solución alcalina comprende hidróxido sódico disuelto en una concentración de entre 0.001 - 2.0 M.

[0047] También cabe señalar que la concentración del agente de reticulación tiene un impacto profundo en los geles resultantes.

[0048] En consecuencia, una forma de realización preferida de la invención se refiere a un método del primer aspecto, donde DVS se añade a la solución de la etapa (a) en una proporción de peso entre 1:1 y 100:1 de AH/DVS (peso en seco), preferiblemente entre 2:1 Y 50:1 de AH/DVS (peso seco).

[0049] Los inventores descubrieron que un periodo inicial de la agitación durante y/o inmediatamente después de añadir DVS a la solución de AH fue deseable para conseguir una gelificación satisfactoria.

[0050] Por consiguiente, una forma de realización preferida de la invención se refiere a un método del primer aspecto, donde se añade DVS con agitación a la solución de etapa (a), y donde la temperatura de la solución se mantiene en el rango de 5°C - 50ºC, preferiblemente en el rango de 15°C - 40°C, más preferiblemente en el rango de 20°C - 30°C; preferiblemente la agitación sigue durante un periodo de entre 1 - 180 minutos.

[0051] En otra forma de realización preferida del método del primer aspecto, el DVS se añade sin agitación a la solución de etapa (a).

[0052] Los presentes inventores determinaron que una etapa de calentamiento fue beneficiosa después de la adición de DVS a la solución.

[0053] Por consiguiente, una forma de realización preferida de la invención se refiere a un método del primer aspecto, donde la temperatura de solución en la estapa (b) se calienta a una temperatura en el rango de 20°C - 100°C, preferiblemente en el rango de 25°C - 80°C, más preferiblemente en el rango de 30°C - 60°C, y de forma más preferible en el rango de 35°C - 55°C, y donde la temperatura se mantiene en este rango durante un periodo de al menos 5 minutos, preferiblemente al menos 10 minutos, 20 minutos, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, o de forma más preferible al menos 180 minutos; preferiblemente sin agitación.

[0054] Resulta ventajoso dejar el gel en reposo a temperatura ambiente durante un periodo breve después de que haya tenido lugar la reacción de reticulación.

[0055] En una forma de realización preferida del método del primer aspecto, el gel se mantiene durante un periodo de al menos 5 minutos, preferiblemente al menos 10 minutos, 20 minutos, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, o de la forma más preferible al menos 180 minutos, a una temperatura en el rango de 0°C - 40°C, preferiblemente en el rango de 10°C - 30°C.

[0056] Muchos tipos de tampones, como bien conocen los expertos, se han previsto como adecuados para el hinchamiento y la neutralización del gel reticulado de la invención. En una forma de realización preferida el tampón comprende un tampón con un valor de pH en el rango de 2.0 - 8.0, preferiblemente en el rango de 5.0 - 7.5.

[0057] Óptimamente, se elige un tampón adecuado con un valor de pH, que da como resultado que el hidrogel hinchado tenga un valor de pH lo más cerca posible a neutro. En una forma de realización preferida, el tampón comprende un tampón con un valor de pH, que da como resultado que el hidrogel tenga un valor de pH entre 5,0 y 7,5.

[0058] Se prefiere que el tampón en el método del primer aspecto comprenda un tampón de fosfato y/o un tampón de solución salina.

[0059] En la etapa de hinchamiento el tampón debe tener suficiente volumen para tener capacidad para el gel en hinchamiento hasta que este esté completamente hinchado. Por consiguiente, en una forma de realización preferida del método del primer aspecto, el tampón en la etapa (c) tiene un volumen de al menos 3 veces el volumen del gel de la etapa (b).

[0060] En una forma de realización del método del primer aspecto preferida, el hinchamiento en la etapa (c) se realiza a una temperatura de entre 20°C - 50°C durante un periodo de al menos 5 minutos, preferiblemente al menos 10 minutos, 20 minutos, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, o más preferiblemente al menos 180 minutos.

[0061] También es preferible que el hidrogel formado en la etapa (c) se lave al menos una vez con agua, agua y un tampón fosfato, agua y un tampón de solución salina, o agua y un tampón de fosfato y un tampón de solución salina, con un valor de pH en el rango de 2.0 - 8.0, preferiblemente en el rango de 5.0 - 7.5.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de hidrogeles de AH reticulados con DVS.

[0062] Este ejemplo ilustra la preparación de hidrogeles de AH reticulados con DVS con hinchamiento concomitante y ajuste de pH.

[0063] Se disolvió hialuronato de sodio (AH, 770 kDa, 1 g) en 0,2M NaOH para dar una solución de 4% (p/v), que se agitó a temperatura ambiente, es decir aproximadamente a 20°C, durante 1 h. Se prepararon tres réplicas. Después se añadió divinil sulfona (DVS) a las soluciones de AH en cantidad suficiente para dar proporciones de peso de AH/DVS de 10:1,7:1, y 5:1, respectivamente. Las mezclas se agitaron a temperatura ambiente durante 5 min y luego se dejaron a la temperatura ambiente durante 1 hora. Los geles se hincharon en un tampón de fosfato de 160 mL (pH 4.5 o 6.5) durante 24 horas, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1: Condiciones para la preparación del hidrogel de AH-DVS.

Gel ID	Proporción de peso de AH/DVS	Tampón de fosfato usado para el hinchamiento
1	5:1	160 ml (pH 4.5)
2	7:1	80 ml (pH 4.5) + 80 ml (pH 6.5)
3	10:1	160 ml (pH 6.5)

[0064] El pH de los geles se estabilizó durante la etapa de hinchamiento. Después del hinchamiento, cualquier tampón en exceso se quitó mediante filtración y los hidrogeles se homogeneizaron brevemente con un homogeneizador de IKA® ULTRA-TURRAX® T25 (Ika Labortechnik, DE). El volumen y pH de los geles se midió (véase Tabla 2).

Tabla 2: Características de los hidrogeles de AH-DVS

ID Gel	Proporción de peso de HA/DVS	Volumen del gel hinchado	Concentración del AH (p/v)	pH	Apariencia	Suavidad
1	5:1	70 mL	1,4%	7,1	Transparente, homogéneo	+
2	7:1	70 mL	1,4%	7,6	Transparente, homogéneo	++
3	10:1	70 mL	1,4%	7,5	Transparente, homogéneo	+++

[0065] El pH de los hidrogeles osciló de entre 7.1 a 7.6 (tabla 2), lo que confirma que la etapa de hinchamiento se puede utilizar para ajustar el pH en este proceso. Todos los hidrogeles ocuparon un volumen de 70 mL, lo que corresponde a una concentración de AH de aprox. 1.4% (p/v). Eran transparentes, coherentes y homogéneos. La blandura aumentó al disminuir el grado de reticulación (Tabla 2).

Ejemplo 2 - Preparación de hidrogeles de AH reticulados con DVS homogéneos

[0066] Este ejemplo ilustra la preparación de hidrogeles de AH reticulados con DVS altamente homogéneos.

[0067] Se disolvió hialuronato de sodio (770 kDa, 2 g) en 0,2M NaOH con la agitación durante aprox. 1 hora a temperatura ambiente para dar una solución de 8% (p/v). Entonces se añadió DVS de modo que la proporción de peso de AH/DVS fue 7:1. Después de la agitación a temperatura ambiente durante 5 min, una de las muestras se trató con calor a 50°C durante 2 h sin agitación, y después se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. El gel reticulado resultante se hinchó en 200 ml de tampón de fosfato (pH 5.5) a 37 °C durante 42 o 55 horas, y finalmente se lavó dos veces con 100 ml de agua, que se desechó. Se midieron el volumen y el pH, además de la fuerza de presión necesaria para empujar los geles a través de una aguja de inyección 27G*$^{1}/_{2}$ (véase la Tabla 3).

Tabla 3. Características de hidrogeles de AH reticulados con DVS.

ID del gel	Tratado con calor	Volumen del gel hinchado	Concentración del AH (p/v)	pH	Apariencia	Suavidad	Estabilidad de la fuerza de presión durante la inyección
1	Sí	145 mL	1.4%	6,1	Transparente, homogéneo	+++	+++
2	No	90 mL	1.1%	6,7	Transparente, homogéneo	+	+

El hidrogel de HA reticulado preparado según este ejemplo mostró una proporción de hinchamiento mayor y una suavidad aumentada en comparación con un hidrogel de control que no se trató con calor (Table 3). La fuerza de presión aplicada durante la inyección a través de una aguja de 27 *$^1/_2$ fue más estable que la última muestra, indicando que el hidrogel de AH reticulado es más homogéneo.

Ejemplo 3 - Bioestabilidad de hidrogeles de AH reticulados con DVS

[0068] Este ejemplo ilustra la bioestabilidad in vitro de hidrogeles de AH reticulados con DVS usando una degradación enzimática.

[0069] Se preparó una solución (100 U/mL) de hialuronidasa de testículos bovinos (AHase) en 30 mM de ácido cítrico, 150 mM Na_2HPO_4, y 150 mM NaCl (pH 6.3). Las muestras de hidrogel reticulado de AH y DVS (ca. 1 ML) se colocaron en viales de plástico con cerraduras de seguridad, se liofilizaron, y se pesaron (P_0; Fórmula 1). La solución enzimática (4 mL, 400 U) se añadió entonces a cada muestra y los viales se incubaron a 37 °C bajo agitación suave (100-200 r.p.m.). A intervalos de tiempo predeterminados, se quitó el sobrenadante y las muestras se lavaron íntegramente con agua destilada para eliminar sales residuales, después se liofilizaron, y finalmente se pesaron. (P_t; fórmula 1).

[0070] La biodegradación se expresa como la proporción de pérdida de peso respecto al peso inicial de la muestra (Fórmula 1). La pérdida de peso se calculó a partir de la reducción de peso de cada muestra antes y después de la prueba de degradación enzimática. Cada experimento de biodegradación se repitió tres veces.

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{W0 - Wt}{W0} \times 100$$

Fórmula 1:

[0071] Los resultados que se muestran en la tabla 4, al igual que en la figura 1, ilustran la pérdida de peso de los hidrogeles de AH y DVS resultantes a partir de la degradación de hialuronidasa en función del tiempo. Los hidrogeles de AH y DVS preparados como se describe en el ejemplo 2 ('Heated') se compararon con hidrogeles de AH-DVS que no habían sido tratados ('no calentados'). Para ambos tipos de gel, la degradación fue rápida durante las primeras cuatro horas, y luego se procedió de manera más lenta hasta la finalización a las 24 horas. De manera importante hubo una significante variación de los valores de pérdida de peso para las muestras que AH que no se calentaron en comparación con el hidrogel preparado con una etapa de calentamiento como se describe en el ejemplo 2. Este ilustra claramente que un hidrogel de AH con DVS reticulado altamente homogéneo se obtiene utilizando el proceso que se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 4 - Preparación de emulsiones de agua en aceite para cosméticos

[0072] En este y en el siguiente ejemplo, los hidrogeles de AH reticulados con DVS se formularon en cremas y serums, que cuando se aplican a la piel aumenta la hidratación cutánea y la elasticidad, y proporcionan un efecto anti-envejecimiento inmediato, así como un efecto filmógeno.

[0073] Una fórmula típica de una emulsión de agua en aceite (w/o) contiene un 2% de AH reticulado con DVS. Cada fase (A a E) se preparó de forma separada mezclando los ingredientes definidos (véase la Tabla 4). La fase B se añadió después a fase A bajo agitación con un dispositivo agitador de impulso mecánico y a una temperatura menor de 40°C. La fase C se añadió seguida por la fase D y finalmente fase E bajo agitación. También se realizaron fórmulas, donde la concentración de hidrogel de AH era de 4%, 6% y 8%, respectivamente, en la fase D, para dar un rango de fórmulas de agua en aceite (w/o).

Tabla 4.

Fase	Ingrediente	Proporción (p/p)	Función
A	Ciclopentasiloxano, dimeticona	10%	Emoliente
	Ciclopentasiloxano	15%	Emoliente
	Ciclopentasiloxano y PEG/PPG-20/15 dimeticona	4%	Emulsionante
	Polideceno hidrogenado	8%	Emoliente
B	Agua	49,3%	
	Cloruro de sodio	0,2%	
C	Acetato de tocoferol	0,5%	Antioxidante
D	**Hialuronato de sodio reticulado con DVS**	2%	
	Agua	10%	

E	Fenoxietanol, etilhexilglicerina	1%	Conservante

[0074] Otra formulación típica de una emulsión de agua en aceite que contiene un 2% de AH de DVS reticulado se muestra en la tabla 5. Cada fase (A a F) en la tabla 5 se preparó de manera separada mezclando los ingredientes definidos (ver Tabla 5). La Fase B se mezcló con la fase A y la fase oleosa resultante se calentó a 75°C. La fase C también se calentó a 75°C. La fase oleosa se añadió a la fase C bajo un aparato agitador con propulsión mecánica. Luego se enfrió la emulsión a menos de 40°C, después de que se añadiera la fase D, seguido de la fase E y finalmente la fase F bajo agitación. También se realizaron fórmulas, donde la concentración de hidrogel de AH fue de 4%, 6% y 8%, respectivamente, en la fase E, para dar un rango de fórmulas de agua en aceite.

Tabla 5.

Fase	**Ingrediente**	**Proporción (p/p)**	**Función**
A	Polideceno hidrogenado	18%	Emoliente
	Acrilatos/C10-30 polímero cruzado de acrilato de alquilo	1%	Espesante
B	Sodio cocoil glutamato	10%	Emulsionante
C	Aqua	53,5%	
	Fosfato de dialmidón	2	Agente de textura
D	Tocoferil acetato	0,5%	Antioxidante
	Ciclopentasiloxano, dimeticona	2%	Agente de extensión y sensación
E	Hialuronato de sodio reticulado	2%	
	Aqua	10%	
F	fenoxietanol, etilhexilglicerina	1%	Conservante

Ejemplo 5 - preparación de serums de silicona

[0075] Una formulación típica de sérum de silicona que contiene 2% de AH reticulado con DVS se preparó como se muestra en la tabla 6. Todos los ingredientes se mezclaron al mismo tiempo bajo agitación muy alta y a menos de 40°C (véase la tabla 6). También se prepararon fórmulas, donde la concentración de hidrogel de AH era de 4%, 6% y 8%, respectivamente, para dar un rango de serums.

Tabla 6.

Ingrediente	Proporción (p/p)	Función
Ciclopentasiloxano Polímero cruzado de alquil cetearil dimeticona C30-45	60%	Línea efecto de ofuscación, espesante, vehículo
Ciclopentasiloxano	34.5%	vehículo, emoliente
Polimetilsilsesquioxano	2.5%	sensación de granulado blando
Hialuronato de sodio reticulado	**2%**	
Fenoxietanol, etilhexilglicerina	1%	Conservante

Ejemplo 6 - Equilibrado de pH durante el aumento; estudio de cinética

[0076] Un estudio de cinética mostró que lo hidrogeles de AH reticulados con DVS con pH neutro se obtienen después del hinchamiento en el tampón de fosfato (pH 7.0) durante de 8 a 14 horas, dependiendo del grado de reticulación. Un conjunto de hidrogeles de AH reticulados con DVS se prepararon como se describió anteriormente, q utilizando una solución de AH de 4 a 8%, y usando varias cantidades del reticulador DVS, como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7.

Entrada	Concentración de AH inicial (p/v)	Ratio en peso de AH/DVS
1	4%	2.5:1
2	6%	15:1
3	8%	15:1
4	6%	10:1

[0077] A intervalos regulares (cada 2 horas), los hidrogeles se quitaron durante el tratamiento térmico y se decantaron, y se midió el pH (véase la Figura 2). Se usó un tampón de hinchamiento fresco después cada

medición.
Los resultados muestran que, para todos hidrogeles, el pH oscila entre 11 y 12 después de 2 horas de hinchamiento. Después el pH dismunuyó gradualmente a 7.2-7.5.

[0078] La reducción fue más rápida para los hidrogeles que estaban menos reticulados, es decir, donde el ratio de AH/DVS era más alta. Se muestra la reducción en el pH con respecto a la solución de 6% de AH y dos proporciones diferentes de AH/DVS en la figura 2, donde el ratio de AH/DVS de 10:1 se marca con triángulos, y 15:1 se marca con cuadrados. En estos dos casos, el pH se neutralizó en 8 horas. En cambio, se alcanzó el pH neutro después de 14 horas de hinchamiento para hidrogeles con una alta concentración de AH (p. ej. 8%) o un grado más alto de la reticulación (p. ej. ratio de AH/DVS de 2,5). Estas observaciones están de acuerdo con el hecho de que las moléculas de AH en hidrogeles de baja reticulación muestran mayor libertad y flexibildad, permitiendo una buena hidratación y por lo tanto un equilibro del pH más rápido.

Ejemplo 7 - Propiedades viscoelásticas de hidrogeles basados en AH reticulado con DVS

[0079] Las mediciones reológicas se realizaron en un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Ostfildern, Alemania) utilizando una geometría de placa a placa y a una temperatura controlada de 25°C. El comportamiento viscoelástico de las muestras se investigó mediante pruebas oscilatorias de corte de amplitud dinámica, donde el material se sometió a una fuerza de cizallamiento sinusoidal. En primer lugar, se realizaron experimentos de barrido de deformación/amplitud para evaluar la región de deformación en la que es válida la viscoelasticidad lineal. La fuerza normalmente oscila entre 0.01 y 200% y la frecuencia se estableció en 1 Hz. Después, en las regiones viscoelásticas lineales, el módulo de almacenamiento de corte (o módulo elástico G') y los valores del módulo de pérdida de corte (o módulo viscoso, G") se registraron a partir de unos experimentos de barrido de frecuencia a una deformación por esfuerzo cortante (10%) y a una frecuencia de entre 0,1 y 10 Hz. La geometría, el NF y el espacio eran PP 25, 2 y 1 mm, respectivamente.

[0080] G da información acerca de la elasticidad o la energía almacenada en el material durante deformación, mientras que G" describe el carácter viscoso o la energía disipada como calor. En particular, el módulo elástico da información acerca de la capacidad de la muestra para sostener la carga y regresar a la configuración inicial después una tensión impuesta o deformación. En todos los experimentos, cada muestra se midió al menos tres veces.

[0081] Los resultados (Figura 3) mostraron que para ambos hidrogeles:

• G'>G" y
• G' es casi independiente de la frecuencia.

[0082] En caso de que el hidrogel con mayor grado de reticulación (es decir un ratio menor de AH/DVS: 10/1) G' sea una orden de magnitud superior a G", indica que esta muestra se comporta como un material de gel fuerte. Brevemente, la respuesta reológica general se debe a las contribuciones de reticulaciones físicas y químicas, y a interacciones topológicas entre las macromoléculas de AH. Las interacciones entre las cadenas provocan una reducción de su movilidad intrínseca que no es capaz de liberar la tensión, y consecuentemente el material se comporta como una red tridimensional, donde el modo principal de ajuste de la tensión aplicada es mediante deformación de red. Además, este hidrogel era más elástico que aquel con un grado inferior de reticulación (es decir un ratio mayor de AH/DVS: 15:1). De hecho, cuanto mayor es el número de reticulaciones permanentes covalentes, mayor es el número de entrelazamientos, y por lo tanto mayor respuesta elástica del hidrogel.

Ejemplo 8 - Parámetros estructurales de red

[0083] En este experimento, las propiedades viscoelásticas se evaluaron en un reómetro rotatorio (Gemini, Bohlin Instruments, UK) utilizando una geometría de placa paralela (PP30 cell). Las pruebas se efectuaron a la temperatura controlada de 25°C utilizando un baño termostático. Para evitar la evaporación de agua, la humedad de la cámara con las muestras se controló mediante un accesorio de control de humedad.

[0084] Los hidrogeles se sometieron a una oscilación periódica en un experimento dinámico (pruebas de barrido de frecuencia de amplitud pequeñas) para evaluar la dependencia de los módulos elásticos y viscosos, G' y G". El rango de frecuencias fue 0.01 Hz – 10 Hz. Para identificar el rango de respuesta viscoelástica lineal de los materiales, se realizaron pruebas preliminares de barrido de tensión en las muestras a la frecuencia de oscilación de 1 Hz. Las pruebas se repitieron al menos tres veces en cada muestra.

[0085] Los valores del módulo elástico pueden utilizarse para estimar el parámetro de la estructura de red.
Como G es proporcional al número de entrelazamientos (Ferry; 1980), el módulo elástico se puede expresar a través de:

Fórmula 2:

$$G \cong R \cdot T \cdot z$$

[0086] Donde RT es la energía térmica, y z es el número de los puntos de entrelazamientos o punto de reticulación expresado en mole/volumen. El parámetro z se puede calcular por:

Fórmula 3:

$$z \approx \frac{c}{M_e}$$

[0087] Donde c es la concentración polimérica, y M_e es el peso molecular medio de los segmentos poliméricos entre dos entrelazamientos. Substituyendo en la fórmula 2, M_e se puede estimar por la ecuación siguiente:

Fórmula 4:

$$M_e \cong \frac{R \cdot T \cdot c}{G}$$

[0088] Para calcular G mediante la Fórmula 4, se supuso la validez de la teoría de la elasticidad de caucho y se supuso que una red de material de tipo gel se comportaba como lo hace el caucho vulcanizado después del estímulo de una escala temporal más corta que el tiempo vital de la red de entrelazamiento (Flory, 1953). Los "extremos pendientes", que son los segmentos de cadena polimérica unidos a la red por solo un punto de entrelazamiento, no contribuyen al valor G porque no pueden almacenar energía elástica. Por tanto, se necesita una corrección en la Fórmula 4 (Flory, 1953):

Fórmula 5:

$$G \cong \frac{R \cdot T \cdot c}{M_d}\left(1 - 2\frac{M_d}{M_n}\right)$$

[0089] Donde Mn es el número de peso medio molecular. Si se usa el modelo equivalente de red o "modelo de red equivalente" (Schurz; 1991), es posible estimar el DN, que es la distancia media entre los puntos de entrelazamientos en una "red equivalente" idealizada:

Fórmula 6:

$$D_N = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot M_d}{\pi \cdot c \cdot A}}$$

[0090] Donde A es un número de Avogrado.

[0091] Los resultados de D_N y M_d se declaran en la tabla 8. Se puede apreciar que el Md mayor (248120 g/mol) y el Dn mayor Dn (46 nm) se obtienen para la muestra 1. La muestra 2 tuvo el valor de Md más bajo (204000) y un valor de Dn de 43,5 nm. Las muestras 3 y 4, que tienen el mismo módulo elástico, se caracterizan por Md de 240000 g/mol y Dn de 42 nm.

Tabla 8. Parámetros de red para hidrogeles de DVS-HA. (a) Durante el hinchamiento; (b) Valor del módulo elásctico a 0,1 Hz.

ID de la muestra	**Conc. Inicial de AH (p/v)**	**Ratio de peso de AH/DVS**	**Concentración de tampón de fosfato**	***G' [Pa]b***	**Concentración de AH (g/l)**	***Md (g/mol)***	***D_N (nm)***
1	4%	2,5:1	50 mM	11	8	248120	46
2	6%	10:1	50 mM	27.7	7.8	204000	43.5
3	4%	1,5:1	150 mM	18	10	238000	42
4	6%	10:1	150 mM	18	10.7	240700	41.5

Ejemplo 9 - Inyectabilidad de hidrogeles de AH reticulados con DVS

[0092] La inyectabilidad de los hidrogeles de AH reticulados con DVS preparados según la presente invención se comparó con la de esos hidrogeles preparados según el estado de la técnica, p. ej., como en el ejemplo 1 de la Patente US No 4.582.865.

[0093] La inyectabilidad se midió en un analizador de textura (Stable Micro Systems, TA. XT Plus) como la fuerza (en N) necesaria para inyectar el hidrogel a través de una aguja $27G^1/_2$ sobre una distancia de 55 mm a una velocidad de 12.5 mm/min. Las muestras de hidrogel se transfirieron a una jeringa de 1 mL equipada con una aguja $27G^1/_2$ y la jeringa se colocó en el soporte. Se midió cada muestra tres veces. Las figuras 4 y 5 ilustran la inyectabilidad de hidrogeles de AH reticulados con DVS con los ratios de peso de AH/DVS de 10:1 y 15:1, respectivamente.

[0094] Los perfiles de inyección registrados en las figuras 4 y 5 son característicos de la homogeneidad de la muestra. De hecho, cuanto más estable sea la fuerza de inyección aplicada, más homogéneo es el hidrogel. Además, una fuerza baja corresponde a una inyección fácil del hidrogel por el operador.

[0095] Los resultados indicaron claramente que los hidrogeles de AH de DVS producidos según el proceso aquí descrito eran mucho más homogéneos que aquellos obtenidos a partir del método del estado de la técnica. Nótese que las muestras del estado de la técnica tenían que homogeneizarse mecánicamente para que estos fueran completamente inyectables. Esta homogeneización creó pequeñas partículas, la presencia de las cuales lleva a perfiles de inyección muy irregulares.

[0096] Además, los hidrogeles reticulados preparados según la presente invención eran más fáciles de inyectar a través de una aguja fina, como demostró la fuerza inferior requerida. Cabe destacar que la fuerza de inyección aumenta con un grado en aumento de la reticulación debido a la formación de una red más fuerte.

Ejemplo 10 - Fórmulas de hidrogeles reticulados de AH-DVS para oftalmología local

[0097] En la tabla 9 se muestra una fórmula típica de una solución de gotas de ojos de 500 mL que contiene un 1% (p/v) de AH reticulado con DVS. Todos los ingredientes se pesaron y transfirieron a un matraz aforado de 500 mL. Se añadió agua (300 mL) y después se removió la mezcla a temperatura ambiente durante 5 horas. Se ajustó el pH a 7.2 con 2M NaOH y el volumen se ajustó a exactamente 500 mL con agua de milliQ.

Tabla 9

Ingrediente	Cantidad	Función
Hialuronato de sodio reticulado	5g	intensificador de viscosidad lubricante Agente hidratante/de hidratación
Sodio etileno diamina tetra acetato (EDTA)	50 mg	Agente quelante
Sodio dihidrógeno fosfato dihidrato ($NaH_2PO_4,2H_2O$)	20 mg	Tampón
Disodio hidrógeno fosfato dihidrato ($Na_2HPO_4,2H_2O$)	140 mg	Tampón
Cloruro sódico	4,5g	
Biguanida de poliaminopropil (PHMB)	3.25 microL	Conservante
Agua milli-Q	Hasta 500 mL	

Ejemplo 11 - Hidrogel reticulado de AH/DVS con conservantes

[0098] Se preparó un hidrogel de AH reticulado con DVS utilizando 1,5 g de AH de sodio en 0,2 M NaOH para dar una solución de 6% (p/v). La proporción de peso de AH/DVS fue 10:1. El hidrogel se preparó en tres réplicas según el procedimiento descrito en ejemplo 2 hasta la etapa de hinchamiento, después de lo cual se trató como sigue: tras la incubación en un horno a 50°C durante dos horas, el hidrogel se sumergió en un tampón de Na2HPO4/NaH2PO4 (1 L, 50 mM, pH 7.0) que contiene el conservante (2-fenoxietanol/3[(2-etilhexil)oxi]1,2-propanediol).

[0099] La concentración de conservante fue 10 mL/mL para conseguir una concentración final de 1% (v/v) en el hidrogel hinchado. Se esperaba que el conservante se difundiera en el hidrogel durante la incubación, y que al mismo tiempo, se evitara una contaminación microbiana en el tampón.

[0100] El vaso se cubrió con parafilm y se colocó en un horno a 37°C. Después de 1 h, el baño de hinchamiento se eliminó y el hidrogel se hinchó en un tampón de fosfato fresco que contiene 10 mL/mL de conservante durante 6-7 h. Esta etapa se repitió hasta que el tiempo de hinchamiento fue de 12 h, de allí en adelante el pH se midió. El hinchamiento continuó durante otras 2,5 horas para alcanzar un pH neutro.

[0101] La cantidad de conservante incorporada en el hidrogel se determinó por espectrometría ultravioleta (Thermo Electron, Nicolet, Evolution 900, equipo nº 246-90). Una solución de 1% (v/v) del conservante en el tampón fosfato se analizó primero para seleccionar la longitud de onda. Se recogieron aproximadamente 5 mL de hidrogel utilizando una pipeta. Normalmente, se almacenaron muestras en el centro del hidrogel redondo hinchado, y en el los “lados” norte, este, sur, y oeste del círculo.

[0102] Las muestras se transferieron después a una cubeta y la absorbencia se leyó a 292 nm. Cada muestra se leyó tres veces y la absorbencia se redujo a cero contra un de hidrogel de AH reticulado con DVS vacío, que no contiene conservantes.

[0103] Los resultados mostraron que la cantidad de conservantes incorporada en el hidrogel de AH y DVS oscilaba entre 0.91% y 1.02% (ver Tabla 10). Hubo una reproducibilidad óptima entre las réplicas. De manera importante, no se observó una diferencia significativa entre las muestras del mismo hidrogel. indicando una difusión homogénea del conservante al hidrogel.

Tabla 10. Cantidad de conservante incorporado al hidrogel de DVS-AH después del hinchamiento en un tampón de 1% fosfato con conservante durante 14.5 h.

Muestra de ID	**Lugar de la muestra**	**Absorvencia* (292 nm)**	**Concentración de conservante (%, v/v)**	**Concentración media (%, v/v)**
Réplica 1	Centro	0,072	1,02	0,91
	Lado	0,058	0,82	
	Lado	0,066	0,94	
	Lado	0,057	0,81	
	Lado	0,068	0,97	
Réplica 2	Centro	0,076	1,08	1,02
	Lado	0,069	0,98	
	Lado	0,082	1,17	
	Lado	0,071	1,01	
	Lado	0,062	0,88	
Réplica 3	Centro	0,083	1,18	1,02
	Lado	0,074	1,05	
	Lado	0,069	0,98	
	Lado	0,066	0,94	
	Lado	0,068	0,97	
*La absorbencia es el valor medio de las tres mediciones realizadas en la misma muestra.				

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un hidrogel que comprende ácido hialurónico, o sal del mismo, reticulado con divinil sulfona (DVS), comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) proporcionar una solución alcalina de ácido hialurónico, o sal del mismo;
(b) añadir DVS a la solución de la etapa (a) con agitación, donde el ácido hialurónico o sal del mismo, está reticulado con DVS para formar un gel;
(c) tratar el gel de la etapa (b) con un tampón, donde el gel se hincha y forma un hidrogel que comprende ácido hialurónico o sal del mismo, reticulado con DVS,

donde la temperatura de la solución en la etapa (b) se mantiene en el rango de 15°C - 30°C y después se calienta a 35°C - 60°C y la temperatura se mantiene en el rango de 35°C - 60°C durante un periodo de al menos 5 minutos.

2. Método según la reivindicación 1, donde el ácido hialurónico o sal del mismo se produce de manera recombinada en una célula huésped de *Bacillus*.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde el ácido hialurónico o sal del mismo, tiene un peso molecular medio de entre 100 y 3000 kDa, preferiblemente entre 500 y 2000 kDa, y de la manera más preferible entre 700 y 1800 kDa.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, donde la solución alcalina comprende ácido hialurónico disuelto, o sal del mismo, en una concentración de entre 0.1% - 40% (p/v).

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, donde la solución alcalina comprende hidróxido sódico disuelto en una concentración de entre 0.001 - 2.0 M.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, donde se añade DVS a la solución de la etapa (a) en un ratio de peso de entre 1:1 y 100:1 de ácido hialurónico /DVS (peso en seco), preferiblemente entre 2:1 y 50:1 de ácido hialurónico /DVS (peso en seco).

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, donde se sigue con la agitación durante un periodo de entre 1 - 180 minutos.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, donde después de la etapa (b), y antes de etapa (c), el gel se mantiene durante un periodo de al menos 5 minutos a una temperatura en el rango de 0°C - 40°C, preferiblemente en el rango de 10°C - 30°C.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, donde el tampón comprende un tampón con un valor de pH en el rango de 2.0 - 8.0, preferiblemente en el rango de 5.0 - 7.5.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, donde el tampón comprende un tampón con un valor de pH, que da como resultado que el hidrogel tenga un valor de pH entre 5.0 y 7.5.

11. Método según la reivindicación 9 o 10, donde el tampón comprende un tampón de fosfato y/o un tampón de solución salina.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11, donde el tampón en la etapa (c) tiene un volumen de al menos 3 veces el volumen del gel de la etapa (b).

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, donde la etapa (c) se realiza a una temperatura de entre 20°C - 50°C durante un periodo de al menos 5 minutos.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, donde el hidrogel formado en la etapa (c) se lava al menos una vez con agua, y/o un fosfato y/o tampón de solución salina con un valor de pH en el rango de 2.0 - 8.0, preferiblemente en el rango de 5.0 - 7.5.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14, donde un conservante se añade como componente al hidrogel, preferiblemente el conservante se añade al tampón de la etapa (c).

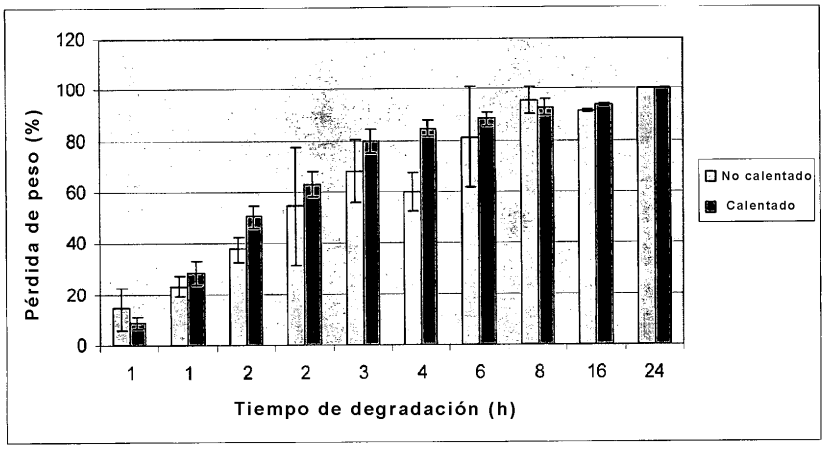
120
100
80
60
40
20
0
Pérdida de peso (%)
1
1
2
2
3
4
6
8
16
24
Tiempo de degradación (h)
No calentado
Calentado

FIG. 1

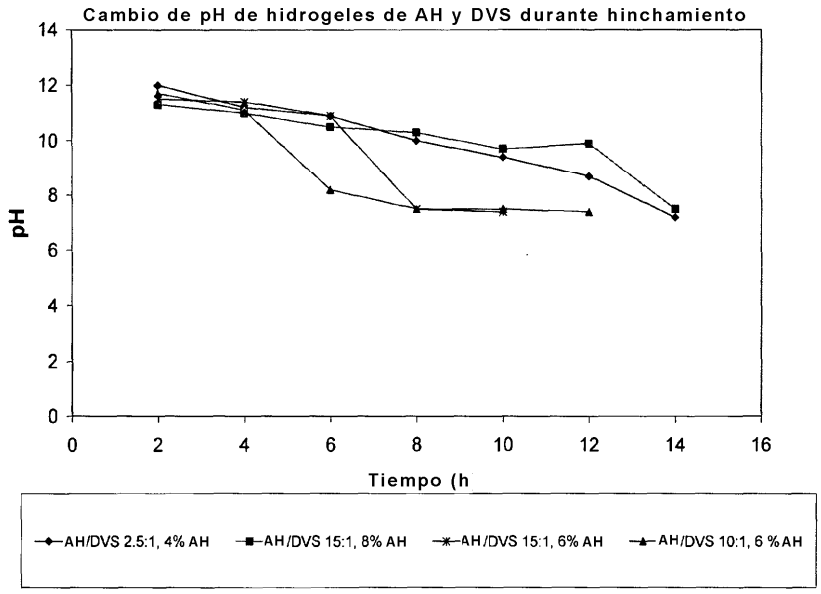
Cambio de pH de hidrogeles de AH y DVS durante hinchamiento
pH
14
12
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tiempo (h
AH/DVS 2.5:1, 4% AH
AH/DVS 15:1, 8% AH
AH/DVS 15:1, 6% AH
AH/DVS 10:1, 6 % AH

FIG. 2

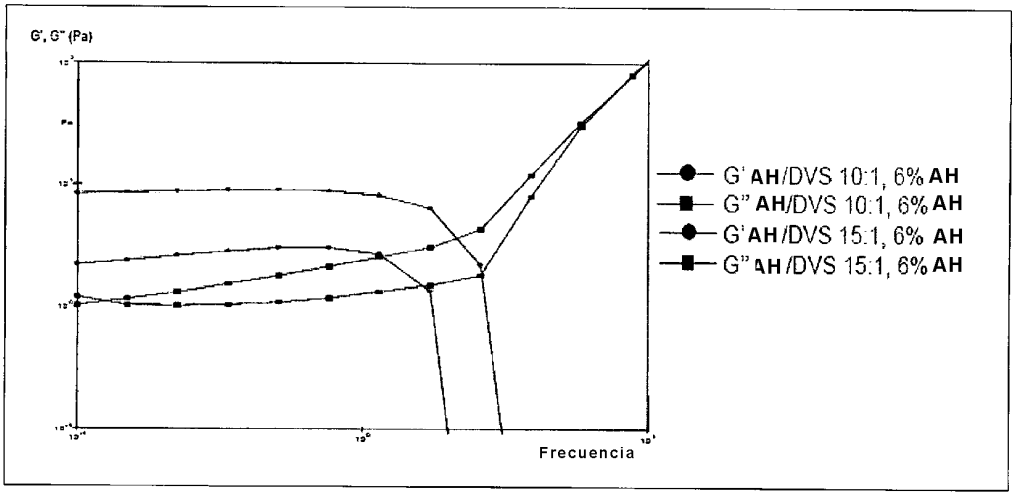
G', G'' (Pa)
Frecuencia
G' AH/DVS 10:1, 6% AH
G'' AH/DVS 10:1, 6% AH
G' AH/DVS 15:1, 6% AH
G'' AH/DVS 15:1, 6% AH

FIG. 3

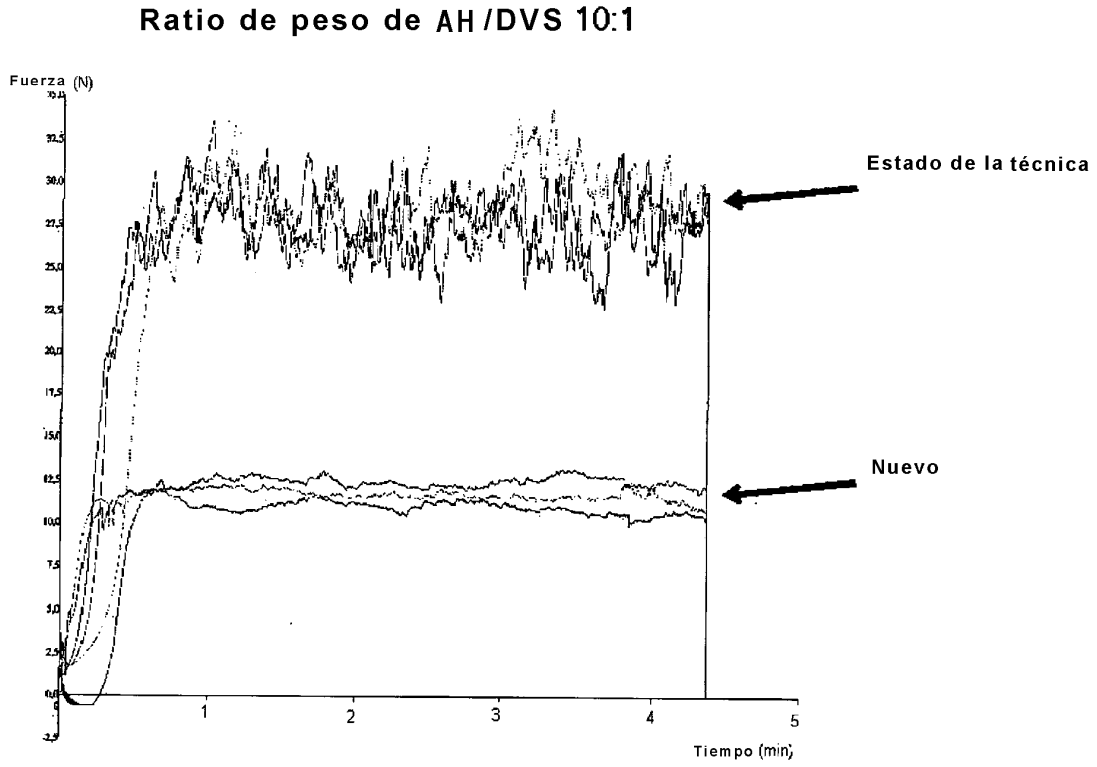
Ratio de peso de AH /DVS 10:1
Fuerza (N)
Estado de la técnica
Nuevo
1
2
3
4
5
Tiempo (min)

FIG. 4

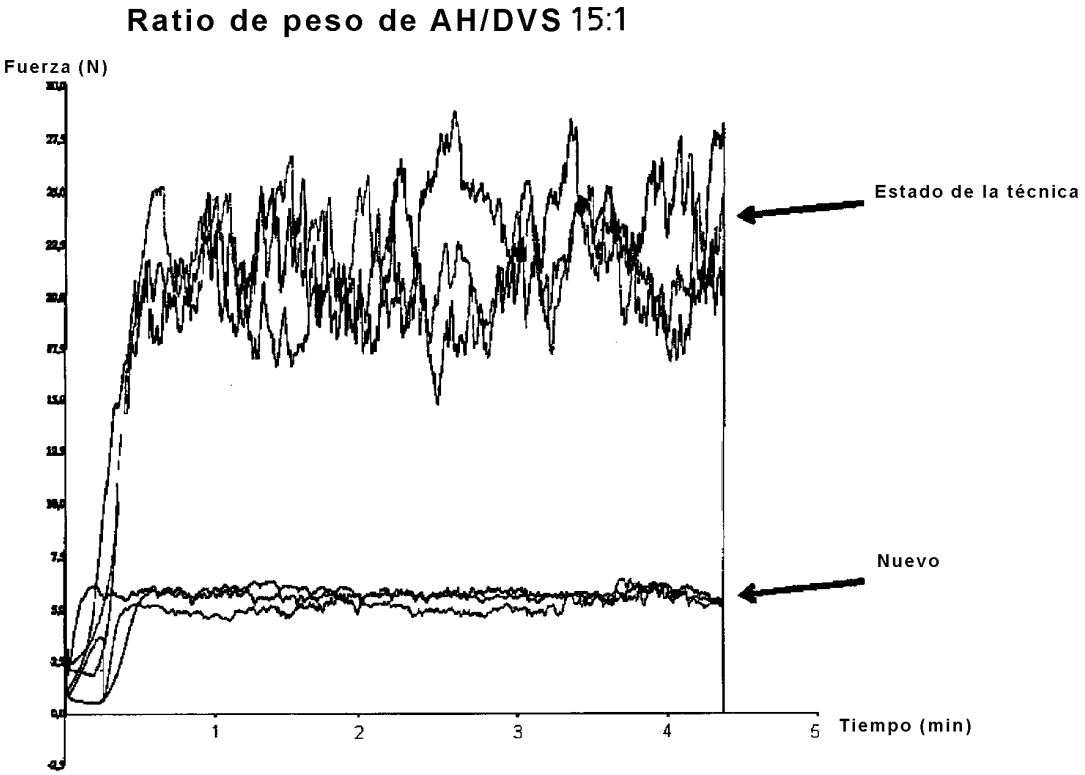
Ratio de peso de AH/DVS 15:1
Fuerza (N)
Estado de la técnica
Nuevo
1
2
3
4
5
Tiempo (min)

FIG. 5