(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 640 267**

(51) Int. Cl.:

A61L 15/28 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
D02G 3/44 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2012 PCT/US2012/059618**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055832**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 12773485 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2766056**

(54) Título: **Hebras de ácido hialurónico reticulado y métodos de uso de las mismas**

(30) Prioridad:

11.10.2011 US 201161545962 P
07.12.2011 US 201161568077 P
09.05.2012 US 201261644945 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2017

(73) Titular/es:

ALLERGAN HOLDINGS FRANCE S.A.S.
12 Place de La Defense, 4eme etage
92400 Courbevoie, FR

(72) Inventor/es:

FERMANIAN, SARA;
HORNE, KENNETH;
SHENOY, VIVEK;
RAJADAS, JAYAKUMAR;
PRIOR, JEFF;
JAYAKUMAR, NAVEEN y
GURTNER, GEOFFREY

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 640 267 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

Hebras de ácido hialurónico reticulado y métodos de uso de las mismas

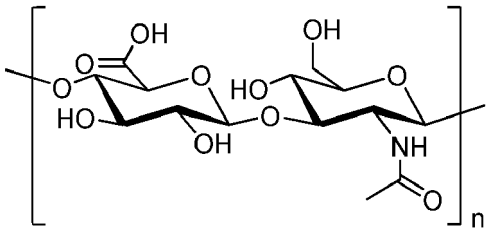
Esta solicitud reivindica el beneficio según la ley 35 U.S.C. 119(e) con respecto a las solicitudes provisionales números 61/545.962, presentada el 11 de octubre de 2011, 61/568.077, presentada el 7 de diciembre de 2011 y 61/644.945, presentada el 9 de mayo de 2012.

Campo

Esta divulgación se refiere en general a hebras de ácido hialurónico, a métodos de preparación de tales hebras y a usos de las mismas, por ejemplo, en aplicaciones estéticas (por ejemplo, contorneado facial, relleno dérmico), cirugía (por ejemplo, suturas), administración de fármacos, terapia de heridas con presión negativa, vendajes de heridas húmedas y similares.

Antecedentes

El ácido hialurónico (HA) es un polisacárido lineal (es decir, glucosaminoglucano no sulfatado) que consiste en una unidad de disacárido repetido de β-D-N-acetilglucosamina y ácido β-D-glucurónico unidos alternamente que puede representarse mediante la fórmula:



en la que n es el número de unidades de repetición. El ácido hialurónico se denomina algunas veces mediante la nomenclatura (-4GlcUAβ1-3GlcNAcβ1-)$_n$) y es un componente clave de la matriz extracelular encontrado, por ejemplo, en tejido conjuntivo, epitelial y neural. El ácido hialurónico natural es altamente biocompatible debido a su carencia de especificidad de órgano y especie y se usa a menudo como biomaterial en ingeniería de tejidos y como componente común en productos de aumento de tejidos blandos.

El ácido hialurónico natural tiene una escasa estabilidad *in vivo* debido a la hidrólisis y degradación enzimática rápidas y, por consiguiente, se han sintetizado diversas formas modificadas químicamente de ácido hialurónico (por ejemplo, formas reticuladas, formas modificadas iónicamente, formas esterificadas, etc.) para abordar este problema. Actualmente, se usan ácido hialurónico o versiones reticuladas del mismo en diversas formas de gel, por ejemplo como productos de aumento de tejidos blandos, barreras de adhesión y similares.

Sin embargo, existen problemas con el uso de geles de ácido hialurónico o sus versiones reticuladas como productos de aumento de tejidos blandos. En primer lugar, la fuerza requerida para dispensar geles de ácido hialurónico o sus versiones reticuladas no es lineal, lo que puede provocar una eyección inicial de un “pegote” de gel que muchos médicos notifican cuando usan geles de ácido hialurónico inyectables. En segundo lugar, la dispensación precisa de geles de ácido hialurónico en ubicaciones específicas puede ser difícil porque tales geles tienen poca resistencia mecánica. Además, el gel ocupará el espacio de menor resistencia, lo que hace que su uso en muchas aplicaciones (por ejemplo, tratamiento de arrugas finas) sea problemático ya que el gel migrará a menudo al interior de zonas espaciales no deseadas haciendo que el procedimiento cosmético sea difícil y posiblemente incluso peligroso. En tercer lugar, muchos productos de aumento de tejidos blandos comunes que se inyectan en el sitio de tratamiento como un líquido o un gel, tales como Restilane® (ácido hialurónico), Juvederm® (ácido hialurónico), Radiesse® (hidroxiapatita de calcio), Sculptra® (poli-ácido-L-láctico) y Perlane® (ácido hialurónico), son capaces de migrar y/o provocar “grumos” antiestéticos que son dolorosos de tratar. En cuarto lugar, estos productos de aumento de tejidos blandos no están recomendados para su uso alrededor de los ojos ya que la migración desde el sitio de inyección puede provocar ceguera, necrosis tisular, y en casos poco comunes incluso accidente cerebrovascular. Finalmente, los médicos también encuentran que la realización de aumentos de labios usando estos materiales de relleno requieren mucho tiempo y los pacientes encuentran los tratamientos en esta zona tan dolorosa que se realizan rutinariamente bloqueos de nervios.

Por consiguiente, se han desarrollado formas en hebras de ácido hialurónico y sus versiones reticuladas que pueden dispensarse uniformemente en ubicaciones específicas independientemente de la resistencia del tejido, y sin el riesgo de migración en la implantación. Estas formas en hebras son beneficiosas porque tienen una resistencia a la tracción mejorada y mayor facilidad de administración. Por ejemplo, el documento WO 2010/028025 A1 se refiere a hebras de ácido hialurónico reticulado o sales, hidratos o solvatos del mismo.

Debido al potencial terapéutico significativo de formas en hebras de ácido hialurónico, sigue habiendo la necesidad de desarrollar condiciones de reacción y protocolos de fabricación que producirán hebras mejoradas y productos de aumento de tejidos blandos que tienen propiedades físicas superiores.

Sumario

Se han desarrollado hebras que comprenden ácido hialurónico reticulado tal como se expone en las reivindicaciones. Se ha encontrado sorprendentemente que alteraciones, tal como se describe a lo largo de todo el documento, en las cantidades relativas de los componentes, condiciones de reacción, modificación covalente del ácido hialurónico y protocolos de fabricación pueden tener efectos significativos sobre determinadas propiedades de las hebras que comprenden ácido hialurónico reticulado.

En un aspecto, se divulga una composición que comprende ácido hialurónico reticulado, a partir de la que se preparan las hebras tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, se divulga una composición de gel que comprende al menos el 5% de ácido hialurónico, en la que el ácido hialurónico se reticula sustancialmente con al menos aproximadamente el 15% en moles de un derivado de diglicidil éter de butanodiol (BDDE) en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico. Además se proporcionan composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, que comprenden además un aglutinante, tal como ácido hialurónico no reticulado, tal como se expone en la reivindicación 1.

Las hebras descritas en el presente documento pueden prepararse usando una composición que comprende ácido hialurónico sustancialmente reticulado, en la que el ácido hialurónico se reticula con al menos aproximadamente el 15% en moles de un derivado de diglicidil éter de butanodiol (BDDE) en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico. Se ha descubierto que la concentración de agente de reticulación, es decir BDDE, usado para preparar el ácido hialurónico sustancialmente reticulado, se usa para afinar y/o mejorar determinadas propiedades físicas de la hebra. Además, en determinadas realizaciones, la composición comprende al menos el 5% de ácido hialurónico antes de la reticulación, tal como el 8%, el 10% o el 12% de ácido hialurónico.

Además, las hebras tal como se proporcionan en el presente documento comprenden tanto ácido hialurónico reticulado como no reticulado. Sorprendentemente, se descubrió que las concentraciones relativas de estos dos componentes tenían un impacto sobre determinadas propiedades físicas de las hebras, lo que en última instancia condujo a un aumento de la eficacia *in vivo* como productos de aumento de tejidos blandos.

Además, tal como se detalla en el presente documento, pueden alterarse diversos aspectos del procedimiento de fabricación de las hebras (por ejemplo, aclarado, desaireación, extrusión y secado de los geles precursores, así como la esterilización terminal de las hebras secas) para producir hebras que tienen características físicas mejoradas. Específicamente, se han preparado hebras que comprenden ácido hialurónico reticulado con una reticulación significativa (por ejemplo, al menos aproximadamente el 15% de derivado de BDDE) en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico. Se contempla que esta reticulación aumentada dentro de la composición de ácido hialurónico reticulado dé como resultado hebras con una semivida *in vivo* más prolongada.

Las hebras de ácido hialurónico descritas en el presente documento presentan una semivida *in vivo* aumentada en comparación con las hebras de ácido hialurónico descritas anteriormente en la técnica. Cuando se implantan en el dorso de conejos, las hebras esterilizadas descritas en la técnica se reabsorbieron completamente en el plazo de 30 días mientras que las hebras descritas en el presente documento estaban presentes todavía a los 3 meses o más en algunos casos.

En otro aspecto, se proporciona una hebra que tiene características físicas que pueden atenuarse alterando los métodos de preparación descritos en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, se describe una hebra seca que comprende ácido hialurónico sustancialmente reticulado preparado mediante las etapas de: a) formar una composición de ácido hialurónico sustancialmente reticulado poniendo en contacto ácido hialurónico con BDDE; b) añadir ácido hialurónico no reticulado a la composición; c) extruir la composición sustancialmente reticulada para formar una hebra húmeda; y d) secar la hebra húmeda para formar una hebra seca.

En una de sus realizaciones, se proporciona una hebra tal como se proporciona en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una arruga en un sujeto que lo necesita. En tal aspecto, la hebra se inserta en la piel de un paciente adyacente a o bajo la arruga. La hebra se aplica entonces bajo la arruga, tratando de ese modo la arruga. En una realización, tras la exposición a fluidos corporales o mediante hidratación manual, la hebra se expande tras la hidratación y tal expansión es suficiente normalmente para rellenar la arruga. Es ventajoso hacer que una hebra se expanda tras la hidratación porque se minimiza la invasividad del perfil de inserción, sin embargo, también pueden usarse hebras diseñadas para no expandirse para tratar la arruga.

En otra realización, se proporciona una hebra tal como se proporciona en el presente documento para su uso en un método para proporcionar un contorneado facial en un sujeto que lo necesita. En esta realización, la hebra se inserta en la piel en o adyacente a la ubicación de tratamiento deseada, por ejemplo, los labios, el pliegue nasolabial, el

pliegue nasoyugal, etc. La hebra se aplica entonces proporcionando de ese modo un contorneado facial. En una realización, se aplica una hebra a diversos planos del tejido dérmico. En una realización, pueden colocarse varias hebras generalmente paralelas entre sí y pueden colocarse otras hebras en una dirección generalmente perpendicular con respecto al primer conjunto de hebras paralelas formando de ese modo una estructura de malla cuyo efecto agregado es contornear un defecto más grande o un defecto más extendido tal como el pliegue nasoyugal o la región infraorbital del ojo.

También se proporciona un kit de partes que comprende la hebra. En algunas realizaciones, el kit comprende además un medio para administrar la hebra. Los medios para la administración pueden ser o bien una jeringa o bien una aguja.

En todavía otros aspectos, se proporcionan hebras de ácido hialurónico para su uso como productos de aumento de tejidos blandos, contorneado facial, barreras de adhesión, vendajes de heridas incluyendo vendajes de heridas con presión negativa, suturas y similares. Se describen además hebras de ácido hialurónico para su uso, por ejemplo, en cirugía, oftalmología, cierre de heridas, administración de fármacos y similares. Estas realizaciones, así como otras, se comentan en más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Determinados aspectos se entienden mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee conjuntamente con los dibujos adjuntos. Se enfatiza que, según la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características se expanden o se reducen arbitrariamente por claridad. Se incluyen en los dibujos las siguientes figuras:

La figura 1 muestra un esquema de ácido hialurónico reticulado con diglicidil éter de butanodiol (BDDE).

La figura 2 ilustra una hebra unida al extremo proximal de una aguja, en su totalidad (N = aguja; T = hebra).

Las figuras 3A y 3B muestran una aguja unida a la hebra (N = aguja; T = hebra). La figura 3A ilustra una vista en primer plano de una hebra insertada en el diámetro interno de una aguja; y la figura 3B ilustra una vista en primer plano del extremo proximal de una aguja sólida con la hebra solapándose con la aguja.

Las figuras 4A-4F muestran el tratamiento de una arruga. La figura 4A ilustra una arruga facial fina en la región periorbital de un humano; la figura 4B ilustra una aguja y hebra insertándose en la piel de la arruga en el margen medio; la figura 4C ilustra la aguja ajustándose para atravesar por debajo de la arruga; la figura 4D ilustra la aguja saliendo en el margen lateral de la arruga; la figura 4E ilustra la aguja que ha tirado de la hebra hasta la ubicación que ocupaba previamente por debajo de la arruga; y la figura 4F ilustra la hebra implantada por debajo de la arruga, habiéndose cortado la hebra en exceso.

Las figuras 5A-5C muestran el tratamiento de una arruga. La figura 5A ilustra una vista en sección transversal de un pliegue o una arruga; la figura 5B ilustra una hebra implantada por debajo de una arruga que no está hidratada aún; y la figura 5C ilustra una hebra implantada por debajo de una arruga que está completamente hidratada y ha aplanado el aspecto superficial de la arruga.

La figura 6 ilustra cómo podrían usarse una aguja y una hebra para colocar una hebra en una ubicación lineal, específica para promover el recrecimiento de nervios o vasos en una línea específica.

La figura 7A muestra la colocación de hebras en una orientación relativamente paralela para el contorneado facial en el pliegue nasoyugal (hebra 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Esta figura también muestra la colocación de la hebra para el contorneado facial del pliegue nasolabial (hebra 7 y 8). La figura 7B muestra una colocación alternativa de las hebras para el contorneado facial en el pliegue nasoyugal (hebra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8).

Las figuras 8A y 8B muestran un esquema de la microanatomía contemplada de una hebra implantada en un paciente tanto en sección transversal de la piel como en sección transversal tridimensional.

Las figuras 9A, 9B, 9C, 9D y 9E muestran (a 14x aumentos) una sección transversal histológica de un conejo, un mes (9A), dos meses (9B), tres meses (9C), seis meses (9D) y nueve meses (9E) tras tratarse con hebras preparadas a partir de una composición de hebras 8/40@15/20 (lavado con tampón fosfato; el 15% de sólidos de HA, el 20% de HA es aglutinante no reticulado en agua). Los detalles de los estudios histológicos ilustrados en las figuras 9A, 9B, 9C, 9D y 9E pueden encontrarse en el ejemplo 9.

La figura 10 muestra una disección macroscópica de un conejo un mes después de tratarse con hebras preparadas a partir de una composición de hebras 8/40@15/20 (lavado con tampón fosfato; el 15% de sólidos de HA, el 20% de HA es aglutinante de HA no reticulado). Los detalles de la disección ilustrada en la figura 10 pueden encontrarse en el ejemplo 10.

La figura 11 muestra una disección macroscópica de un conejo dos meses tras tratarse con hebras preparadas a partir de una composición de hebras 8/40@15/20 (lavado con tampón fosfato; el 15% de sólidos de HA, el 20% de HA es aglutinante de HA no reticulado). Los detalles de esta disección ilustrada en la figura 11 pueden encontrarse en el ejemplo 10.

La siguiente nomenclatura de hebras se usa en las figuras 12 y 13 para describir las composiciones de gel: AA/BB@XX/YY, en la que (AA) es el % en peso de ácido hialurónico en relación con el peso de la disolución reticulada; (BB) es el % en peso de BDDE en relación con el peso del ácido hialurónico; (XX) es el % en peso de "sólidos" de ácido hialurónico reticulado y no reticulado en relación con el peso de la composición (antes de la extrusión); e (YY) es el % en peso de ácido hialurónico no reticulado en relación con el peso de "sólidos" totales de ácido hialurónico reticulado y no reticulado.

La figura 12 muestra los resultados de un estudio de degradación de hebras con hialuronidasa (1 mg/ml). Los detalles de estas degradaciones enzimáticas representadas en la figura 12 pueden encontrarse en el ejemplo 7. Para las hebras A-F: A = 10/40@15/20 $CaCl_2$; B = 10/40@15/40; C = 10/40@15/20; D = 10/40@10/50; E = 8/40@15/20 lavado con H_2O; F = 8/40@15/20; G = Control para 10/40@15/20 $CaCl_2$; H = Control para 10/40@15/40; I = Control para 10/40@15/20; J = Control para 8/40@15/20. Las flechas verticales corresponden a la adición de 1 mg/ml de hialuronidasa nueva.

La figura 13 muestra puntuaciones de palpación promedio para hebras a modo de ejemplo tal como se describe en el presente documento. Los detalles de estos estudios de palpación representados en la figura 13 pueden encontrarse en el ejemplo 8. Para las hebras A-F: A = 8/40@15/20; B = 8/40@15/20; C = 10/40@10/50; D = 10/40@15/20; E = 10/40@15/20; F = 10/40@15/40; Aguja = predimensionada (20 G); esterilizada de manera terminal (20 kGy); tamaño de hebra ~0,01 pulgadas.

La figura 14 muestra la distribución de tamaño de partícula de partículas de hasta 0,3 mm cuadrados de diámetro del gel con una y múltiples etapas de dimensionamiento.

Descripción detallada

Se describen en el presente documento hebras de ácido hialurónico sustancialmente reticulado, las composiciones a partir de las cuales se preparan, los métodos para su preparación y usos de las mismas y formas específicas formadas a partir de las mismas. Sin embargo, se definirán en primer lugar los siguientes términos.

Debe entenderse que esta divulgación no se limita a las realizaciones particulares descritas, como tal, por supuesto, puede variar. También se entiende que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares sólo, y no pretende ser limitativa, puesto que el alcance de la presente divulgación estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Debe indicarse que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una hebra" incluye una pluralidad de hebras.

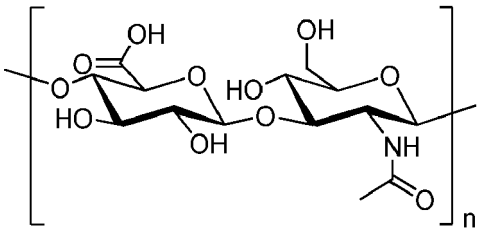
1. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Tal como se usa en el presente documento los siguientes términos tienen los siguientes significados.

Tal como se usa en el presente documento, el término "que comprende" o "comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos mencionados, pero sin excluir otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier significancia esencial para la combinación para el fin establecido. Por tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en el presente documento no excluiría otros materiales o etapas que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) reivindicada(s). "Que consiste en" significará que excluye más que elementos traza de otros componentes y etapas de método sustanciales. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta divulgación.

El término "aproximadamente" cuando se usa antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluyendo un intervalo, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) el 10%, el 5% o el 1%.

El término "ácido hialurónico" o "HA" se refiere al polímero que tiene la fórmula:

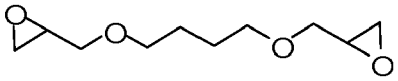


en la que n es el número de unidades de repetición. Todas las fuentes de ácido hialurónico son útiles, incluyendo fuentes bacterianas y aviares. Los ácidos hialurónicos útiles tienen un peso molecular de desde aproximadamente 0,5 MDa (mega Dalton) hasta aproximadamente 3,0 MDa. En algunas realizaciones, el peso molecular es de desde aproximadamente 0,6 MDa hasta aproximadamente 2,6 MDa y en aún otra realización, el peso molecular es de desde aproximadamente 1,4 MDa hasta aproximadamente 1,7 MDa. En algunas realizaciones, el peso molecular es de aproximadamente 0,7 MDa y en aún otra realización, el peso molecular es de aproximadamente 1,7 MDa. En algunas realizaciones, el peso molecular es de aproximadamente 2,7 MDa.

Al menos una porción de la hebra tal como se describe en el presente documento se reticula. El término “reticulado” pretende referirse a dos o más cadenas de polímero de ácido hialurónico que se han unido covalentemente por medio de un agente de reticulación. Tal reticulación se diferencia de la deshidratación intermolecular o intramolecular que da como resultado la formación de lactona, anhídrido o éster dentro de una única cadena de polímero o entre dos o más cadenas. Aunque se contempla que también pueda producirse reticulación intramolecular en las hebras tal como se describe en el presente documento. El término “reticulado” también pretende referirse a ácido hialurónico covalentemente unido a un derivado de BDDE. En algunas realizaciones, el término “reticulado” también se refiere a ácido hialurónico covalentemente modificado.

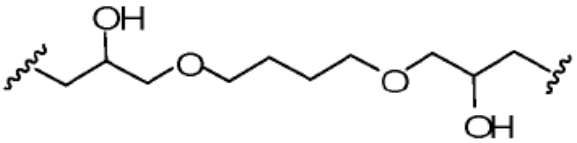
Los “agentes de reticulación” contienen al menos dos grupos funcionales reactivos que crean enlaces covalentes entre dos o más moléculas. Los agentes de reticulación pueden ser homobifuncionales (es decir, tienen dos extremos reactivos que son idénticos) o heterobifuncionales (es decir tienen dos extremos reactivos diferentes). Los agentes de reticulación que van a usarse en la presente divulgación deben comprender grupos funcionales complementarios al del ácido hialurónico de manera que pueda avanzar la reacción de reticulación. En una realización, la reticulación no forma ácido hialurónico esterificado. Los agentes de reticulación adecuados incluyen, a modo de ejemplo sólo, diglicidil éter de butanodiol (BDDE), divinilsulfona (DVS) o clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodimida (EDC), o una combinación de los mismos. En una realización, el agente de reticulación es BDDE.

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado de BDDE” se refiere a una forma de BDDE en la que uno o ambos epóxidos de BDDE han reaccionado con ácido hialurónico. BDDE tiene la siguiente estructura química:



BDDE

Un ejemplo de un derivado de BDDE de ácido hialurónico se muestra a continuación.



un derivado de BDDE

El derivado de BDDE de ácido hialurónico, tal como se mostró anteriormente, puede unirse covalentemente a ácido hialurónico en ambos extremos habiendo reaccionado ambos epóxidos. Se contemplan derivados de BDDE adicionales de ácido hialurónico en el presente documento. Por ejemplo, determinados derivados de BDDE de ácido hialurónico pueden unirse covalentemente en ambos extremos entre dos polímeros de ácido hialurónico separados (es decir, reticularse), mientras que otros derivados de BDDE pueden unirse covalentemente en ambos extremos dentro de un único polímero de ácido hialurónico. También se contemplan derivados de BDDE que se unen covalentemente en uno o ambos extremos a un grupo hidroxilo de uno o más derivados de BDDE adicionales que se unen covalentemente por sí mismos a ácido hialurónico.

También se contemplan derivados de BDDE que se unen covalentemente a ácido hialurónico en tan solo un

extremo. Por ejemplo, uno de los anillos de epóxido puede abrirse mediante unión covalente a un único tramo de un polímero de ácido hialurónico mientras que el otro anillo de epóxido puede permanecer cerrado (es decir, sin reaccionar). Se contempla además que, dentro de las composiciones de ácido hialurónico reticulado, la concentración de tales derivados de BDDE con un epóxido sin reaccionar sea lo suficientemente baja de modo que no afecte a la biocompatibilidad de hebras preparadas a partir de tales composiciones. Además se contempla un derivado de BDDE en el que uno de los anillos de epóxido se ha abierto mediante unión covalente a un único tramo de polímero de ácido hialurónico mientras que el otro anillo de epóxido se ha abierto mediante hidrólisis. Sin embargo, se contempla que las composiciones de ácido hialurónico reticulado comprendan al menos aproximadamente el 2% en moles de BDDE (con respecto al monómero de disacárido) que se une covalentemente en ambos extremos entre dos polímeros de ácido hialurónico separados.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aglutinante” se refiere a una sustancia sintética o que se produce de manera natural que proporciona consistencia y/o cohesión uniforme en la composición que comprende el ácido hialurónico reticulado, que cuando se extruye, forma una hebra. En una realización, el aglutinante es ácido hialurónico no reticulado. En otra realización, el aglutinante se selecciona de un grupo que consiste en azúcares y polisacáridos tales como sacarosa, maltosa, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, heparina, quitosano, celulosa, gelatina, colágeno, goma arábiga, almidón, PVP (polivinilpirrolidona), HPC (hidroxipropilcelulosa), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa), PEG, PLGA (poli(ácido láctico-*co*-glicólico), carboximetilcelulosa, etilcelulosa, poli(óxido de etileno) de gelatina, dextrina, silicato de aluminio y magnesio, polimetacrilatos, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “piel” se refiere a las tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis o el tejido subcutáneo más profundo.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “más suave”, “suave” y “suavidad” se refieren a la propiedad de una hebra que proporciona un arrastre disminuido cuando se tira de la misma a través del tejido. Cuanto más suave sea la hebra, menos arrastre habrá cuando se tire de la misma a través de la piel.

Tal como se usa en el presente documento, el término “hebra” se refiere a una forma larga, fina, flexible de un material. La hebra tal como se describe en el presente documento puede tener una variedad de formas en la sección transversal que se comentan más adelante.

El término “resistencia a la tracción final” pretende referirse a la resistencia a la tracción de la hebra que se ha normalizado con respecto al área de sección transversal. El término “resistencia a la tracción” pretende referirse al esfuerzo máximo que una hebra puede soportar sin fallar cuando se somete a tensión. En una realización, se contempla que la resistencia a la tracción final sea suficiente para tirar de la hebra a través de la piel y manipularla una vez que está en la piel de manera que la integridad de la hebra no se vea sustancialmente comprometida por, por ejemplo, rotura o segmentación. Se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan preferiblemente una resistencia a la tracción final de aproximadamente 3 kpsi (“kilolibras por pulgada cuadrada”) o mayor, o 5 kpsi o mayor, o 10 kpsi o mayor, o 15 kpsi o mayor o 20 kpsi o mayor o 50 kpsi o mayor o 75 kpsi o mayor. En algunas realizaciones, las hebras tienen una resistencia a la tracción de aproximadamente 0,4 lbf (libra de fuerza) o mayor, o 0,6 lbf o mayor, o 0,8 lbf o mayor, o 1,0 lbf o mayor, o 1,1 lbf o mayor. En algunas realizaciones, las hebras tienen una resistencia a la tracción de aproximadamente 0,7 lbf.

En algunas realizaciones, la resistencia a la tracción puede medirse usando un dinamómetro y midiendo la fuerza máxima requerida para romper la hebra. De aproximadamente 9 lotes de hebras sometidos a prueba, la resistencia a la tracción promedio era de aproximadamente 0,71 libras de fuerza usando una boquilla de extrusión de calibre 20.

El término “porcentaje de humedad” pretende referirse al porcentaje total de agua en peso. En una realización, el porcentaje de humedad de la hebra es de aproximadamente el 30% o menos, o alternativamente, de aproximadamente el 15% o menos, o alternativamente, de aproximadamente el 10% o menos. Esto puede medirse normalmente mediante una valoración de Karl Fisher.

Las hebras descritas en el presente documento pueden prepararse para dar una variedad de formas. El término “sustancialmente cilíndrico” se refiere a una hebra en la que la sección transversal de la hebra es redonda. El término “sustancialmente” tal como se usa para referirse a las formas de las hebras significa que al menos el 50% de la hebra tiene la forma aproximada descrita. El término sustancialmente también se usa para abarcar hebras que tienen una variedad de formas a lo largo de la longitud de la hebra. Por ejemplo, una hebra podría ser sustancialmente cilíndrica pero los extremos de la hebra pueden tener una sección transversal decreciente. Las hebras sustancialmente cilíndricas pueden proporcionarse cuando el ángulo de contacto de la composición de gel y el sustrato sobre el que se extruye tienen un ángulo de contacto en equilibrio de más de aproximadamente 90 grados.

El término “sustancialmente con forma de D” se refiere a una hebra en la que la sección transversal tiene forma de D o es sustancialmente semicircular. Las hebras con forma sustancialmente de D tienen un lado plano y un lado sustancialmente redondo. Las hebras con sustancialmente forma de D pueden proporcionarse cuando el ángulo de contacto de la composición de gel y el sustrato sobre el que se extruye tienen un ángulo de contacto de equilibrio de

aproximadamente 90 grados.

El término “sustancialmente con forma de cinta” se refiere a una hebra en la que el grosor de la hebra es menor de aproximadamente el 50% de la anchura de la hebra. En algunas realizaciones, la sección transversal es sustancialmente rectangular. Las hebras con forma de cinta pueden proporcionarse cuando el ángulo de contacto de la composición de gel y el sustrato sobre el que se extruye tienen un ángulo de contacto de equilibrio de menos de aproximadamente 90 grados. Alternativamente, las hebras con forma de cinta pueden formarse cortando un gel húmedo para lograr la forma de sección transversal deseada. “En forma de cinta” puede incluir también formas que son sustancialmente elipsoidales. El término “sustancialmente elipsoidal” se refiere a una hebra en la que la sección transversal es sustancialmente oblonga o elíptica.

El término “agente terapéutico” puede incluir uno o más agentes terapéuticos. En todavía otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es un anestésico, incluyendo pero sin limitarse a, lidocaína, xilocaína, novocaína, benzocaína, prilocaína, ripivacaína, propofol, o combinaciones de los mismos. En todavía otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico incluye, pero no se limita a, epinefrina, efedrina, aminofilina, teofilina o combinaciones de las mismas. En todavía otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es toxina botulínica. En todavía otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es laminina-511. En todavía otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es glucosamina, que puede usarse, por ejemplo, en el tratamiento de artropatía degenerativa. En todavía otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es un antioxidante, incluyendo pero sin limitarse a, vitamina E o ácido todo-trans retinoico tal como retinol. En todavía otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico incluye células madre. En todavía otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es insulina, un factor de crecimiento tal como, por ejemplo, NGF (factor de crecimiento nervioso), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) o purmorfamina-deferoxamina-NGF (factor de crecimiento nervioso), dexametasona, ácido ascórbico, 5-azacitidina, pirrolopirimidina 4,6-disustituida, cardiogenoles, ADNc, ADN, iARN, BMP-4 (proteína morfogenética ósea-4), BMP-2 (proteína morfogenética ósea-2), un agente antibiótico tal como, por ejemplo, β-lactamas, quinolonas incluyendo fluoroquinolonas, aminoglucósidos o macrólidos, un agente antifibrótico, incluyendo pero sin limitarse a, factor de crecimiento de hepatocitos o pirfenidona, un agente anticicatrización, tal como, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-TGF-b2 (AcM rhAnti-TGF-b2), un péptido tal como, por ejemplo, péptido de unión a cobre GHK, un agente de regeneración tisular, un esteroide, fibronectina, una citocina, un analgésico tal como, por ejemplo, tapentadol HCl, opiáceos, (por ejemplo, morfina, codona, oxicodona, etc.) un antiséptico, interferón alfa, beta o gamma, EPO, glucagones, calcitonina, heparina, interleucina-1, interleucina-2, filgrastim, una proteína, HGH, hormona luteinizante, factor natriurético auricular, factor VIII, factor IX o una hormona foliculoestimulante.

El término “agente de diagnóstico” se refiere a un agente que se usa como parte de una prueba de diagnóstico (por ejemplo, un colorante fluorescente que va a usarse para observar la hebra *in vivo*). En una realización, el agente de diagnóstico es proteína de TB (tuberculosis) soluble.

El término “agente potenciador de la lubricidad” pretende referirse a una sustancia o disolución que cuando se pone en contacto con la hebra seca, actúa lubricando la hebra seca. Un agente potenciador de la lubricidad puede comprender, por ejemplo, agua y/o un alcohol, un tampón acuoso, y puede comprender además agentes adicionales tales como polietilenglicol, ácido hialurónico y/o colágeno.

El término “agente que impide la biodegradación” pretende referirse a una sustancia biocompatible que ralentiza o impide la degradación *in vivo* de la hebra. Por ejemplo, un agente que impide la biodegradación puede incluir agentes hidrófobos (por ejemplo, lípidos) o agentes de biodegradación de sacrificio (por ejemplo, azúcares).

El término “carga de fallo” pretende referirse a la fuerza máxima que, cuando se aplica a la hebra, provoca que la hebra falle. Por “fallo”, quiere decirse que la hebra la hebra puede romperse o segmentarse o perder de otra forma la integridad estructural. En algunas realizaciones, la carga de fallo es de aproximadamente 0,1 libras o 0,22 kilogramos o mayor.

El término “firme” pretende referirse a un material cohesivo que mantiene su forma en un entorno no constreñido (es decir, en contraposición a un material que puede fluir/amorfo) y demuestra algún grado de integridad estructural bajo compresión. Un cubo de gelatina es un ejemplo de un gel firme.

El término “composición de gel acuosa” o “composición de gel” o “mezcla de gel” pretende referirse a una composición acuosa que comprende agua, ácido hialurónico y un agente de reticulación y/o ácido hialurónico reticulado. En algunas realizaciones, la composición puede comprender además un tampón de tal manera que el pH de la disolución cambia muy poco con la adición de componentes de la composición. En estas realizaciones, la composición se denomina composición de gel tamponada acuosa. El pH de la composición de gel tamponada es normalmente de desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 13. En determinadas realizaciones el pH es de aproximadamente 7. En determinadas realizaciones, el pH es mayor de aproximadamente 9 o aproximadamente 10. En algunas realizaciones, el pH puede ajustarse añadiendo una cantidad apropiada de una base adecuada, tal como Na_2CO_3 o NaOH. En algunas realizaciones, la composición tamponada de gel acuosa comprende solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, la composición tamponada de gel acuosa comprende

tris(hidroximetil)aminometano (Tris), que tiene la fórmula $(HOCH_2)_3CNH_2$. En algunas realizaciones, se añaden solutos adicionales para ajustar la osmolaridad y concentraciones iónicas, tales como cloruro de sodio, cloruro de calcio y/o cloruro de potasio.

El término “tampón” pretende referirse a una disolución que estabiliza el pH, en la que la disolución comprende una mezcla de un ácido débil y su base conjugada o una base débil y su ácido conjugado. Las disoluciones tampón incluyen, pero no se limitan a, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácido L-(+)-tartárico, ácido D-(-)-tartárico, ACES, ADA, ácido acético, acetato de amonio, bicarbonato de amonio, citrato de amonio, formiato de amonio, oxalato de amonio, fosfato de amonio, fosfato de sodio y amonio, sulfato de amonio, tartrato de amonio, BES, BICINE, BIS-TRIS, bicarbonato, ácido bórico, CAPS, CHES, acetato de calcio, carbonato de calcio, citrato de calcio, citrato, ácido cítrico, dietanolamina, EPP, sal de disodio de ácido etilendiaminatetraacético, disolución de ácido fórmico, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly, glicina, HEPES, imidazol, acetato de litio, citrato de litio, MES, MOPS, acetato de magnesio, citrato de magnesio, formiato de magnesio, fosfato de magnesio, ácido oxálico, PIPES, solución salina tamponada con fosfato, piperazina, D-tartrato de potasio, acetato de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, formiato de potasio, oxalato de potasio, fosfato de potasio, ftalato de potasio, tartrato de sodio y potasio, tetraborato de potasio, tetraoxalato de potasio deshidratado, disolución de ácido propiónico, disolución tampón de STE, 5,5-dietilbarbiturato de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, bitartrato de sodio monohidratado, carbonato de sodio, citrato de sodio, cloruro de sodio, formiato de sodio, oxalato de sodio, fosfato de sodio, pirofosfato de sodio, tartrato de sodio, tetraborato de sodio, TAPS, TES, TNT, TRIS-glicina, TRIS-acetato, solución salina tamponada con TRIS, TRIS-HCl, TRIS fosfato-EDTA, tricina, trietanolamina, trietilamina, acetato de trietilamonio, fosfato de trietilamonio, acetato de trimetilamonio, fosfato de trimetilamonio, acetato de Trizma®, base de Trizma®, carbonato de Trizma®, clorhidrato de Trizma® o maleato de Trizma®.

El término “disolvente acuoso” pretende referirse a una composición acuosa no tóxica, no inmunogénica. El disolvente acuoso puede ser agua y/o un alcohol, y puede comprender además tampones, sales (por ejemplo, $CaCl_2$) y otros de tales solutos no reactivos.

El término “ángulo de contacto” o “ángulo de contacto de equilibrio” se refiere a la medida de la afinidad de un líquido por un sólido y cuantifica el grado en el que una gota de líquido se extiende cuando se coloca sobre el sólido. En el caso descrito en el presente documento, el líquido es la composición de gel acuosa y la superficie rígida o sólida es el sustrato sobre el que se extruye la composición. El ángulo de contacto es una medida del ángulo que forma el borde de una gota ideal con una superficie plana. Cuanto menor sea el ángulo de contacto, mayor será la atracción entre la superficie y el líquido. Por ejemplo, el agua se extiende casi completamente sobre vidrio y tiene un ángulo de contacto muy bajo de casi 0 grados. El mercurio, en cambio, se acumula y se extiende muy poco; su ángulo de contacto es muy grande.

2. Hebras y métodos de preparación de hebras

Tal como se mencionó anteriormente, se ha encontrado sorprendentemente que alteraciones de las cantidades relativas de los componentes, condiciones de reacción, modificación covalente del ácido hialurónico y/o protocolos de fabricación pueden tener efectos notables sobre determinadas propiedades de hebras que comprenden ácido hialurónico reticulado. Por consiguiente, se han desarrollado tales hebras con características mejoradas y se describen métodos de su preparación en el presente documento. Se contempla que tales hebras sean más suaves. Algunas de las hebras que se describen a continuación son más fuertes. Tienen mayores resistencias a la tracción y capacidades mejoradas para absorber agua. Se contempla por tanto que las hebras descritas en el presente documento sean más fáciles para el médico de manipular e implantar en un paciente.

Preparación de ácido hialurónico reticulado

Se han preparado hebras que comprenden ácido hialurónico reticulado según métodos descritos en el presente documento que tienen razones aumentadas de agente de reticulación (por ejemplo, derivados de BDDE) en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico.

Generalmente, el ácido hialurónico (HA) usado en el presente documento tiene un peso molecular de desde aproximadamente 0,5 MDa (mega Dalton) hasta aproximadamente 3,0 MDa. En algunas realizaciones, el peso molecular es de desde aproximadamente 0,6 MDa hasta aproximadamente 2,6 MDa, y en aún otra realización el peso molecular es de desde aproximadamente 1,4 MDa hasta aproximadamente 1,7 MDa. En algunas realizaciones, el peso molecular es de aproximadamente 0,7 MDa, y en aún otra realización el peso molecular es de aproximadamente 1,7 MDa. En algunas realizaciones, el peso molecular es de aproximadamente 2,7 MDa.

En un aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado formado en condiciones acuosas. En determinadas realizaciones, tales composiciones acuosas forman geles. En determinadas realizaciones, el ácido hialurónico se hidrata durante entre aproximadamente un minuto y aproximadamente 60 minutos antes de la reticulación. En otras realizaciones, el ácido hialurónico se hidrata durante entre aproximadamente una hora y aproximadamente 12 horas antes de la reticulación. En determinadas realizaciones, el

ácido hialurónico se hidrata durante aproximadamente una hora y en aún otra realización se permite que el ácido hialurónico se hidrate durante aproximadamente dos horas antes de la reticulación. En determinadas realizaciones, el ácido hialurónico se hidrata durante aproximadamente tres horas y en aún otra realización se permite que el ácido hialurónico se hidrate durante cuatro horas antes de la reticulación.

Antes de la adición del HA, la disolución acuosa se ajusta al pH deseado. En una realización, la disolución acuosa tiene un pH > aproximadamente 7. En determinadas realizaciones, la disolución tiene un pH de aproximadamente 9, o aproximadamente 10, o aproximadamente 11, o aproximadamente 12 o aproximadamente 13, o mayor de 13. Normalmente, la disolución comprende agua y puede comprender opcionalmente solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón tris(hidroximetil)aminometano (Tris). El tampón puede seleccionarse basándose en el pH deseado de la composición. Por ejemplo, puede usarse PBS para las composiciones a un pH de aproximadamente 7, mientras que puede usarse Tris para composiciones que tienen un pH mayor de aproximadamente 9 o aproximadamente 10. En algunas realizaciones, el pH es de desde entre aproximadamente 9 y aproximadamente 13. En algunas realizaciones, el pH es de al menos aproximadamente 13. En algunas realizaciones, el pH se ajusta con la cantidad apropiada de una base adecuada, tal como Na_2CO_3 o NaOH para alcanzar el pH deseado. En algunas realizaciones, la concentración de base es de desde aproximadamente 0,00001 M hasta aproximadamente 0,5 M. En algunas realizaciones, la concentración de base es de desde aproximadamente 0,1 M hasta aproximadamente 0,25 M. En algunas realizaciones, la concentración de base es de aproximadamente 0,2 M.

Se ha encontrado sorprendentemente que la concentración de ácido hialurónico usada durante la reticulación contribuye a la calidad de las composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, y en última instancia mejora determinadas propiedades de hebras que se preparan a partir de tales composiciones. Por ejemplo, los geles se vuelven cada vez más firmes cuando la concentración de ácido hialurónico usada durante la reticulación es de al menos aproximadamente el 5%. Además, se ha encontrado que la razón de hinchamiento del gel en agua puede aumentarse disminuyendo la concentración de ácido hialurónico usada durante la reticulación. En una realización, la composición durante la reticulación comprende desde aproximadamente el 1% en peso hasta aproximadamente el 25% en peso de ácido hialurónico, antes de la reticulación. En otra realización, la composición durante la reticulación comprende aproximadamente el 14% en peso de ácido hialurónico, antes de la reticulación. En otra realización, la composición durante la reticulación comprende aproximadamente el 12% en peso de ácido hialurónico, antes de la reticulación. En otra realización, la composición durante la reticulación comprende aproximadamente el 8% en peso de ácido hialurónico, antes de la reticulación. En otra realización, la composición durante la reticulación comprende aproximadamente el 5% en peso de ácido hialurónico, antes de la reticulación.

En una realización alternativa, la reticulación se realiza pura, es decir, sin un disolvente. Por tanto, en determinadas realizaciones, se pone en contacto BDDE puro con ácido hialurónico seco para proporcionar el ácido hialurónico reticulado. La composición puede entonces hidratarse con la cantidad deseada de medio acuoso para proporcionar la composición de gel.

Se forman composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado cando se pone en contacto ácido hialurónico con un agente de reticulación. El agente de reticulación que va a usarse en la presente divulgación debe comprender grupos funcionales complementarios al de ácido hialurónico de manera que pueda avanzar la reacción de reticulación. El agente de reticulación puede ser homobifuncional o heterobifuncional. Se contempla que el porcentaje de hidratación de la hebra pueda controlarse al menos parcialmente mediante el tipo de agente de reticulación empleado. Por ejemplo, si la reticulación deja los grupos carboxilo del ácido hialurónico sin funcionalizar, el porcentaje de hidratación de la hebra puede ser mayor que el del ácido hialurónico esterificado. Los agentes de reticulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, diglicidil éter de butanodiol (BDDE), divinilsulfona (DVS) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende ácido hialurónico sustancialmente reticulado, en la que se reticula el ácido hialurónico o se modifica covalentemente con un derivado de BDDE.

Se ha descubierto también que la concentración de agente de reticulación, es decir BDDE, usada durante la reticulación contribuye a la calidad de las composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado y, en última instancia, mejora determinadas propiedades de las hebras que se preparan a partir de tales composiciones. La cantidad de BDDE usada es suficiente para producir una composición que comprende al menos el 15% en moles de un derivado de BDDE en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico. En una realización, la composición comprende desde aproximadamente el 15% en moles hasta aproximadamente el 25% por ciento en moles, o de aproximadamente el 17% en moles a aproximadamente el 20% en moles del derivado de BDDE, o de aproximadamente el 18% en moles a aproximadamente el 19% en moles. En una realización, la composición comprende el 18,75% del derivado de BDDE.

La cantidad de BDDE seleccionada será suficiente como para proporcionar una composición firme. Por ejemplo, los geles se vuelven cada vez más firmes cuando la concentración de BDDE usada durante la reticulación es de al menos aproximadamente el 10% en peso en relación con el peso del ácido hialurónico. La cantidad de BDDE usada durante la reticulación, tras la formación de la composición que comprende ácido hialurónico reticulado, puede expresarse también como un % en peso en relación con el peso del ácido hialurónico usado durante la reticulación. En una realización, se usa entre el 25% en peso y el 100% en peso de BDDE en relación con el peso de ácido

hialurónico. En otra realización, se usa al menos el 30% de BDDE en relación con el peso de ácido hialurónico. En otra realización, se usa aproximadamente el 30% de BDDE en relación con el peso de ácido hialurónico. En otra realización, se usa al menos el 40% de BDDE en relación con el peso de ácido hialurónico. En otra realización, se usa aproximadamente el 40% de BDDE en relación con el peso de ácido hialurónico. En otra realización, se usa al menos el 50% de BDDE en relación con el peso de ácido hialurónico. En otra realización, se usa aproximadamente el 50% de BDDE en relación con el peso de ácido hialurónico. En otra realización, se usa entre aproximadamente el 50% de BDDE y aproximadamente el 75% de BDDE en relación con el peso de ácido hialurónico. En otra realización, se usa entre aproximadamente el 75% de BDDE y aproximadamente el 100% de BDDE en relación con el peso de ácido hialurónico.

En determinados aspectos, se reticula ácido hialurónico o se modifica covalentemente para formar composiciones que comprenden ácido hialurónico sustancialmente reticulado. En determinadas realizaciones, la cantidad de agente de reticulación incorporado en el mismo, o la densidad de reticulación, debe ser suficientemente alta de manera que la hebra formada de ese modo sea elastomérica, sin embargo no debe ser tan alta que la hebra resultante se vuelva demasiado rígida de manera que no pueda moverse dentro de la piel durante la administración cuando se usa como un producto de aumento de tejidos blandos. El módulo elástico o rigidez apropiados se determina mediante el uso previsto de la hebra.

Lavado, secado y formulación de ácido hialurónico reticulado

Tras haberse preparado el ácido hialurónico reticulado, puede eliminarse por lavado cualquier exceso de agente de reticulación. El aclarado con agua sola normalmente no es suficiente para eliminar todo el agente de reticulación en exceso. El aclarado con agua puede ir seguido también de o reemplazarse por un tampón y/o disolvente de alcohol, tal como etanol para eliminar el BDDE sin reaccionar. Se contempla que puedan ser necesarios múltiples lavados para eliminar todo o sustancialmente todo el agente de reticulación en exceso. Se contempla además que los geles puedan cortarse en trozos más pequeños o extruirse a partir de una jeringa para mejorar la eficacia de las etapas de lavado.

En algunas realizaciones, los trozos de gel hidratados o lavados se han dimensionado. El dimensionamiento se logra cargando el gel en una jeringa y extruyéndolo a través de una aguja (normalmente una aguja roma de calibre 20 (G)) o a través de un tamiz (por ejemplo, tamiz de 355 µm). Puede realizarse más de una o incluso una serie de etapas de dimensionamiento usando el mismo tamiz o aguja o una de un calibre diferente, normalmente más pequeño, que la etapa de dimensionamiento previa. Por ejemplo, el gel puede extruirse en primer lugar a través de una aguja 20 G una o dos veces, y luego extruirse opcionalmente a través de una aguja 23 G o 25 G una o más veces. Cuantas más etapas de dimensionamiento se implementen, más suave será la hebra resultante. Tales resultados serían beneficiosos ya que una hebra más suave facilitaría la administración a través de la piel ya que la hebra más suave presentaría menos arrastre. Además, se contempla que etapas de dimensionamiento adicionales también puedan aumentar la resistencia a la tracción de la hebra. Por ejemplo, determinadas hebras que se han dimensionado una vez usando una aguja 20 G tienen una resistencia a la tracción de desde aproximadamente 0,381 libras hasta aproximadamente 0,476 libras, o de aproximadamente 0,436 libras. Determinadas hebras que se han dimensionado dos veces usando una aguja 20 G tienen una resistencia a la tracción de desde aproximadamente 0,416 libras hasta aproximadamente 0,579 libras, o de aproximadamente 0,479 libras. Determinadas hebras que se han dimensionado dos veces usando una aguja 20 G y luego una vez usando una aguja 25 G tienen una resistencia a la tracción de desde aproximadamente 0,462 libras hasta aproximadamente 0,605 libras, o de aproximadamente 0,529 libras.

Aunque la suavidad de la hebra se potencia implementando más de una etapa de dimensionamiento, el tamaño de partícula del gel no cambia sustancialmente (figura 14). La razón de hinchamiento de hebra no cambia sustancialmente con el dimensionamiento aumentado (entre 1,66 y 1,70 para una, dos y tres etapas de dimensionamiento), aunque el diámetro seco de la hebra disminuye ligeramente con el dimensionamiento aumentado.

En una realización, las composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, tal como se describió anteriormente, se secan sustancialmente (por ejemplo, se deshidratan) antes de combinarse adicionalmente con el aglutinante. En una realización, las composiciones de gel acuosas que comprenden ácido hialurónico reticulado, tal como se describió anteriormente, se secan sustancialmente (por ejemplo, se deshidratan) antes de combinarse adicionalmente con ácido hialurónico no reticulado. En algunas realizaciones, el secado se logra secando con aire o decantando en primer lugar el disolvente antes de secar con aire a temperaturas ambientales o elevadas. En una realización, el secado se logra mediante liofilización. En una realización, el secado es parcial.

En una realización, las composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, tal como se describió anteriormente, se aíslan por medio de precipitación a partir de un disolvente adecuado, tal como etanol, antes de combinarse adicionalmente con el aglutinante. La precipitación puede implementarse múltiples veces, es decir, más de una vez. En algunas realizaciones, el tamaño de partícula del gel aislado por medio de precipitación es sustancialmente del mismo tamaño que, o más pequeño que, las partículas del gel liofilizado. En determinadas realizaciones, las hebras preparadas a partir del gel aislado por medio de precipitación tienen un diámetro de hebra secada pequeño (por ejemplo, aproximadamente 0,014”-0,015”), aunque presentan velocidad de hinchamiento más

rápida, suavidad potenciada y diámetro de hinchamiento mayor.

En una realización, la composición de gel acuosa que comprende ácido hialurónico reticulado se deshidrata hasta eliminar aproximadamente el 25% del contenido de agua en peso. En una realización, la composición de gel acuosa que comprende ácido hialurónico reticulado se deshidrata hasta eliminar aproximadamente el 50% del contenido de agua en peso. En una realización, la composición de gel acuosa que comprende ácido hialurónico reticulado se deshidrata hasta eliminar aproximadamente el 75% del contenido de agua en peso. En una realización, la composición de gel acuosa que comprende ácido hialurónico reticulado se deshidrata hasta eliminar aproximadamente el 90% del contenido de agua en peso.

Se ha encontrado sorprendentemente que la concentración de sólidos de HA totales, incluyendo ácido hialurónico reticulado y aglutinante no reticulado, dentro de las composiciones de gel acuosas antes de la extrusión, mejora determinadas propiedades de las hebras tal como se describe en el presente documento tales como suavidad y facilidad de manipulación o bien antes o bien después de la extrusión.

La composición de ácido hialurónico reticulado secada, tal como se describió anteriormente, puede combinarse con agua para formar un gel de ácido hialurónico sustancialmente reticulado, que entonces se formula con un aglutinante (es decir, ácido hialurónico no reticulado) y/u opcionalmente un aditivo (por ejemplo, una sal, excipiente, lidocaína, o similar). La composición de gel formulada resultante que comprende ácido hialurónico reticulado, y ácido hialurónico no reticulado como aglutinante, pueden extruirse entonces para dar una hebra húmeda que puede secarse luego.

En una realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en la composición, antes del secado de la hebra y con ácido hialurónico no reticulado como aglutinante, en una cantidad de desde aproximadamente el 5% en peso hasta aproximadamente el 20% en peso basándose en el peso total de la composición. En todavía otra realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en la composición, antes del secado de la hebra y con ácido hialurónico no reticulado como aglutinante, en una cantidad de desde aproximadamente el 5% en peso hasta aproximadamente el 12% en peso o de aproximadamente el 8% en peso a aproximadamente el 10% en peso basándose en el peso total de la composición, excluyendo la humedad.

En una realización, se proporciona una composición que comprende el ácido hialurónico sustancialmente reticulado de cualquiera de las realizaciones anteriores, que se ha secado y rehidratado, y comprende además un aglutinante. En una realización, el aglutinante es ácido hialurónico no reticulado. En una realización, el aglutinante, es decir ácido hialurónico no reticulado, se proporciona como una disolución acuosa. En una realización, el aglutinante, es decir ácido hialurónico no reticulado, se proporciona como una disolución acuosa que comprende además una sal, tal como $CaCl_2$. En una realización, el aglutinante, es decir ácido hialurónico no reticulado, se proporciona como una disolución acuosa que comprende además $CaCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, $CaCl_2$ 10 mM o $CaCl_2$ más de 10 mM.

Aún otro hallazgo sorprendente ha sido que la calidad de las hebras secas tal como se describe en el presente documento depende, al menos parcialmente, de la cantidad de los sólidos de ácido hialurónico totales usados para preparar las composiciones de hebras húmedas, tal como se describió anteriormente. Los “sólidos de ácido hialurónico” incluyen cualquier combinación de ácido hialurónico sustancialmente reticulado y/o ácido hialurónico no reticulado (es decir, aglutinante). En algunas realizaciones, una cantidad mínima de sólidos de ácido hialurónico contribuye a la calidad de las hebras secas, por ejemplo, soportando la forma de sección transversal (por ejemplo, un diámetro relativamente redondo) de las hebras húmedas usadas para preparar las hebras secas. Una cantidad mínima de sólidos de ácido hialurónico puede contribuir además a la calidad de las hebras secas, por ejemplo, aumentando la resistencia a la tracción de las hebras secas y/o la razón de hinchamiento mediante lo cual las hebras secas absorben agua. Una cantidad mínima de sólidos de ácido hialurónico puede contribuir todavía adicionalmente a la calidad de las hebras secas aumentando la suavidad de las hebras secas. A continuación se describen a modo de ejemplo cantidades mínimas de sólidos de ácido hialurónico.

En una realización, la hebra húmeda comprende desde aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 50% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende desde aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 40% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende desde aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 20% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende al menos el 7% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende al menos el 10% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende al menos el 12% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende al menos el 15% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende al menos el 18% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende al menos el 20% de sólidos de ácido hialurónico. En una realización, la hebra húmeda comprende al menos el 25% de sólidos de ácido hialurónico.

Tal como se describió anteriormente, los sólidos de ácido hialurónico que se usan para preparar las hebras húmedas y secas tal como se describe en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de ácido hialurónico reticulado y/o ácido hialurónico no reticulado (es decir, aglutinante). Los ajustes en la cantidad y/o razón de ácido hialurónico reticulado y/o ácidos hialurónicos no reticulados pueden mejorar determinadas propiedades de las hebras (por ejemplo, la forma de sección transversal de las hebras húmedas, la resistencia a la tracción de las

hebras secas, la razón de hinchamiento mediante la cual las hebras secas absorben agua, la suavidad de las hebras secas, la resistencia de las hebras secas a la digestión enzimática *in vitro* mediante hialuronidasa, y/o una semivida *in vivo* aumentada).

En una realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en composiciones usadas para preparar hebras en una cantidad de desde aproximadamente el 1% en peso hasta aproximadamente el 25% en peso basándose en el peso total de la composición. En otra realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de desde aproximadamente el 2% en peso hasta aproximadamente el 15% en peso basándose en el peso total de la composición. En otra realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de aproximadamente el 14% en peso. En otra realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de aproximadamente el 12% en peso. En otra realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de aproximadamente el 8% en peso. En otra realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de aproximadamente el 5% en peso.

En una realización, el ácido hialurónico no reticulado está presente en composiciones usadas para preparar hebras en una cantidad de desde aproximadamente el 1% en peso hasta aproximadamente el 20% en peso basándose en el peso total de la composición. En otra realización, el ácido hialurónico no reticulado está presente en una cantidad de desde aproximadamente el 1% en peso hasta aproximadamente el 8% en peso basándose en el peso total de la composición. En otra realización, el ácido hialurónico no reticulado está presente en una cantidad de aproximadamente el 5% en peso. En otra realización, el ácido hialurónico no reticulado está presente en una cantidad de aproximadamente el 3% en peso. En otra realización, el ácido hialurónico no reticulado está presente en una cantidad de aproximadamente el 2% en peso.

En una realización, las composiciones usadas para preparar hebras comprenden desde aproximadamente el 5% en peso hasta aproximadamente el 15% en peso de ácido hialurónico reticulado y desde aproximadamente el 2% en peso hasta aproximadamente el 8% en peso de ácido hialurónico no reticulado. En una realización, la composición comprende aproximadamente el 12% en peso de ácido hialurónico reticulado y aproximadamente el 3% en peso de ácido hialurónico no reticulado. En una realización, la composición comprende aproximadamente el 8% en peso de ácido hialurónico reticulado y aproximadamente el 2% en peso de ácido hialurónico no reticulado. En una realización, la composición comprende aproximadamente el 5% en peso de ácido hialurónico reticulado y aproximadamente el 5% en peso de ácido hialurónico no reticulado. Pueden prepararse composiciones usadas para preparar hebras con concentraciones superiores o inferiores de HA y HA reticulado; las tres composiciones anteriores se proporcionan como ejemplos sólo.

Desaireación, extrusión y secado de geles para dar hebras

En algunas realizaciones, la composición de gel acuosa que comprende ácido hialurónico reticulado y no reticulado se desairea (es decir, se desgasifica), antes de la extrusión para minimizar las burbujas de aire tras la extrusión. La desgasificación también puede realizarse usando una jeringa. Se ha descubierto que la resistencia a la tracción de las hebras mejora generalmente tras la desaireación de las composiciones usadas para preparar las hebras.

En algunas realizaciones, las composiciones usadas para preparar las hebras se desairean al menos una vez. En algunas realizaciones, las composiciones usadas para preparar las hebras se desairean más de una vez. En algunas realizaciones, las composiciones usadas para preparar las hebras se desairean entre dos y diez veces. En algunas realizaciones, las composiciones usadas para preparar las hebras se desairean dos veces. En algunas realizaciones, las composiciones usadas para preparar las hebras se desairean tres veces, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces. En algunas realizaciones, las composiciones usadas para preparar las hebras se desairean al menos diez veces.

Para formar la hebra, la composición de gel acuosa que comprende ácido hialurónico reticulado y no reticulado se extruye normalmente sobre un sustrato, tal como se describe a continuación, para formar una hebra húmeda. La composición se extruye usando una jeringa presurizada fijada a una boquilla. La boquilla puede tener diversas geometrías, tales como diversas longitudes, diámetros internos y formas.

Generalmente, se ha descubierto que muchas de las propiedades de las composiciones de hebras secas pueden mejorarse mediante un tamaño de boquilla aumentado (por ejemplo, anchura) durante la extrusión de la hebra húmeda. Tales propiedades mejoradas en las hebras pueden incluir, por ejemplo, la forma de sección transversal de las hebras, la resistencia a la tracción de las hebras, la razón de hinchamiento mediante la cual las hebras absorben agua, la suavidad de las hebras, la resistencia de las hebras secas a la digestión enzimática *in vitro* mediante hialuronidasa y/o una semivida *in vivo* aumentada de las hebras secas.

La boquilla puede tener una forma circular o no circular, por ejemplo, una forma aplanada o una forma de “D”. La boquilla de la jeringa puede ser cualquiera de una boquilla de jeringa de desde aproximadamente calibre 15 hasta calibre 25. En algunas realizaciones, la boquilla de la jeringa es una boquilla de calibre 15, mientras que en otras realizaciones la boquilla de la jeringa es una boquilla de calibre 16. En algunas realizaciones, la boquilla de la jeringa es una boquilla de calibre 17, mientras que en otras realizaciones la boquilla de la jeringa es una boquilla de calibre

18. En algunas realizaciones, la boquilla de la jeringa es una boquilla de calibre 19, mientras que en otras realizaciones la boquilla de la jeringa es una boquilla de calibre 20. En algunas realizaciones, la boquilla de la jeringa es una boquilla de calibre 21, mientras que en otras realizaciones la boquilla de la jeringa es una boquilla de calibre 22. Normalmente, la presión empleada es de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 2000 psi o desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 240 psi. Los requisitos de presión vienen dictados por la geometría de la boquilla y otros atributos tales como la consistencia de la composición y la velocidad de flujo deseada. La presión puede aplicarse neumáticamente, por ejemplo usando aire ambiental o nitrógeno, hidráulicamente o mecánicamente. La velocidad a la que se extruye el gel tiene en consideración la minimización de las burbujas de aire en la longitud de la hebra y la maximización de una forma uniforme constante. Las burbujas de aire pueden reducir la integridad estructural de la hebra provocando puntos débiles.

La presión neumática y la velocidad de la placa no son fijas sino que en su lugar se ajustan y monitorizan en el procedimiento de modo que el gel se extruye de una manera continua, lineal. Para un lote dado de hebras, la presión neumática se aumenta en primer lugar hasta el punto de flujo de gel constante pero controlable. La velocidad de la placa se ajusta entonces de manera fina continuamente de modo que las hebras se extruyen de una manera lineal uniforme. Si la velocidad de la placa es demasiado lenta, pueden resultar hebras en zig-zag; demasiado rápida y las hebras pueden estirarse conduciendo a estricción y/o rotura.

Se contemplan diversos sustratos para su uso mediante los métodos descritos en el presente documento. Los sustratos incluyen sustratos hidrófilos e hidrófobos y pueden seleccionarse de, pero no se limitan a, politetrafluoroetileno (PTFE), PTFE expandido, nailon, poli(tereftalato de etileno) (PET), poliestireno, silicio, poliuretano y celulosa activada.

El sustrato empleado, junto con la viscosidad de la composición de gel, dicta la forma general de la hebra. Por ejemplo, si el gel y el sustrato tienen un ángulo de contacto de equilibrio de menos de 90 grados, se contempla que la hebra formada pueda tener sustancialmente forma de cinta. Además, si el gel y el sustrato tienen un ángulo de contacto de equilibrio de aproximadamente 90 grados, la hebra formada podría tener sustancialmente forma de D. Todavía adicionalmente, si el gel y el sustrato tienen un ángulo de contacto de equilibrio de más de 90 grados, entonces la hebra formada podría ser sustancialmente redonda. Por ejemplo, un gel de 1,5 MDa al 10% tendrá una sección transversal sustancialmente circular (por ejemplo, aproximadamente el 80% de un círculo) cuando se extruye sobre PTFE, mientras que un gel de 1,5 MDa al 5% formará una cinta plana cuando se extruye sobre PTFE.

Alternativamente a la extrusión presurizada, la composición de gel puede enrollarse para dar un cilindro alargado y/o cortarse en tiras alargadas antes de secarse.

La hebra húmeda se seca entonces para formar una hebra seca. El secado puede realizarse en condiciones estáticas o, alternativamente, con la ayuda de un flujo de aire dinámico (es decir, dentro de una cabina de flujo laminar). En algunas realizaciones, los rendimientos de las hebras mejoran con el secado estático. La etapa de secado se requiere para formar hebras con una resistencia a la tracción suficiente, tal como se comenta a continuación. Puesto que la hebra puede perder algunas de sus propiedades cuando se expone a calor en exceso de temperatura de ebullición de agua, se prefiere que la etapa de secado se realice en condiciones ambientales. Este procedimiento de secado proporciona una hebra con una mayor resistencia a la tracción, tal como, por ejemplo, una resistencia a la tracción final de aproximadamente 5 kpsi a 100 kpsi o de 20 kpsi a 80 kpsi. En otras palabras, las hebras descritas en el presente documento tienen una carga de fallo de al menos aproximadamente 0,1 libras o 0,22 kilogramos.

Se permite que la hebra se seque durante cualquiera desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 72 horas para formar hebras que tienen un diámetro de desde 0,05 mm hasta aproximadamente 1,0 mm y que tienen el 10%-30% en peso de hidratación. En algunas realizaciones, la hebra puede secarse durante aproximadamente 12 horas o aproximadamente 24 horas. Se contempla que cuanto mayor sea el peso molecular del HA empleado o más concentrado esté el HA en la composición, se requerirán tiempos de secado más prolongados. Además, durante el proceso de secado, puede emplearse un estímulo no térmico, tal como luz UV, radiación o un catalizador o iniciador químico para ayudar en la reacción de reticulación.

En algunas realizaciones, tras el secado, la hebra se lava con un disolvente acuoso o no acuoso, un gas o un fluido supercrítico. En algunos casos, este lavado elimina el agente de reticulación en exceso. El lavado puede lograrse mediante una variedad de métodos, tales como inmersión en un disolvente acuoso o usando un sistema de flujo simultáneo colocando la hebra en una depresión inclinada y permitiendo que un disolvente acuoso fluya sobre la hebra. Las hebras también pueden suspenderse, por ejemplo verticalmente, y lavarse haciendo gotear o fluir agua a lo largo de la longitud de la hebra.

En una realización, se usa agua para lavar las hebras. En esta realización, el agua no sólo lava las hebras para eliminar el agente de reticulación en exceso, también rehidrata la hebra para dar un estado elastomérico hidratado. En una realización, se usa una disolución de antioxidante para lavar las hebras. Por ejemplo, en una realización, se usa una disolución tampón que comprende ácido ascórbico, vitamina E y/o fosfato de sodio para lavar las hebras. En una realización, se usa una disolución tampón que comprende aproximadamente 1 mM, o aproximadamente 10 mM

o aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 1 M de ácido ascórbico para lavar las hebras.

El porcentaje de hidratación del ácido hialurónico puede oscilar desde aproximadamente el 1% hasta más de aproximadamente el 1000% basándose en el peso total. El porcentaje de hidratación de la hebra de la presente divulgación puede controlarse ajustando el porcentaje de ácido hialurónico en el gel y/o controlando la cantidad y el tipo de agente de reticulación añadido. Se contempla que un porcentaje de hidratación inferior de la hebra daría como resultado una hebra con una resistencia a la tracción superior. En algunas realizaciones, la hebra tiene no más de aproximadamente el 30% por ciento, o no más del 15%, o no más del 10% en peso de hidratación basándose en el peso total. El porcentaje de hidratación se determinará mediante el entorno al que se somete la hebra durante o tras el proceso de secado.

Debe indicarse que la semivida de la hebra de ácido hialurónico *in vivo* puede controlarse controlando el grosor de la hebra, la densidad, el grado de reticulación, el peso molecular del ácido hialurónico y el grado de hidratación, que pueden entonces controlarse adicionalmente ajustando las cantidades de ácido hialurónico y agente de reticulación tanto individual como relativamente. Se contempla que las hebras divulgadas en el presente documento puedan tener una semivida potenciada *in vivo* de desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 12 meses en comparación con menos de 1 día para ácido hialurónico natural. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tangan una semivida *in vivo* de al menos 1 mes. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 2 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 3 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 4 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 6 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 8 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 10 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 12 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 14 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 16 meses. En determinadas realizaciones, se contempla que las hebras descritas en el presente documento tengan una semivida *in vivo* de al menos 18 meses.

Se contempla que las hebras descritas en el presente documento puedan esterilizarse usando métodos de esterilización típicos conocidos en la técnica, tales como autoclave, óxido de etileno, haz de electrones (haz de e), CO_2 supercrítico (con peróxido), etc. Por ejemplo, las hebras descritas en el presente documento pueden esterilizarse usando métodos de esterilización de haz de electrones (haz de e). En algunas realizaciones, las hebras se lavan en primer lugar en una disolución tampón a alto pH (es decir, pH 9 o pH 10). En algunas realizaciones, las disoluciones de lavado comprenden además etanol, ácido ascórbico, vitamina E y/o fosfato de sodio.

Opcionalmente y según sea necesario, la hebra se estira mecánicamente cuando se hidrata, o bien poco después de hidratarse o bien gradualmente antes del primer secado o tras la rehidratación. El estiramiento o ausencia de estiramiento puede proporcionar una hebra de la longitud y/o volumen de hinchamiento de rehidratación deseados. En algunas realizaciones, la longitud de la hebra puede ser de desde aproximadamente 0,5 cm hasta aproximadamente 15 cm. En otra realización, la longitud de la hebra puede ser de desde aproximadamente 2 cm hasta aproximadamente 12 cm. En otra realización, la longitud de la hebra puede ser de desde aproximadamente 5 cm hasta aproximadamente 10 cm.

Tras rehidratarse la hebra, se permite que se seque de nuevo en condiciones ambientales durante cualquiera desde 30 minutos hasta aproximadamente 72 horas. Tras el secado, la hebra, en algunas realizaciones, se cura para proporcionar una superficie de la hebra más uniforme.

Esta etapa de hidratación/deshidratación de lavado puede realizarse múltiples veces para permitir que el reactivo sin reaccionar en exceso se lave de la hebra o para continuar mejorando el grado de reticulación o modificación covalente. Esto es una mejora con respecto a métodos tales como el uso de disolventes orgánicos para eliminar el BDDE en exceso.

3. Nomenclatura de hebras

Las hebras descritas en el presente documento se preparan a partir de composiciones que comprenden ácido hialurónico sustancialmente reticulado, y que comprenden además un aglutinante, es decir ácido hialurónico no reticulado. Las hebras pueden describirse según la siguiente nomenclatura AA/BB@XX/YY, en la que AA/BB describe la composición formada inicialmente que comprende ácido hialurónico sustancialmente reticulado y XX/YY describe la composición con un aglutinante, es decir ácido hialurónico no reticulado.

Por ejemplo, una hebra denominada “10/40@15/20” se refiere a una composición de ácido hialurónico

sustancialmente reticulado, en la que la reacción de reticulación se realiza con el 10% en peso de ácido hialurónico en relación con el peso de la disolución (por ejemplo, una disolución acuosa), usando el 40% en peso de agente de reticulación (por ejemplo, BDDE) en relación con el peso del ácido hialurónico.

Tal como se hace referencia en el presente documento, AA de AA/BB @XX/YY es al menos el 2%. En algunas realizaciones, AA es al menos el 5%. En algunas realizaciones, AA es aproximadamente el 8%. En algunas realizaciones, AA es aproximadamente el 10%. En algunas realizaciones, AA es al menos el 10%. En algunas realizaciones, AA es aproximadamente el 12%. En algunas realizaciones, AA es al menos el 15%.

En algunas realizaciones, BB de AA/BB@XX/YY es al menos el 10%. En algunas realizaciones, BB es al menos el 20%. En algunas realizaciones, BB es al menos el 30%. En algunas realizaciones, BB es aproximadamente el 30%. En algunas realizaciones, es al menos el 40%. En algunas realizaciones, BB es aproximadamente el 40%. En algunas realizaciones, BB es al menos el 50%. En algunas realizaciones, BB es aproximadamente el 50%.

En algunas realizaciones, AA/BB de AA/BB@XX/YY es aproximadamente 8/10. En algunas realizaciones, AA/BB es al menos o aproximadamente o exactamente 8/20. En algunas realizaciones, AA/BB es aproximadamente 8/30. En algunas realizaciones, AA/BB es aproximadamente 8/40. En algunas realizaciones, AA/BB es aproximadamente 8/50. En algunas realizaciones, AA/BB es aproximadamente 10/10. En algunas realizaciones, AA/BB es aproximadamente 10/20. En algunas realizaciones, AA/BB es aproximadamente 10/30. En algunas realizaciones, AA/BB es aproximadamente 10/40. En algunas realizaciones, AA/BB es aproximadamente 10/50.

En algunas realizaciones, se añade ácido hialurónico no reticulado como agente de unión o más agentes de unión a las composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, y las composiciones resultantes se convierten mediante métodos adicionales descritos en el presente documento para proporcionar hebras novedosas. En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado comprenden además ácido hialurónico no reticulado. El ácido hialurónico no reticulado añadido se denomina opcionalmente en el presente documento “aglutinante”. La combinación de ácido hialurónico reticulado y ácido hialurónico no reticulado, dentro de la composición, se denomina opcionalmente en el presente documento “sólidos de ácido hialurónico”. Tal como se hace referencia en el presente documento, el XX de AA/BB@XX/YY se refiere al % en peso de sólidos de ácido hialurónico totales en relación con el peso de la composición, en el que los sólidos de ácido hialurónico incluyen tanto el ácido hialurónico sustancialmente reticulado como cualquier ácido hialurónico no reticulado. Tal como se hace referencia en el presente documento, el YY de AA/BB @XX/YY se refiere al % en peso de ácido hialurónico no reticulado en relación con el peso de sólidos de ácido hialurónico totales.

En algunas realizaciones, XX de AA/BB@XX/YY es al menos el 2%. En algunas realizaciones, XX es al menos el 5%. En algunas realizaciones, XX es al menos el 10%. En algunas realizaciones, XX es aproximadamente el 10%. En algunas realizaciones, XX es al menos el 15%. En algunas realizaciones, XX es aproximadamente el 15%. En algunas realizaciones, XX es al menos el 20%. En algunas realizaciones, XX es aproximadamente el 20%. En algunas realizaciones, XX es al menos el 25%. En algunas realizaciones, XX es aproximadamente el 25%.

En algunas realizaciones, YY de AA/BB@XX/YY es al menos el 5%. En algunas realizaciones, YY es al menos el 10%. En algunas realizaciones, YY es al menos el 20%. En algunas realizaciones, YY es aproximadamente el 20%. En algunas realizaciones, YY es al menos el 30%. En algunas realizaciones, YY es aproximadamente el 30%. En algunas realizaciones, YY es al menos el 40%. En algunas realizaciones, YY es aproximadamente el 40%. En algunas realizaciones, YY es al menos el 50%. En algunas realizaciones, YY es aproximadamente el 50%.

En algunas realizaciones, AA/BB@XX/YY es 8/10@2/5, 8/20@5/10, 8/30@10/20, 8/40@15/20, 8/50@20/30, 10/10@20/40, 10/20@25/50, 10/30@20/40, 10/40@10/50, 10/50@20/40 y similares.

Se ha mostrado que las hebras proporcionadas usando las composiciones de AA/BB@XX/YY divulgadas en el presente documento presentan una persistencia *in vivo* potenciada, así como otras cualidades beneficiosas.

En determinadas realizaciones, se divulgan en el presente documento hebras que comprenden ácido hialurónico sustancialmente reticulado, en las que el ácido hialurónico se reticula sustancialmente con al menos aproximadamente el 15% en moles de un derivado de diglicidil éter de butanodiol (BDDE) en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico, y al menos aproximadamente el 5% de ácido hialurónico no reticulado en relación con el peso de sólidos de ácido hialurónico totales, en las que el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de desde aproximadamente el 60% en peso hasta aproximadamente el 90% en peso basándose en el peso total de la hebra excluyendo la humedad y el ácido hialurónico no reticulado está presente en una cantidad de desde aproximadamente el 10% en peso hasta aproximadamente el 40% en peso basándose en el peso total de la hebra excluyendo la humedad.

4. Modificación de las hebras

Además de lavar la hebra, también puede funcionalizarse adicionalmente adsorbiendo una cantidad suficiente de un miembro seleccionado del grupo que consiste en un agente terapéutico, un agente de diagnóstico, un agente

potenciador de la fibrogénesis, un agente que impide la biodegradación, un agente potenciador de la lubricidad y combinaciones de los mismos, opcionalmente seguido por volver a secar la hebra. Tales agentes terapéuticos incluyen agentes antibacterianos, anestésicos, colorantes para observar la colocación *in vivo*, y similares. En algunas realizaciones, una hebra seca o hidratada se recubre para alterar las propiedades con un biopolímero bioabsorbible, tal como colágeno, PEG, PLGA o un Pluronic™ de transferencia de fase que puede introducirse como un líquido y que se solidifica *in vivo.*

En una realización, la hebra puede recubrirse para modular la velocidad a la que se rehidrata la hebra. Por ejemplo, la hebra puede recubrirse con una capa hidrófoba, tal como un lípido. El grosor de la capa de lípido puede ajustarse entonces para lograr la velocidad de rehidratación deseada. En otra realización, la hebra puede recubrirse con una composición acuosa de ácido hialurónico no reticulado. Esto puede realizarse justo antes de la implantación de la hebra para actuar como lubricante. También se contempla que este recubrimiento con ácido hialurónico no reticulado pueda ralentizar la velocidad de hidratación de la hebra. En algunas realizaciones, la hebra se recubre, o bien totalmente o bien en parte, con la composición de gel para formar un material estratificado. Constructos tejidos, ya sean de una única capa o 3D, pueden recubrirse en su totalidad para crear telas o mallas con propiedades físicas alteradas con respecto a una malla no tejida.

Las hebras descritas en el presente documento pueden trenzarse, enrollarse, estratificarse o tejerse. En algunas realizaciones, pueden formarse trenzas a partir de las hebras descritas anteriormente. Puede formarse una trenza entrecruzando tres o más hebras en las que cada hebra es funcionalmente equivalente en zig-zag hacia delante a través de la masa solapante de las otras. Las trenzas pueden ser una estructura plana, de tres cadenas, o pueden construirse trenzas más complejas a partir de un número arbitrario (pero habitualmente impar) de hebras para crear un intervalo más amplio de estructuras, tales como bandas de tipo cinta más amplias, cuerdas cilíndricas huecas o sólidas, o esteras anchas que se asemejan a una onda perpendicular rudimentaria.

En una realización, se añade un plastificante para ajustar la rigidez de la hebra. Alternativamente, o además, pueden tejerse hebras de rigidez variable para producir una hebra o material trenzado que tiene la rigidez deseada.

En algunas realizaciones, puede construirse una estructura tridimensional tejiendo o envolviendo o enrollando o estratificando las hebras descritas anteriormente. En otras realizaciones, puede construirse una estructura tridimensional tejiendo o envolviendo o enrollando o estratificando las trenzas descritas anteriormente. En todavía otras realizaciones, puede construirse una estructura tridimensional tejiendo o envolviendo o enrollando o estratificando las cuerdas descritas anteriormente. En todavía otras realizaciones, puede construirse una estructura tridimensional tejiendo o envolviendo o enrollando o estratificando las mallas descritas anteriormente.

En algunas realizaciones, se proporciona un implante tridimensional, cilíndrico que se prepara con cualquiera de las hebras. Un uso a modo de ejemplo para un implante de este tipo es para la reconstrucción de pezones. En algunas realizaciones, las hebras usadas para preparar el implante cilíndrico se reticulan e incluyen compuestos de adhesión de condrocitos. En otras realizaciones, la forma cilíndrica se proporciona mediante múltiples hélices múltiples, concéntricas de las hebras.

Realizaciones de hebras

En un aspecto, se proporciona una hebra seca que comprende ácido hialurónico, en la que al menos una porción del ácido hialurónico se reticula sustancialmente con al menos aproximadamente el 15% en moles de un derivado de BDDE en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico. En otra realización, el ácido hialurónico sustancialmente reticulado se reticula con desde aproximadamente el 15% en moles hasta aproximadamente el 20% en moles del derivado de BDDE. En una realización, el ácido hialurónico sustancialmente reticulado se reticula con desde aproximadamente el 16% en moles hasta aproximadamente el 19% en moles del derivado de BDDE.

En una realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de desde aproximadamente el 50% en peso hasta aproximadamente el 90% en peso basándose en el peso total de la hebra seca. En otra realización, el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de desde aproximadamente el 60% en peso hasta aproximadamente el 80% en peso basándose en el peso total de la hebra seca.

En una realización, la hebra seca comprende además un aglutinante, tal como por ejemplo, ácido hialurónico no reticulado. El ácido hialurónico no reticulado puede estar presente en una cantidad de desde aproximadamente el 1% en peso hasta aproximadamente el 50% en peso basándose en el peso total de la hebra seca. En una realización, el ácido hialurónico no reticulado está presente en una cantidad de desde aproximadamente el 15% en peso hasta aproximadamente el 20% en peso basándose en el peso total de la hebra seca.

En otra realización, la hebra seca tiene una resistencia a la tracción final de desde aproximadamente 2 kpsi hasta aproximadamente 20 kpsi. En una realización, la hebra tiene una resistencia a la tracción final de desde aproximadamente 4 kpsi hasta aproximadamente 10 kpsi.

En otra realización, la hebra seca tiene un diámetro de al menos aproximadamente 0,004 pulgadas. En una realización, la hebra seca tiene un diámetro de desde aproximadamente 0,008 hasta aproximadamente 0,018 pulgadas.

En otra realización, la hebra seca tiene una razón de peso/longitud de desde aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 3,5 mg/pulgada.

En una realización, la hebra seca tiene una carga de fallo de aproximadamente 0,3 libras o mayor. En otra realización, la hebra seca tiene una carga de fallo de desde aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 1,3 libras.

En una realización, la hebra seca comprende además una aguja.

En aún otro aspecto, se proporciona una hebra seca que comprende ácido hialurónico sustancialmente reticulado preparado mediante las etapas de: a) formar una composición de ácido hialurónico sustancialmente reticulado poniendo en contacto ácido hialurónico con BDDE; b) añadir ácido hialurónico no reticulado a la composición de ácido hialurónico sustancialmente reticulado; c) extruir la composición de ácido hialurónico sustancialmente reticulado para formar una hebra húmeda; y d) secar la hebra húmeda para formar una hebra seca.

En una realización, se pone en contacto desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 15% en peso de ácido hialurónico con desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 8% en peso de BDDE en relación con el peso del ácido hialurónico. En otra realización, el ácido hialurónico se pone en contacto con aproximadamente el 40% en peso de BDDE en relación con el peso del ácido hialurónico. En una realización, el ácido hialurónico reticulado se reticula con al menos aproximadamente el 15% en moles de un derivado de BDDE en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico. En otra realización, el ácido hialurónico reticulado se reticula con desde aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 25% en moles del derivado de BDDE en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico. En una realización, el ácido hialurónico reticulado se reticula con desde aproximadamente el 17 hasta aproximadamente el 20% en moles del derivado de BDDE en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico. En otra realización, el ácido hialurónico reticulado se reticula con al menos aproximadamente el 12% en peso del derivado de BDDE en relación con el peso del ácido hialurónico.

En una realización, se pone en contacto al menos el 5% de ácido hialurónico con desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 8% en peso de BDDE en relación con el peso de la composición de ácido hialurónico. En otra realización, se pone en contacto aproximadamente el 8% de ácido hialurónico con desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 8% en peso de BDDE en relación con el peso de la composición de ácido hialurónico. En una realización, se pone en contacto aproximadamente el 10% de ácido hialurónico con desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 8% en peso de BDDE en relación con el peso de la composición de ácido hialurónico.

En una realización, la composición formada poniendo en contacto ácido hialurónico con BDDE comprende ácido hialurónico reticulado en una cantidad de desde aproximadamente el 1% en peso hasta aproximadamente el 50% en peso de ácido hialurónico basándose en el peso total de la composición. En una realización, la composición formada poniendo en contacto ácido hialurónico con BDDE comprende ácido hialurónico reticulado en una cantidad de desde aproximadamente el 5% en peso hasta aproximadamente el 20% en peso de ácido hialurónico basándose en el peso total de la composición. En otra realización, la hebra seca comprende además secar la composición formada poniendo en contacto ácido hialurónico con BDDE.

En una realización, se añade desde aproximadamente el 1% en peso hasta aproximadamente el 50% en peso de ácido hialurónico no reticulado, basándose en el peso total de la composición. En otra realización, se añade desde aproximadamente el 2% en peso hasta aproximadamente el 15% en peso de ácido hialurónico no reticulado, basándose en el peso total de la composición. En otra realización, se añade aproximadamente el 3% en peso de ácido hialurónico no reticulado, basándose en el peso total de la composición.

En una realización, la hebra seca tiene una resistencia a la tracción final de desde aproximadamente 2 kpsi hasta aproximadamente 20 kpsi. En una realización, la hebra seca tiene una resistencia a la tracción final de aproximadamente 20 kpsi o mayor.

En una realización, la hebra seca tiene una carga de fallo de aproximadamente 0,3 libras o mayor. En una realización, la hebra tiene una carga de fallo de desde aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 1,3 libras.

En una realización, se proporciona una hebra según cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la hebra se esteriliza de manera terminal.

5. Hebras de ácido hialurónico reticulado para su uso en métodos

Las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento

pueden usarse, por ejemplo, en un método para rellenar arrugas, para rellenar aneurismas, ocluir el flujo sanguíneo a tumores, (es decir, oclusión de tumores), en cirugía de párpados de ojos, en aumento de pene (por ejemplo, para aumento de tamaño o para reducción de la sensibilidad, es decir, tratamiento de la eyaculación precoz), dispositivos de administración internasal (barrera hematoencefálica) para agentes de diagnóstico y/o terapéuticos, implantes corneales para administración de fármacos, aumento o reconstrucción de nariz, aumento o reconstrucción de labios, aumento o reconstrucción facial, aumento o reconstrucción del lóbulo de la oreja, implantes espinales (por ejemplo, para soportar un disco protuberante), material de relleno del conducto radicular (medicado con agente terapéutico), insuficiencia glótica, terapia fotorrefractiva láser (por ejemplo, hebra/onda de ácido hialurónico usada como almohadilla), armazón para el recrecimiento de órganos, tratamiento de la médula espinal (BDNF y NGF), en enfermedad de Parkinson (administración estereotáctica), administración precisa de moléculas terapéuticas o de diagnóstico, en implantación en la pulpa, tratamiento de conducto radicular de pulpa de reemplazo, sistema de conducto radicular conformado, terapia de heridas con presión negativa, barreras de adhesión (por ejemplo, adhesiones abdominal, pélvica, cardiaca, espinal y tendinosa), vendajes de heridas, matriz dérmica acelular, administración de fármacos no hidráulica (por ejemplo, dolor (ortopédica), oftálmica, etc.), administración de fármacos luminal (por ejemplo, hipertrofia prostática, enfermedad de Crohn, estenosis vascular, etc.), y administración de fármacos local, sostenida.

Hebras para su uso en métodos de tratamiento de una arruga

La reparación de tejidos podría prolongar los efectos de “material de relleno” de la hebra cuando se usa para tratar o rellenar una arruga *in vivo* mucho más allá de la semivida de la hebra basada en ácido hialurónico tal como se describe en el presente documento. Esto se describe en el ejemplo 11.

En algunas realizaciones, se describe una hebra tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una arruga en un paciente que lo necesita 1) insertando la hebra en la dermis o el espacio subcutáneo del paciente adyacente a o bajo la arruga; y 2) aplicando la hebra adyacente a o bajo la arruga tratando de ese modo la arruga. Estas etapas pueden realizarse al menos una vez y hasta 6 veces para tratar cada arruga. En algunas realizaciones, la hebra se une al extremo proximal de una aguja tal como se muestra en las figuras 2, 3A y 3B. La hebra se inserta mediante una aguja, aguja que luego se retira. Opcionalmente y según sea necesario, la hebra se hidrata con agua o solución salina, o mediante los fluidos que perfunden normalmente el tejido circundante. Además, el resto de la arruga puede rellenarse con un material biocompatible tal como un Pluronic™ de transferencia de fase que puede introducirse como un líquido y que se solidifica *in vivo.* Alternativamente, puede introducirse gel de ácido hialurónico convencional para rellenar la arruga. En cualquier caso, la banda formada actúa manteniendo el material de relleno biocompatible en el sitio de la arruga.

En algunas realizaciones, se proporciona una hebra tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una arruga en un sujeto. En algunas realizaciones, el médico encargado puede adormecer el área de tratamiento según procedimientos conocidos en la técnica usando una variedad de anestésicos, incluyendo, pero sin limitarse a, lidocaína tópica, hielo o un bloque con inyección de lidocaína. Por ejemplo, la arruga puede estar en la región periorbital tal como se ilustra en la figura 4A. La hebra puede unirse a una aguja tal como se ilustra, por ejemplo, en las figuras 2, 3A y 3B. El extremo distal de la aguja puede insertarse a través de la superficie de la piel del sujeto en la dermis adyacente a o dentro de la arruga tal como se ilustra, por ejemplo, en la figura 4B. En algunas realizaciones, la hebra se inserta en el espacio subcutáneo en lugar de la dermis. La aguja puede atravesar entonces la dermis o el espacio subcutáneo del sujeto por debajo de la arruga tal como se ilustra, por ejemplo, en la figura 4C. La aguja puede entonces salir de la piel del sujeto en el margen opuesto de la arruga, tal como se ilustra, por ejemplo, en la figura 4D. Entonces puede tirarse de la aguja distalmente hasta que se retira del sujeto de manera que se tira de la hebra hasta la ubicación previamente ocupada por la aguja por debajo de la arruga, tal como se ilustra, por ejemplo, en la figura 4E. Finalmente, se corta la hebra en exceso de la aguja en la superficie de la piel del sujeto dejando la hebra implantada tal como se ilustra, por ejemplo, en la figura 4F.

La hebra para su uso en el método anterior puede tratar satisfactoriamente arrugas tal como se muestra en las figuras 5A, 5B y 5C. Una arruga típica se ilustra en la figura 5A. La figura 5B ilustra una hebra implantada por debajo de una arruga que aún no está hidratada. A medida que la hebra implantada por debajo de la arruga se hidrata completamente, el aspecto superficial de la arruga se aplana simultáneamente tal como se ilustra en la figura 5C.

En algunas realizaciones, la hebra se manipula de un modo tal que un extremo de la hebra es suficientemente duro de manera que la hebra se usa para penetrar en la piel. Esto puede lograrse recubriendo la hebra con un material de endurecimiento, tal como un recubrimiento de azúcar. En otra realización, la hebra se recubre en su totalidad, por ejemplo con un recubrimiento de azúcar, para proporcionar a la hebra de resistencia columnar aumentada.

Contorneado facial

Las hebras descritas en el presente documento son para su uso en el contorneado facial. Lo que quiere decirse mediante contorneado facial es que las hebras pueden aplicarse a cualquier área de la cara, el cuello o el pecho que el paciente desee que se aumente, incluyendo, a modo de ejemplo sólo, los labios, el pliegue nasolabial y el pliegue

nasoyugal.

El aumento de labios es un procedimiento estético frecuentemente deseado. Normalmente, el objetivo estético son labios más llenos, más abultados. Las opciones de tratamiento disponibles para el aumento de labios incluyen materiales de relleno temporales tales como Restylane® y Juvederm®, materiales de relleno permanentes tales como implantes ArteFill®, Radiesse® y Goretex®, así como procedimientos quirúrgicos. Las áreas de potenciación pueden incluir el borde bermellón (o rollo blanco) para el contorneado y borramiento de los labios y la unión mucosa húmeda-seca para aumento del volumen. Otras técnicas incluyen infiltración más difusa del músculo orbicular de la boca.

El aumento y contorneado de los labios mediante productos de aumento de tejidos blandos temporales es una opción popular, de bajo riesgo debido a la invasividad mínima y naturaleza temporal del procedimiento. Las desventajas principales de los productos de aumento de tejidos blandos usados actualmente en procedimientos de labios son que es (a) doloroso, (b) difícil de inyectar de manera constante y homogénea el gel en la ubicación deseada, y (c) el gel puede migrar a lo largo de la vida útil del implante provocando que los resultados estéticos cambien.

La presente divulgación aborda las desventajas descritas anteriormente. Más allá de abordar las desventajas enumeradas anteriormente para productos de aumento de tejidos blandos temporales existentes descritos anteriormente, se ha encontrado que el método basado en hebras de HA de potenciación del aspecto de los labios es muy rápido. Un paciente típico puede tener 3 hebras en su(s) labios(s) en sólo 3 minutos. Los procedimientos de labios con productos de aumento de tejidos blandos actuales pueden tardar de 15 a 20 minutos.

En realizaciones dirigidas al contorneado facial, el médico encargado puede adormecer el área de tratamiento según procedimientos conocidos en la técnica usando una variedad de anestésicos, incluyendo, pero sin limitarse a, lidocaína tópica, hielo o un bloque con inyección de lidocaína. Las hebras preparadas con HA (ácido hialurónico) pueden unirse al extremo proximal de una aguja y tirarse de las mismas en el labio. La aguja puede servir como guía precisa, y también usarse para predecir y corregir la ubicación del implante antes de tirar de la hebra hasta la ubicación deseada. Este mecanismo de administración preciso puede usarse para administrar hebras a lo largo del borde bermellón para un contorneado, superficialmente si se desea, así como en la unión húmeda-seca para rellenar, más profundamente en el labio si se desea.

Se contempla que cuando la hebra se usa para el contorneado facial, pueda usarse cualquier número de hebras dependiendo del efecto deseado y el tamaño de la hebra. Por ejemplo, la descripción del procedimiento realizado para el contorneado y aumento de labios se comenta más adelante en el ejemplo 11.

Se ha encontrado sorprendente e inesperadamente que las hebras pueden ser para su uso en implantación en diversos planos de tejido del paciente para proporcionar un aspecto más natural cuando se realiza un contorneado facial. Por ejemplo, las hebras pueden ser para su uso en implantación de una manera que forma una hamaca en la ubicación deseada. Dadas las propiedades únicas de las hebras descritas en el presente documento, el médico encargado puede depositar o implantar las hebras en la epidermis, la dermis y/o la capa subcutánea.

Esta técnica se permite por la precisión con la que las hebras pueden colocarse, y su tamaño relativo con respecto a la dermis y estructuras subyacentes. Las hebras pueden conferir diferentes efectos sobre características faciales tales como arrugas, contornos, pliegues y depresiones dependiendo de en dónde se implanten.

Por ejemplo, la experiencia clínica reciente indica que la colocación de una hebra (en este caso, una que tenía aproximadamente 008” de diámetro) de manera profunda, por ejemplo en el espacio subcutáneo, a lo largo del eje de una arruga de la frente puede ayudar a suavizar entonces el aspecto de la arruga que se forma cuando el paciente se anima, flexionando su frente (lo que normalmente exacerbaría el aspecto de la arruga). Estos tipos de arrugas dinámicas sólo se tratan bien actualmente con Botox®, que tiene el efecto no deseado de impedir que el paciente exprese todas las expresiones faciales. Además, la experiencia clínica reciente muestra que las arrugas estáticas, las que son visibles en reposo, pueden tratarse eficazmente mediante la colocación de una hebra (de desde 0,004 hasta 0,008” de diámetro) superficialmente, por ejemplo dentro de la dermis.

La técnica de estratificación de planos de tejido de implantes de hebras también se usa satisfactoriamente en la mejora del aspecto de los pliegues nasolabiales (hasta 4x hebras de 0,008”), líneas glabelares, líneas de marioneta y labios.

Esta es otra técnica que se permite mediante las hebras de HA y su método de implantación. Para suavizar el aspecto de huecos o depresiones tales como el pliegue nasoyugal, o de otra forma el contorno de la cara en áreas tales como los huesos de las mejillas, la barbilla, por ejemplo, pueden implantarse hebras en patrones de trama (véase la figura 7A) y/o trama cruzada (véase la figura 7B) para tratar áreas mayores que la anchura de una única hebra. Tal como se observa en las figuras 7A y 7B, se han suavizado eficazmente los pliegues nasoyugales de dos pacientes colocando hebras paralelas en un caso (figura 7A) y en trama cruzada en otro caso (figura 7B). La trama cruzada podría realizarse oblicuamente a la dirección inicial, como fue el caso en la figura 7B, o perpendicularmente.

Además, las tramas pueden ser en diferentes planos de tejido también.

En otra realización de esta técnica, la trama puede realizarse oblicuamente a la dirección del área que está tratándose. Por ejemplo, en la figura 7A las hebras se colocan alineadas al eje del pliegue nasoyugal. En su lugar, las hebras podrían colocarse oblicuamente al eje del pliegue nasoyugal para soportar el tejido en el área de manera diferente.

Se contempla que la implantación de las hebras en diversos planos también puede realizarse en el tratamiento de arrugas tal como se describió anteriormente.

Terapia de heridas

En algunas realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son para su uso en vendajes de heridas incluyendo vendajes de heridas con presión negativa.

En algunas realizaciones, el vendaje de heridas permanece en contacto con la herida durante al menos 72 horas. En otras realizaciones, el vendaje de heridas con presión negativa permanece en contacto con la herida durante al menos 1 semana. En todavía otras realizaciones, el vendaje de heridas permanece en contacto con la herida durante al menos 2 semanas. En todavía otras realizaciones, el vendaje de heridas permanece en contacto con la herida durante al menos 3 semanas. En todavía otras realizaciones, el vendaje de heridas permanece en contacto con la herida durante al menos 4 semanas. En las realizaciones anteriores, debe entenderse que el tejido de granulación no retiene las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento ya que estos componentes pueden absorberse completamente. En algunas de estas realizaciones, el vendaje de heridas tiene entre aproximadamente 1 cm y aproximadamente 5 cm de grosor. Por consiguiente, en algunas de estas realizaciones, puede lograrse el cierre del lecho de la herida sin cambiar el vendaje.

En algunas realizaciones, las mallas tejidas descritas en el presente documento son para su uso en vendajes de heridas incluyendo vendajes de heridas con presión negativa. En otras realizaciones, el vendaje incluye entre 2 y aproximadamente 10 capas de mallas tejidas.

En todavía otras realizaciones, las mallas tejidas comprenden hebras idénticas. En todavía otras realizaciones, las mallas tejidas comprenden hebras diferentes.

En algunas realizaciones, las mallas tejidas tienen entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 2 mm de grosor cuando están secas. En otras realizaciones, las mallas tejidas tienen entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 4 mm de grosor cuando están secas.

En algunas realizaciones, el tamaño de poro de la malla tejida es de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 10 mm de anchura. En otras realizaciones, el tamaño de poro de la malla tejida es de entre aproximadamente 0,3 mm y aproximadamente 0,6 mm de anchura. En todavía otras realizaciones, los poros de la malla tejida están alineados. En todavía otras realizaciones, los poros de la malla tejida están escalonados. En todavía otras realizaciones, las mallas tejidas se coliman para crear poros de tamaño deseado.

En algunas realizaciones, la malla tejida es estable mecánicamente a un nivel de vacío mínimo de aproximadamente 75 mm de Hg. En otras realizaciones, la malla tejida es estable mecánicamente a un vacío de hasta aproximadamente 150 mm de Hg.

En algunas realizaciones, la malla tejida incluye colágeno. En otras realizaciones, el vendaje se une a una espuma de poliuretano. En todavía otras realizaciones, la espuma de poliuretano es de células abiertas. En todavía otras realizaciones, el vendaje se une a una película fina. En todavía otras realizaciones, la película fina es de silicona o poliuretano. En todavía otras realizaciones, el vendaje se une a la película fina con un adhesivo soluble en agua.

En algunas realizaciones, la hebra para su uso en el vendaje incluye un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

En algunas realizaciones, se proporciona un vendaje de heridas con presión negativa (Johnson *et al.*, patente estadounidense n.º 7.070.584, Kemp *et al.*, patente estadounidense n.º 5.256.418, Chatelier *et al.*, patente estadounidense n.º 5.449.383, Bennet *et al.*, patente estadounidense n.º 5.578.662, Yasukawa *et al.*, patentes estadounidenses n.ºs 5.629.186, 5.780.281 y 7.611.500) para su uso en la cicatrización de heridas inducida por vacío, particularmente heridas de superficies abiertas (Zamierski patentes estadounidenses n.ºs 4.969.880, 5.100.396, 5,261.893, 5.527.293 y 6.071.267 y Argenta *et al.*, patentes estadounidenses n.ºs 5.636.643 y 5.645.081). El vendaje incluye una almohadilla que se adapta a la ubicación de la herida, un sello estanco al aire que puede adherirse de manera retirable a la almohadilla, una fuente de presión negativa en comunicación de fluido con la almohadilla y las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento unidas a la superficie en contacto con la herida de la almohadilla. La almohadilla, el sello y la fuente de

vacío se implementan tal como se describe en la técnica anterior.

En otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son estables mecánicamente a un nivel de vacío mínimo de aproximadamente 75 mm de Hg. En todavía otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son estables mecánicamente a un vacío de hasta aproximadamente 150 mm de Hg. En todavía otras realizaciones, el vendaje incluye al menos una capa de malla tejida. En todavía otras realizaciones, el vendaje incluye entre 2 y aproximadamente 10 capas de malla tejida.

En algunas realizaciones un tubo conecta la almohadilla a la fuente de presión negativa. En todavía otras realizaciones, se inserta un bote retirable entre la almohadilla y la fuente de presión negativa y está en comunicación de fluido con tanto la almohadilla como la fuente de presión negativa.

En algunas realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento no están hidratadas. Por consiguiente, en estas realizaciones, el vendaje podría absorber exudados de la herida cuando se colocan en contacto con la herida. En otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento están hidratadas. Por consiguiente, en estas realizaciones, el vendaje podría mantener la herida húmeda cuando se coloca en contacto con la herida.

En algunas realizaciones, se conecta un orificio de entrada a un fluido con la almohadilla. Por consiguiente, en estas realizaciones, podría dispensarse fluido en la herida. En algunas realizaciones, el fluido es solución salina. En otras realizaciones, el fluido contiene agentes de diagnóstico o terapéuticos.

En algunas realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son para su uso como barreras de adhesión. En algunas realizaciones, las mallas tejidas descritas en el presente documento son para su uso en barreras de adhesión. En algunas realizaciones, las barreras de adhesión pueden ser para su uso en una implementación conjuntamente con otros tipos de barreras de adhesión, tales como líquidos, geles, pulverizaciones, otras películas o sólidos, productos farmacéuticos y/o terapias celulares.

Tratamiento de pérdida del cabello

En algunas realizaciones, se describe una hebra para su uso en un método de tratamiento de la pérdida de cabello en un sujeto. Un sujeto tal como, por ejemplo, un hombre con calvicie de patrón masculino típica puede tratarse con una hebra, opcionalmente unida a una aguja, tal como se ilustra, por ejemplo, en las figuras 2, 3A y 3B. El extremo distal de la aguja puede insertarse en una de las líneas de cabello. La aguja puede entonces atravesar el área por debajo de la línea de cabello del sujeto y puede entonces salir de la piel del sujeto. Entonces puede tirase de la aguja distalmente hasta que se retira del sujeto de manera que se tira de la hebra hasta la ubicación previamente ocupada por la aguja. Finalmente, se corta la hebra en exceso de la aguja en la superficie de la piel del sujeto dejando la hebra implantada. En algunas realizaciones, la hebra comprende además uno o más compuestos que promueven el crecimiento del cabello.

Tratamientos médicos y quirúrgicos adicionales

En algunas realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son para su uso como productos de aumento de tejidos blandos en diversas aplicaciones estéticas tal como se describió anteriormente. En otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son para su uso como suturas en diversas aplicaciones médicas y/o quirúrgicas. En todavía otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son para su uso en cirugía oftalmológica, administración de fármacos e inyección intraarticular. En otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son para su uso como barreras de adhesión, por ejemplo para tratar adhesiones abdominales, pélvicas, cardiacas, espinales y/o tendinosas. En otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento se incorporan en una matriz dérmica acelular. Se contempla que una matriz dérmica acelular integrada con las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento proporcione una revascularización y/o integración biológica mejoradas. Las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento pueden comprender además otros biomateriales regenerativos, productos biológicos y/o farmacológicos. En otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento se usan como dispositivos de administración de fármacos local, sostenida. En algunas realizaciones, los fármacos incluyen reserpina, guanetidina, fenoxibenzamina y fentolamina, hexametonio, 6-hidroxidopamina, tetrodotoxina, glutamato, etc. En otras realizaciones, las hebras, trenzas, cuerdas, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento son para su uso como endoprótesis de elución de fármacos pasiva.

En algunas realizaciones, se describe una hebra para su uso en un método para tratar tumores en un sujeto que lo

necesita. La hebra puede unirse a una aguja tal como se ilustra, por ejemplo, en las figuras 2, 3A y 3B. El extremo distal de la aguja puede insertarse en el tumor del sujeto. La aguja puede entonces atravesar el tumor y puede entonces salir del tumor. Entonces puede tirarse distalmente de la aguja hasta que se retira del tumor del sujeto de manera que se tira de la hebra hasta la ubicación previamente ocupada por la aguja. Finalmente, se corta la hebra en exceso de la aguja dejando la hebra implantada en el tumor del sujeto. En algunas de las realizaciones anteriores, la hebra incluye un agente anticancerígeno. En algunas realizaciones, la hebra se reticula e incluye inhibidores de Bcl-2.

En una realización a modo de ejemplo, las hebras de la presente divulgación pueden ser para su uso para tratar tumores pancreáticos. Puede accederse al páncreas mediante cirugía o métodos mínimamente invasivos tal como mediante laparoscopia. El extremo distal de la aguja puede insertarse en el tumor pancreático. La aguja puede entonces atravesar el tumor pancreático y puede entonces salir del tumor. Entonces puede tirarse distalmente de la aguja hasta que se retira del tumor pancreático de manera que se tira de la hebra hasta la ubicación previamente ocupada por la aguja. Finalmente, se corta la hebra en exceso de la aguja dejando la hebra implantada en el tumor pancreático. El procedimiento puede repetirse cualquier número de veces para proporcionar un tumor pancreático en el que se han implantado varias hebras. En algunas realizaciones, la hebra incluye un agente anticancerígeno.

En algunas realizaciones, se describe una hebra para su uso en un método para tratar una vena varicosa en un sujeto que lo necesita. La hebra puede unirse a una aguja tal como se ilustra, por ejemplo, en las figuras 2, 3A y 3B. El extremo distal de la aguja puede insertarse en la vena varicosa del sujeto. La aguja puede entonces atravesar la vena varicosa y puede entonces salir de la vena. Entonces puede tirarse distalmente de la aguja hasta que se retira de la vena varicosa del sujeto de manera que se tira de la hebra hasta la ubicación previamente ocupada por la aguja. Finalmente, se corta la hebra en exceso de la aguja dejando la hebra implantada en la vena varicosa del sujeto. En algunas realizaciones, la aguja es flexible. En otras realizaciones, la hebra se enrolla cuando se hidrata, ocluyendo más fácilmente el vaso.

En algunas realizaciones, se describe una hebra para su uso en un método para la reconstrucción de pezones en el que se implanta un implante cilíndrico, tridimensional que comprende hebras reticuladas por debajo de la piel. El implante puede incluir agentes terapéuticos, por ejemplo compuestos de adhesión de condrocitos.

En algunas realizaciones, se describen hebras para su uso en métodos para el recrecimiento de nervios o vasos. Tal como se ilustra en la figura 6, puede usarse una aguja para colocar una hebra en una línea específica, lo que podría promover la regeneración de nervios o vasos.

6. Kits

También se proporciona en el presente documento un kit de partes que comprende una hebra y un medio para administrar o implantar la hebra en un paciente. En una realización, el medio para la administración a un paciente es una jeringa o una aguja. En otra realización, el medio para la administración a un paciente es una pistola de aire. El tamaño (o diámetro) de la aguja puede depender del uso de la hebra, y por tanto también puede basarse en el área de sección transversal de la hebra usada. El diámetro externo de la aguja o jeringa puede ser mayor o igual al área de sección transversal de la hebra usada para disminuir el requisito de tracción de la hebra a medida que se aplica a la dermis. Se contempla además que el diámetro externo de la hebra pueda ser mayor que el diámetro externo de la aguja. La piel es bastante flexible de modo que tener un diámetro de aguja más pequeño puede permitir que el tamaño de punción sea incluso pequeño con el uso de una hebra de diámetro más grande. Además, el grosor de la hebra sería diferente en el caso en el que la hebra es una sutura en comparación con el tratamiento de líneas finas y arrugas en donde puede usarse una hebra más fina. También puede unirse más de una hebra a una única aguja.

Además, el tamaño del dispositivo de administración, una aguja, dependerá de su uso previsto y del tamaño de la hebra. Se contempla que para su uso en el contorneado facial y o relleno de arrugas una hebra de diámetro de aproximadamente 0,006” (pulgada) a aproximadamente 0,008” o incluso una hebra de diámetro de aproximadamente 0,003” a aproximadamente 0,004” será suficiente. Sin embargo, en algunas realizaciones, la hebra es de desde aproximadamente 0,003” hasta aproximadamente 0,050”, o desde aproximadamente 0,005” hasta aproximadamente 0,030”, o desde aproximadamente 0,005” hasta aproximadamente 0,025”. En algunas realizaciones, el tamaño de la hebra es de desde aproximadamente 0,010” hasta aproximadamente 0,020” de diámetro, o desde aproximadamente 0,011” hasta aproximadamente 0,016”.

La unión de la hebra a la aguja puede ser o bien una unión mecánica y/o bien con el uso de un adhesivo, tal como cianoacrilato. En una realización, la aguja es de acero inoxidable. En una realización, la hebra se teje o forma un bucle a través de orificios en el extremo proximal de la aguja, o alternativamente, la hebra se envuelve alrededor del extremo proximal de la aguja, o alternativamente, la hebra se enhebra a través de un ojo de la aguja y o bien se ata o bien de une con un adhesivo para formar un bucle, o alternativamente, la hebra se sujeta (o bien mecánicamente o bien se une con un adhesivo) dentro de un orificio en el extremo proximal de la aguja. En otra realización, la hebra puede prepararse para formar una unión física a la aguja durante el proceso de secado ya que la hebra se forma a partir del gel. Por ejemplo, si se usa una aguja que tiene poros en el extremo proximal, los poros pueden rellenarse con el gel durante el proceso de extrusión y la hebra se sujetaría por tanto tras el secado. La aguja puede ser rígida

o flexible para permitir que el usuario siga la aguja por debajo de la arruga dentro de la piel. Además, la aguja puede estar equipada con una rampa para guiar la aguja a una profundidad deseada dentro de la piel, y tras la inserción de la aguja, la guía puede desacoplarse a medida que la aguja se lleva a través de la superficie de la piel. En algunas realizaciones, la hebra se une a una aguja.

Se contempla además que el kit comprenda una aguja y la hebra unida a la misma, esté envasado de manera estéril y esté previsto para un único uso. Alternativamente, un kit puede comprender varias agujas, cada una con una hebra unida. En una realización adicional, un kit incluye hebras de diferentes tamaños para permitir opciones de tratamiento para el médico mientras se minimiza el número de pinchazos de aguja requeridos. En aún otra realización, el kit incluye hebras y agujas de diferente longitud y formas curvadas para simplificar la implantación en áreas que son difíciles de tratar o acceder con una aguja recta, por ejemplo cerca de la nariz, alrededor de los ojos y la parte media del labio superior.

Ejemplos

La presente divulgación se define adicionalmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos. Resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden ponerse en práctica muchas modificaciones, tanto en las hebras como en los métodos, sin apartarse del alcance de la presente divulgación. El ácido hialurónico y los agentes de reticulación están disponibles de fuentes comerciales.

Ejemplo 1: Síntesis de una hebra reticulada

Pueden prepararse hebras de ácido hialurónico reticulado según los siguientes procedimientos.

Reticulación: preparación de gel de ácido hialurónico reticulado

Se hidrata polvo de ácido hialurónico (HA) en aproximadamente el 75% de un volumen total deseado de NaOH durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 50ºC en un recipiente apropiado. El HA hidratado se añade entonces a una jeringa y se mezcla meticulosamente (por ejemplo, de jeringa a jeringa aproximadamente 20 veces). Se continúa el calentamiento durante aproximadamente 30 minutos.

Entonces se disuelve el agente de reticulación (es decir, BDDE) en la porción restante del volumen deseado total de NaOH (es decir, aproximadamente el 25% del volumen deseado total), se añade a la disolución de ácido hialurónico hidratado (gota a gota o en una porción), se mezcla meticulosamente (por ejemplo, de jeringa a jeringa aproximadamente 20 veces), se calienta durante aproximadamente 30 minutos, vuelve a mezclarse (por ejemplo, de jeringa a jeringa aproximadamente 20 veces) y se transfiere a un recipiente apropiado. Entonces se continúa el calentamiento a aproximadamente 50ºC durante de 3 a 5 horas adicionales.

Se prepararon diversos geles reticulados con diferentes concentraciones de componentes usando el procedimiento descrito anteriormente en el presente documento.

• Peso molecular de HA (MDa): por ejemplo, 0,7, 1,7, 2,7.

• Tiempo de hidratación de HA: por ejemplo, 0 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, durante la noche.

• pH de reacción: 9-13,4 usando, por ejemplo, NaOH 0,00001-0,25 M.

• Tiempo de reacción de reticulación: por ejemplo, 3-4,5 horas.

• Concentración de HA (% p/p de HA:NaOH acuoso): por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.

• Concentración de BDDE (% p/p de BDDE:HA): por ejemplo, 0,5, 2, 2,5, 5, 7,5, 8, 10, 20, 30, 40, 100.

Aclarado/dimensionamiento opcional

El gel de ácido hialurónico reticulado se aclara para eliminar el hidróxido de sodio y cualquier BDDE sin reaccionar. También puede eliminarse el agua, y los geles pueden fragmentarse para facilitar la etapa de extrusión y/o para lograr una eficacia de aclarado. En tal caso, el dimensionamiento se logra cortando el gel en cubos de aproximadamente 0,5 cm. Entonces se logra el aclarado aclarando con aproximadamente 40 volúmenes de fosfato de sodio 10 mM, a pH 6,0, tres veces durante aproximadamente 30 minutos cada una, aclarando con etanol al 100% seis veces durante aproximadamente 30 minutos, y entonces aclarando con agua cuatro veces durante aproximadamente 30 minutos.

Los trozos de gel hinchados pueden dimensionarse entonces adicionalmente en cubos de aproximadamente 0,25 cm, cargarse en una jeringa y extruirse a través de una aguja roma de calibre 20 (G). Puede realizarse más de una etapa de dimensionamiento usando una aguja del mismo calibre o una de calibre diferente, normalmente más

pequeño (por ejemplo, 20 G, entonces dos etapas de dimensionamiento de 25 G).

Secado

El gel de ácido hialurónico reticulado se diluye entonces aproximadamente 2:1 con agua, se carga en una cubeta secada. El secado se logra mediante secado con aire en condiciones ambientales o liofilización. Alternativamente, el gel se aísla por medio de precipitación en etanol. El gel o bien se seca parcialmente hasta una concentración final deseada o bien se seca completamente.

Formulación

El gel de ácido hialurónico reticulado completamente secado se formula como una composición acuosa hasta la concentración de HA final deseada (por ejemplo, el 2,5%, el 5%, el 7,5%, el 10%, el 12,5%, el 15%, el 20%). El gel de ácido hialurónico reticulado parcialmente secado puede usarse como composición acuosa en la formulación sin tratamiento adicional.

La composición acuosa de gel de ácido hialurónico reticulado puede formularse entonces adicionalmente con un aglutinante tal como ácido hialurónico no reticulado. En tal caso, el ácido hialurónico no reticulado se hidrata (por ejemplo, durante la noche a 4ºC) a la concentración de HA final deseada (por ejemplo, el 2,5%, el 5%, el 7,5%, el 10%, el 12,5%, el 15%, el 20%). El aglutinante se mezcla con el gel de ácido hialurónico reticulado. Los aglutinantes típicos incluyen ácido hialurónico no reticulado, sales (por ejemplo, $CaCl_2$), excipientes, lidocaína y similares.

La composición acuosa puede comprender cualquier medio acuoso, tal como un ácido, una base, un tampón o una sal. Pueden usarse tampones tales como solución salina tamponada con fosfato (por ejemplo, PBS 10 mM a pH 7,4). También pueden usarse disoluciones de cloruro de calcio (por ejemplo, 1 mM, 2,5 mM o 5 mM). Pueden usarse disoluciones de hidróxido de sodio (NaOH) (por ejemplo, 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M o 0,5 M).

Pueden prepararse composiciones con concentraciones de ácido hialurónico y HA reticulado superiores o inferiores; las siguientes tres composiciones se facilitan como ejemplos sólo.

En una composición, por ejemplo, la composición extruida final contenía el 12% (p/p) de ácido hialurónico reticulado y el 3% (p/p) de HA no reticulado, en la que el ácido hialurónico reticulado se derivaba de una reacción de reticulación con o bien el 10% de ácido hialurónico y el 4% de BDDE, o bien el 8% de ácido hialurónico y el 3,2% de BDDE.

En otra composición, la composición extruida final contenía el 8% (p/p) de ácido hialurónico reticulado y 2% (p/p) de HA no reticulado, derivándose el ácido hialurónico reticulado de una reacción de reticulación con o bien el 10% de ácido hialurónico y el 4% de BDDE, o bien el 8% de ácido hialurónico y el 3,2% de BDDE.

En aún otra composición, la composición extruida final contenía el 5% (p/p) de ácido hialurónico reticulado y el 5% (p/p) de HA no reticulado, derivándose el ácido hialurónico reticulado de una reacción de reticulación con el 10% de ácido hialurónico y el 4% de BDDE.

Extrusión

Las formulaciones de gel finales se extruyen entonces sobre una superficie adecuada para producir hebras húmedas. Se usan diversos tamaños de boquilla dependiendo del grosor de hebra deseado final (por ejemplo, 20 G, 19 G, 18 G, 17 G, 16 G).

Las formulaciones de gel finales se transfieren a una extrusora presurizada (por ejemplo, máquina de dispensación neumática EFD modelo XL1500). La boquilla de la extrusora puede tener una punta que oscila desde un calibre 15 hasta aproximadamente calibre 25. La presión de la jeringa puede ser de entre aproximadamente 10 psi y aproximadamente 2000 psi, dependiendo de la viscosidad de la formulación de gel final. Para formulaciones de gel muy viscosas, puede usarse un multiplicador de presión.

La hebra húmeda se forma entonces extruyendo la formulación de gel final sobre un sustrato mediante una extrusora para lograr el grosor de hebra húmeda deseado. Por ejemplo, para lograr un diámetro secado similar, puede usarse una aguja de calibre 20 para composiciones de ácido hialurónico al 15%, o una aguja de calibre 19 para composiciones de ácido hialurónico al 10%.

Secado de hebras

La hebra húmeda puede secarse entonces en condiciones ambientales hasta un porcentaje de hidratación de menos de aproximadamente el 30%, o menos de aproximadamente el 15%, o menos de aproximadamente el 10%, proporcionando por tanto una hebra seca. Opcionalmente, puede permitirse que la hebra se seque bajo una humedad relativa de desde aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 80% a una temperatura de desde

aproximadamente 20ºC hasta aproximadamente 37ºC. Por ejemplo, las hebras pueden secarse al aire durante dos días en condiciones ambientales.

Opcionalmente, antes de secar la hebra, la hebra húmeda puede estirarse hasta una longitud deseada y diámetro reducido antes del secado. El estiramiento puede ser o bien colgando la hebra por un extremo y aplicando peso al extremo opuesto, o bien estirando horizontalmente la hebra húmeda sobre una superficie (o bien la misma o bien diferente de la superficie de extrusión) y adhiriendo los extremos a la superficie.

Unión a una aguja

Las hebras secas pueden unirse a una aguja usando técnicas conocidas (véanse, por ejemplo, las figuras 2, 3A y 3B).

Esterilización

Las hebras descritas en el presente documento pueden esterilizarse usando métodos de esterilización de haz de electrones (haz de e). Las hebras preparadas en el ejemplo 1 reticuladas con BDDE se lavaron en una disolución de tampón fosfato o tampón Tris a pH 10. Algunas de las disoluciones contenían además ácido ascórbico 1 mM, ácido ascórbico 10 mM, ácido ascórbico 100 mM, ácido ascórbico 1 M, vitamina E 10 mM y Na_3PO_4 50 mM. Las hebras se esterilizaron entonces usando técnicas de haz de e convencionales a 4 kGy o 20 kGy. En algunas realizaciones, la temperatura de la hebra puede alterarse antes de la esterilización. En algunas realizaciones, la temperatura de la hebra se reduce hasta aproximadamente -20ºC. En algunas realizaciones, la hebra está justo por debajo de 5ºC tras la esterilización.

Usando las etapas divulgadas anteriormente, pueden prepararse hebras usando uno cualquiera de los procedimientos comentados a continuación.

Ejemplo 1A: *Procedimiento 1*

Pueden prepararse hebras usando las siguientes etapas:

1. Reticulación;

2. Aclarado;

3. Dimensionamiento;

4. Secado;

5. Formulación del HA reticulado con aglutinante;

6. Desaireación;

7. Extrusión;

8. Secado de hebras;

9. Unión a una aguja; y

10. Esterilización.

Ejemplo 1B: *Procedimiento 2*

También pueden prepararse hebras usando las siguientes etapas:

1. Reticulación;

2. Aclarado;

3. Dimensionamiento;

4. Secado;

5. Formulación del HA reticulado con aglutinante;

6. Desaireación y esterilización en autoclave;

7. Extrusión;

8. Secado de hebras;

9. Unión a una aguja; y

10. Esterilización (opcional).

Ejemplo 1C: *Procedimiento 3*

También pueden prepararse hebras usando las siguientes etapas:

1. Reticulación;

2. Extrusión;

3. Secado de hebras;

4. Aclarado;

5. Secado de hebras;

6. Unión a una aguja; y

7. Esterilización en autoclave.

Ejemplo 1D: *Procedimiento 4*

También pueden prepararse hebras usando las siguientes etapas:

1. Reticulación;

2. Aclarado;

3. Dimensionamiento y formulación del HA reticulado con aglutinante;

4. Secado;

5. Desaireación;

6. Extrusión;

7. Secado de hebras;

8. Unión a una aguja; y

9. Esterilización.

Ejemplo 1E: *Procedimiento 5*

También pueden prepararse hebras usando las siguientes etapas:

1. Reticulación;

2. Aclarado;

3. Dimensionamiento;

4. Precipitación en etanol y secado;

5. Formulación del HA reticulado con aglutinante;

6. Desaireación;

7. Extrusión;

8. Secado de hebras;

9. Unión a una aguja; y

10. Esterilización (opcional).

Ejemplo 2: Lavado (rehidratación) y vuelta a secar de la hebra

Las hebras secas pueden lavarse con un disolvente acuoso para eliminar cualquier contaminante, tales como agente de reticulación sin reaccionar. El lavado puede realizarse mediante diversos métodos, tales como inmersión en un disolvente acuoso o usando un sistema de flujo simultáneo colocando la hebra en una depresión inclinada y permitiendo que un disolvente acuoso fluya sobre la hebra. Además, la hebra, una vez rehidratada, puede estirarse antes de volverse a secar. El estiramiento puede realizarse mediante los medios descritos anteriormente en el ejemplo 1. La hebra rehidratada y lavada vuelve a secarse entonces para proporcionar la hebra seca. La vuelta a secar se realiza normalmente en condiciones ambientales (es decir temperatura y/o presión ambientales) durante desde aproximadamente 8 horas hasta aproximadamente 24 horas o hasta que la hebra seca tiene un porcentaje de hidratación de menos de aproximadamente el 30%. La hebra puede lavarse varias veces (por ejemplo 10 o más veces) sin perder su integridad estructural. A lo largo del transcurso de múltiples ciclos de lavado la longitud global de la hebra puede aumentarse entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 100%.

Ejemplo 3: Hebras de muestra

En la tabla 1 a continuación se proporcionan hebras de muestra preparadas a partir de los métodos del ejemplo 1.

Tabla 1

Hebra de muestra	Gel	Pretamaño	% de sólidos de HA	% HA NXL	Desaireación	Boquilla de extrusión
113	8/40	20 G - afilada	15	20	4X	20 G
114	8/40	20 G - afilada	15	20	2X	20 G
115	8/40	20 G - afilada	15	20	6X	20 G
116	8/40	20 G - afilada	15	20	6X, durante la noche	20 G
117	10/40	16 G/20 G - afilada	15	20	6X	20 G, 19 G
118	10/40	16 G/20 G - afilada	15	40	6X	20 G, 19 G
119	10/40	16 G/20 G - afilada	15	40	10X	20 G, 19 G
120	10/40	16 G/20 G - afilada	15	20	10X	20 G, 19 G
121	10/40	16 G/20 G - afilada	10	50	3X	19 G, 18 G
122	10/40	16 G/20 G - afilada	10	50	6X	19 G, 18 G
123	10/40	16/18/20 - afilada	10	50	6X	19 G, 18 G
124	10/40	16/18/20 - afilada	15	20	6X	20 G, 19 G
125	10/40	16/18/20 - afilada	15	40	6X	20 G, 19 G
126	10/40	16/18/20 - afilada (2X)	15	40	6X	20 G, 19 G
127	8/40	20 G - afilada	15	20	6X	20 G, 19 G
128	8/40		15	20	8X	19 G
129	8/40		15	20	8X	19 G

% de sólidos de HA = HA reticulado y no reticulado; NXL = HA no reticulado

Ejemplo 4: Características físicas de las hebras

Se evaluaron diversas hebras preparadas tal como se describió anteriormente para determinar la densidad de hebra, circularidad y diámetro de hebra seca. Se determinó la densidad de hebra midiendo el peso de una hebra de una

longitud medida y calculando la razón de peso con respecto a longitud. Se determinaron la circularidad (W:T) y diámetro (D) de hebra seca cortando hebras axialmente y midiendo el diámetro más corto (W) y más largo (T) para una sección transversal dada. La circularidad o razón de aspecto es la razón de W:T. El diámetro de hebra (D) es un promedio de diámetros cortos (W) y largos (T). La densidad de hebra promedio para hebras preparadas con agujas 20 G, 19 G y 18 G era de 1,78 mg/pulgada (n=7), 2,61 mg/pulgada (n=8) y 2,07 mg/pulgada (n=3), respectivamente.

Ejemplo 5: Comparación de la resistencia a la tracción final de diferentes hebras

Se sometieron a prueba diversas hebras preparadas tal como se describió anteriormente para determinar la resistencia a la tracción usando un dinamómetro (por ejemplo dinamómetro digital de Precision Instruments o Chatillon). Se determinó el fallo en el peso al que la hebra se rompía. Se calculó la resistencia a la tracción final dividiendo la fuerza de tracción/carga de fallo entre el área de sección transversal de la hebra. La carga de fallo promedio (en libras) para hebras no esterilizadas preparadas con agujas de 20 G y 19 G era de desde aproximadamente 0,420 lb hasta aproximadamente 1,172 lb. La carga de fallo promedio (en libras) para hebras esterilizadas con haz de e preparadas con agujas de 20 G, 19 G y 18 G era de desde aproximadamente 0,330 lb hasta aproximadamente 0,997 lb. La elongación promedio (en pulgadas) para hebras no esterilizadas preparadas con agujas de 20 G y 19 G era de desde aproximadamente 0,028 pulgadas hasta aproximadamente 0,192 pulgadas. La elongación promedio (en pulgadas) para hebras esterilizadas con haz de e preparadas con agujas de 20 G, 19 G y 18 G era de desde aproximadamente 0,021 pulgadas hasta aproximadamente 0,078 pulgadas. La resistencia a la tracción promedio (en psi) para hebras no esterilizadas preparadas con agujas de 20 G y 19 G era de desde aproximadamente 3236 psi hasta aproximadamente 19922 psi. La resistencia a la tracción promedio (en psi) para hebras esterilizadas con haz de e preparadas con agujas de 20 G y 19 G era de desde aproximadamente 1943 psi hasta aproximadamente 12859 psi.

Ejemplo 6: Datos de hinchamiento

La razón de hinchamiento de masa, tal como se representa mediante V2/V0, es la razón del gel hinchado en relación con el peso de gel completamente secado (tablas 2 y 3).

Se calculó la razón de hinchamiento de diámetro (razón de hebra hidratada con respecto a hebra seca) de hebras extruidas a partir de una boquilla de extrusión de 20 G que tenían un diámetro de hebra seca promedio de 0,0132 pulgadas. Cada hebra sometida a prueba tenía una razón de hinchamiento de diámetro de 1,5 o más, siendo la razón de hinchamiento de diámetro promedio de 1,55.

Tabla 2

Hebras hinchadas en agua (V2/V0)								
HA/BDDE	5/40	6/40	7/40	8/40	9/40	10/40	10/10	10/100
Prom.	682,7	396,7	306,2	494,7	85,3	183,3	967,5	56,1
Est.				322,8		188,4		11,9
Mín.				122,3		50,1		54,5
Máx.				696,2		696,2		76,4

Tabla 3

Hebras hinchadas en PBS (V2/V0)					
HA/BDDE	10/10	10/20	10/30	10/40	10/100
Prom.	71,6	45,2	38,4	37,3	23,7
Est.	5,2	0,9	1,0	4,8	1,4
Mín.	62,8	44,6	37,7	32,0	22,4
Máx.	78,3	45,8	39,1	54,4	25,3

Ejemplo 7: Degradación enzimática de las hebras con hialuronidasa

Se incubaron las hebras con hialuronidasa a 1 mg/ml en 1 ml de tampón (acetato de sodio 100 mM, pH 4,5, NaCl 150 mM) a 37ºC; las hebras de control no estaban en presencia de hialuronidasa. A diversos tiempos, se retiraron alícuotas de 40 μl de sobrenadante y se sometieron a ensayo mediante el ensayo de carbazol (Cesaretti, M, *et al.*, Carbohydrate Polymers 54: 59-61 (2003)) para ácido hialurónico. Las flechas verticales corresponden a la adición de hialuronidasa 1 mg/ml nueva. Se reemplazaron los sobrenadantes por enzima 1 mg/ml nueva en tampón. Para las hebras A-F: A = 10/40@15/20 $CaCl_2$; B = 10/40@15/40; C = 10/40@15/20; D = 10/40@10/50; E = 8/40@15/20 lavado con H_2O; F = 8/40@15/20; G = Control para 10/40@15/20 $CaCl_2$; H = Control para 10/40@15/40; I = Control para 10/40@15/20; J = Control para 8/40@15/20. Los detalles de estas degradaciones enzimáticas representadas

están en la figura 12 y la tabla 4. Esto muestra que las hebras de control, que no están en presencia de hialuronidasa, no se degradan a lo largo del tiempo monitorizado, mientras que las hebras que están en presencia de hialuronidasa se degradan.

Tabla 4: Velocidad de degradación (pendiente de ajuste lineal de los primeros cinco puntos de datos

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Velocidad de degradación*	0,014	0,011	0,010	0,007	0,041	0,023	0,00	0,00	0,00	0,00

*mg de HA/día

Ejemplo 8: Datos de palpación

Un evaluador ciego palpa y puntúa todos los sitios de muestra por animal y registra el valor sobre hojas de datos preimpresas. Se recopilaron los datos y se calculó el promedio basándose en el sitio de muestra. Las puntuaciones de los evaluadores son 0 = sin signos táctiles de implante, 1 = ligero signo táctil de implante y 2 = signo táctil de implante claro. Se realizó la puntuación táctil de implante (palpación cualitativa) por protocolo en sujetos de prueba a intervalos preespecificados que abarcaban la duración del estudio, midiendo la respuesta dérmica de superficie tras la implantación. La respuesta medida era la continuidad en longitud del implante. Por ejemplo, si se palpaban dos puntos, y el implante se siente continuo, sin roturas, entonces se clasificaría como “2”, si el implante se siente longitudinalmente intermitente entonces se clasificaría como “1”, y si no se detecta implante, entonces la puntuación se clasificaría como “0”. En la figura 13 se muestra un gráfico del número de días frente a la puntuación de palpación promedio.

Ejemplo 9: Estudios histológicos

Se fijaron muestras de tejido que contenían implantes de hebras en un fijador de etanol con ácido-formalina antes de la incrustación en metacrilato de metilo. Se tiñeron secciones histológicas con hematoxilina y eosina (H&E) así como azul Alcian con rojo neutro para visualizar las respuestas celulares y la presencia del implante, respectivamente. Las imágenes de histología de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses y 9 meses de la formulación 8/40@15/20 se muestran en las figuras 9A, 9B, 9C, 9D, 9E y 9E. Las muestras eran similares en aspecto, indicando que las hebras estaban persistiendo *in vivo.*

Ejemplo 10: Estudios de hebras de ácido hialurónico en conejos

Se evaluó el rendimiento *in vivo*, incluyendo la persistencia y la respuesta biológica, de formulaciones de hebras en un estudio crónico en conejos. Se implantaron formulaciones de hebras descritas en el presente documento en la dermis dorsal de conejos New Zealand White y se evaluaron en los puntos de tiempo de 1 semana, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses y 9 meses. Durante la fase de vida, se evaluaron los sitios de implante para detectar la presencia del implante por medio de palpación y un sistema de puntuación táctil (véase el ejemplo 8). A los intervalos de tiempo programados, se sacrificaron los animales y se recogieron los sitios de implante para evaluación macroscópica e histológica. Se seccionaron un subconjunto de sitios de implante axialmente con un bisturí y se evaluaron bajo el microscopio para detectar la presencia visual de material de implante en el tejido dérmico. Se aplicó presión en el sitio de implante para evaluar si los implantes estaban bien integrados dentro del tejido o podrían extruirse del sitio de implante. El subconjunto restante de sitios de implante se fijaron y procesaron para la evaluación histológica (véase el ejemplo 9). Las imágenes de histología de 1 mes y 2 meses de la formulación 8/40@15/20 se muestran en las figuras 10 y 11, respectivamente, mostrando que la hebra está todavía presente.

Ejemplo 11: Tratamiento de arrugas con hebras de ácido hialurónico

Se fijan a agujas hipodérmicas (de 22 a 25 G) una única o dobles cadenas de hebras de ácido hialurónico (reticulado con BDDE), oscilando desde grosores de 0,004 pulgadas hasta 0,008 pulgadas. Las muestras se esterilizan con haz de e por NuTek Corp. a 29 kGy. La aguja tira de la hebra o hebras unidas en la piel. Las arrugas que se tratan son arrugas en el pliegue nasolabial, periorales, periorbitales, frontales (frente) y glabelares. La aguja tiraría entonces de la hebra a través de la piel de manera que la hebra queda ubicada donde se insertó previamente la aguja. Puede usarse más de una hebra para tratar las arrugas con el fin de lograr el efecto de relleno deseado (de dos a cuatro o más hebras). La arruga disminuye visiblemente tras la hidratación de la hebra.

Ejemplo 12: Aumento de labios

Pueden implantarse en un paciente hebras de HA para el aumento de labios, o bien contorneado y/o bien relleno. El paciente puede recibir anestésico tópico sobre la cara, pero no se aplica específicamente a los labios según el siguiente procedimiento:

• Abrir la bolsa y retirar la bandeja estéril que contiene las hebras de HA (ácido hialurónico).

• Usando guantes estériles o un instrumento estéril tal como pinzas, retirar la hebra de HA deseada de la bandeja.

• Insertar el extremo afilado de la aguja en un margen del área de tratamiento prevista.

• Trasladar la aguja dentro de la piel bajo o cerca del área de tratamiento prevista. Si la aguja no está en una ubicación deseada en cualquier punto, retirar suavemente la aguja y volver a insertarla en la ubicación correcta.

• Salir de la piel en el margen opuesto del área de tratamiento prevista usando el extremo afilado de la aguja. Si la aguja no está en la ubicación deseada, retirar suavemente la aguja y reinsertarla en la ubicación correcta.

• Tras confirmar la ubicación deseable de la aguja, tirar rápidamente de la aguja de manera distal, tirando de la hebra en su sitio dentro de la piel.

• Usando un bisturí o tijeras quirúrgicas estériles, cortar la hebra en exceso que sobresale de la piel en ambos márgenes del área de tratamiento. Esto separa eficazmente la aguja, que debe desecharse apropiadamente.

Las áreas de potenciación incluyen el borde bermellón (o rollo blanco) para borramiento y contorneado del labio, la unión mucosa húmeda-seca para aumentar el volumen. Otras técnicas incluyen una infiltración más difusa del musculo orbicular de la boca. El médico encargado es capaz de seleccionar la ubicación de colocación de la hebra, el número de hebras y el tamaño de las hebras dependiendo del efecto deseado. Se contempla que cada área se trate con de 1 a 2 hebras en donde cada hebra tiene un diámetro de cualquiera desde 200 micrómetros hasta aproximadamente 500 micrómetros cuando la hebra está seca. Tras la hidratación, se contempla que la hebra tenga un diámetro de desde 0,5 milímetros hasta aproximadamente 5 milímetros.

Ejemplo 13: Estudio de RMN para determinar la razón de derivado de BDDE con respecto a HA en hidrogeles reticulados

Se emprendió un estudio de RMN para determinar la razón de derivado de diglicidil éter de 1,4-butanodiol (BDDE) con respecto a la subunidad de disacárido de ácido hialurónico (HA) en hidrogeles de HA reticulados. Se prepararon hidrogeles a concentraciones de HA del 8 y del 10 por ciento, se reticularon con el 3,2 y el 4 por ciento de BDDE, respectivamente. Se aclararon los geles extensamente para eliminar el BDDE residual, se digirieron con hialuronidasa y se secaron. Se disolvieron los polvos resultantes en D_2O y se analizaron mediante RMN de protón. Se determinó la razón de BDDE con respecto a la subunidad de disacárido de HA comparando el pico de los hidrógenos de metileno internos de 1,4-butanodiol a 1,6 ppm con el grupo acetilmetilo de N-acetilglucosilamina a 2,0 ppm. A iguales cantidades molares de BDDE y subunidad de disacárido, estas áreas de pico deben integrarse a 4 y 3, respectivamente. Los resultados con el hidrogel de HA al 8% dieron áreas de pico que se integraban a 0,75 y 3, respectivamente, lo que corresponde a aproximadamente 0,19 moles de BDDE por mol de subunidad de disacárido. Los resultados con el hidrogel de HA al 10% dieron áreas de pico que se integraban a 0,72 y 3, respectivamente, lo que corresponde a aproximadamente 0,18 moles de BDDE por mol de subunidad de disacárido.

Se repitió el experimento con la formulación 8/40 con un segundo lote de gel y dio resultados de 0,217 moles de BDDE por mol de subunidad de disacárido. El porcentaje promedio de BDDE en el gel 8/40 es por tanto del 20% ± 2% D.E. La tabla 5, a continuación, muestra formulaciones adicionales.

Tabla 5

Formulación de gel	% de entrada de BDDE (en peso)	% de BDDE sustituido*	% de BDDE reticulado*	% de BDDE colgante*
12/40	40%	35,2	8,5	26,7
12/20	20%	19,1	4,9	14,2
12/15	15%	17,2	3,5	13,7

* % en moles

Ejemplo 14: Efecto de la reticulación sobre la persistencia *in vivo* de la hebra - Comparación de datos de animales

Se colocaron hebras de ácido hialurónico esterilizadas producidas por medio de los siguientes métodos en un animal y se evaluaron para determinar la persistencia *in vivo*.

Parte 14A

Se prepararon hebras de HA a partir de un gel de ácido hialurónico al 10% p/p (PM = 1,47 MDa) formulado en tampón bicarbonato de sodio 10 mM (pH 10) y reticulado con el 10% (en relación con la masa de HA) de diglicidil éter de 1,4-butanodiol (BDDE). Se aclararon hebras en los artículos de prueba 1 y 2 en tampón Tris (Tris 50 mM,

NaCl 150 mM) que contenía ácido ascórbico 100 mM, se aclararon hebras en los artículos de prueba 3 y 4 en tampón Tris (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) que contenía vitamina E 100 mM, se aclararon hebras en los artículos de prueba 5 y 6 en agua antes del secado final (secadas al aire). Se prepararon hebras en los artículos de prueba 7 y 8 en tampón Tris 10 mM (pH 7) en vez de tampón bicarbonato de sodio 10 mM (pH 10) y se aclararon en agua antes del secado final. Las hebras secadas tenían una forma cilíndrica, 0,006-0,008" de diámetro y 1,0-1,5" de longitud. Se usaron agujas Keith de pared fina, de calibre 27, de acero inoxidable, hipodérmicas en todos los artículos de prueba. Las agujas tenían 2½" de longitud y tenían puntas con un único bisel. Se unieron hebras de HA reticuladas a la aguja por medio de engarzado mecánico. Se esterilizaron de manera terminal los artículos de prueba por medio de irradiación con haz de e. Los artículos de prueba 1 y 3 recibieron una dosis de irradiación de 4 kGy. Los artículos de prueba 2 y 4 recibieron una dosis de irradiación de 20 kGy. Los artículos de prueba 6 y 8 recibieron una dosis de irradiación de 20 kGy congelados. Los artículos de prueba 5 y 7 se procesaron en un entorno de tipo aséptico y no se esterilizaron de manera terminal.

Los resultados del estudio de persistencia *in vivo* (utilizando 10 ratas Sprague Dawley) indicaron que todas las hebras en el artículo de prueba 2 eran indetectables en una semana. Las hebras implantadas de los artículos de prueba 1, 3, 4 y 6 desaparecieron en gran medida en una semana con sólo pequeños números de partículas intracelulares encontradas dentro de pequeños infiltrados celulares en el punto de tiempo de una semana. Se observó más material residual en los sitios tratados con los artículos de prueba 3 y 4 que en los sitios tratados con el artículo de prueba 1 en una semana, lo que sugiere que la velocidad de resorción era más lenta para esas hebras. No se observó nada del material implantado de los artículos de prueba 1, 2, 3 ó 4 a las 3 semanas. Además, todas las hebras de los artículos de prueba 5, 6, 7 y 8 eran indetectables en el día 30.

Parte 14B

Se preparó una disolución de ácido hialurónico al 0,75% p/p (1,7 MDa) disolviendo el HA en tampón TRIS 10 mM (pH 7). Se añadió diglicidil éter de butanodiol (BDDE) a la disolución de HA y se agitó la disolución durante la noche. La razón de BDDE con respecto a HA era de 2:1. Entonces se dializó la disolución de HA sustancialmente reticulado frente a agua desionizada en exceso usando una membrana de diálisis con un punto de corte de peso molecular de aproximadamente 12 a aproximadamente 14 KDa. Entonces se liofilizó la disolución dializada para obtener ácido hialurónico sustancialmente reticulado seco. Se expuso el ácido hialurónico reticulado seco (2,0 g) a 25 kGy de haz de e (temperatura de irradiación 1 - 3ºC), se formuló hasta el 16% de sólidos (p/p) en tampón TRIS 10 mM (pH 7,00), se extruyó y se secó durante aproximadamente 48 h a temperatura ambiental.

Se irradió el artículo de prueba 9 tras la reticulación a 25 kGy, 0,020" de diámetro, se procesó en un entorno de tipo aséptico y se esterilizó de manera no terminal. Se irradió el artículo de prueba 10 tras la reticulación a 25 kGy, 0,010" de diámetro, se procesó en un entorno de tipo aséptico y se esterilizó de manera no terminal. El artículo de prueba 11 tenía 0,020" de diámetro, se procesó en un entorno de tipo aséptico y se esterilizó de manera no terminal. Se irradió el artículo de prueba 12 tras la reticulación a 25 kGy, 0,020" de diámetro, se procesó en un entorno de tipo aséptico y se esterilizó de manera no terminal. Se irradió el artículo de prueba 13 tras la reticulación a 25 kGy, 0,010" de diámetro, se procesó en un entorno de tipo aséptico y se esterilizó de manera no terminal. El artículo de prueba 14 tenía 0,020" de diámetro, se procesó en un entorno de tipo aséptico y se esterilizó de manera no terminal.

Se implantaron las hebras de los artículos de prueba 9-14 en conejos. Se retiraron de cada animal segmentos de piel que contenían un total de 20 sitios tratados. Se procesaron y analizaron especímenes seleccionados (4/grupo/punto de tiempo tomados de cada hebra de los sitios tratados con los artículos de prueba 9-14). Se produjo la resorción completa de las hebras de los artículos de prueba 9, 10 y 13 a los 7 días. Se produjo la resorción completa de las hebras del artículo de prueba 12 entre 7 y 30 días. Se había producido la resorción completa o casi completa de las hebras del artículo de prueba 14 y se había producido la resorción parcial de las hebras del artículo de prueba 11 a los 30 días.

Parte 14C

Se prepararon seis hebras reticuladas según el ejemplo 1. Se prepararon las hebras de los artículos de prueba 15-20 tal como sigue. Se prepararon hebras reticuladas de un diámetro de entre 0,008 pulgadas y 0,010 pulgadas formando un gel con una concentración del 10% de ácido hialurónico y el 4% de BDDE en peso en relación con la composición total comprendiendo el resto hidróxido de sodio 0,1 N. La razón de BDDE con respecto a HA en el gel reticulado era de 0,18 moles de BDDE por mol de subunidad de disacárido. Tras el aclarado, predimensionamiento, liofilización y combinación con aglutinante no reticulado, se extruyó entonces el gel para dar una forma de hebra usando una boquilla de 20 G. La hebra húmeda se seca entonces durante aproximadamente 48 h para proporcionar una hebra seca.

Tabla 6. Composición/procesamiento de artículos de prueba

Artículo de	Partida [HA]	[BDDE]	Medio de	Predimensionado	Sólidos de HA	% de aglutinante	Medio de formulación	Esterilización

prueba			aclarado		en el gel			
15	10%	40%	PB	20 G	10%	50%	H_2O	Haz de e
16	10%	40%	PB	20 G	15%	20%	H_2O	Haz de e
17	10%	40%	PB	20 G	15%	20%	$CaCl_2$ 5 mM H_2O	Haz de e
18	10%	40%	PB	20 G	15%	40%	H_2O	Haz de e
19	8%	40%	PB	20 G	15%	20%	H_2O	Haz de e
20	8%	40%	H_2O	20 G	15%	20%	H_2O	Haz de e

PB = tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 6

Se evaluaron satisfactoriamente artículos de prueba para determinar la degradación mediante observación macroscópica y mediante análisis histológico. Todos los artículos de prueba eran identificables mediante observación macroscópica a lo largo de 90 días, pero con la excepción del artículo de prueba 20, cuya identificación no era constante a los 135 y 180 días. Histológicamente, todos los artículos de prueba eran identificables cualitativamente en puntos de tiempo tempranos. Cualitativamente, los artículos de prueba 15, 16, 17 y 18 demostraron más evidencias de degradación que los artículos de prueba 19 y 20. La degradación del artículo de prueba 20 se analizó cuantitativamente y el área de sección transversal persistía sin cambios significativos a los 270 días.

Por tanto, cuanto más reticulada esté la hebra de esta divulgación más persistente será *in vivo* que cuando la hebra está menos reticulada tal como puede observarse a partir de los datos anteriores.

REIVINDICACIONES

1. Hebra que comprende ácido hialurónico reticulado, en la que el ácido hialurónico se reticula con al menos el 15% en moles de un derivado de diglicidil éter de butanodiol (BDDE) en relación con la unidad de disacárido de repetición del ácido hialurónico, y al menos el 5% en peso de ácido hialurónico no reticulado en relación con el peso de los sólidos de ácido hialurónico totales, en la que el ácido hialurónico reticulado está presente en una cantidad de desde el 60% en peso hasta el 90% en peso basándose en el peso total de la hebra excluyendo la humedad.

2. Hebra según la reivindicación 1, en la que el ácido hialurónico no reticulado está presente en una cantidad de desde el 10% en peso hasta el 40% en peso basándose en el peso total de la hebra excluyendo la humedad.

3. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el ácido hialurónico reticulado se reticula con desde el 17% en moles hasta el 20% en moles del derivado de BDDE.

4. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la hebra tiene una resistencia a la tracción final de 3 kpsi (20,7 MPa) o mayor.

5. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la hebra tiene una resistencia a la tracción final de desde 2 kpsi (13,8 MPa) hasta 20 kpsi (138 MPa).

6. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la hebra tiene un diámetro de desde 0,008 pulgadas (0,20 mm) hasta 0,018 pulgadas (0,46 mm).

7. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la hebra tiene un diámetro de desde 0,011 pulgadas (0,28 mm) hasta 0,016 pulgadas (0,41 mm).

8. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la hebra tiene una razón de peso/longitud de desde 1,5 mg/pulgada (0,059 mg/mm) hasta 3,5 mg/pulgada (0,14 mg/mm).

9. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la hebra tiene una longitud de desde 5 cm hasta 10 cm.

10. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la hebra tiene una carga de fallo de desde 0,3 libras (0,14 kg) hasta 1,3 libras (0,59 kg).

11. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además una aguja unida a la hebra.

12. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la hebra es una hebra seca.

13. Kit de partes que comprende la hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un medio para implantar o administrar la hebra a un paciente que es preferiblemente una jeringa o una aguja.

14. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de una arruga en un paciente.

15. Hebra según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el contorneado facial o vendaje de heridas en un paciente.

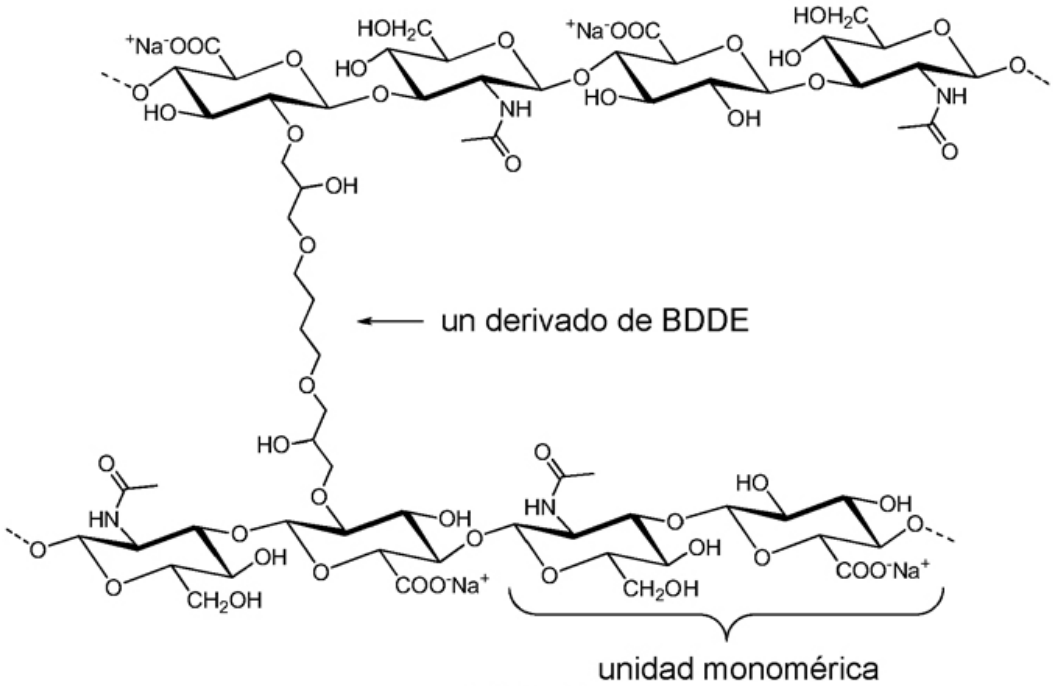


FIG. 1

FIG. 2

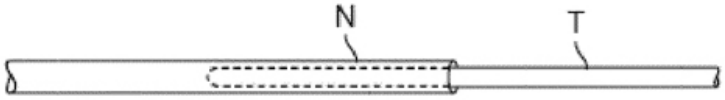


FIG. 3A

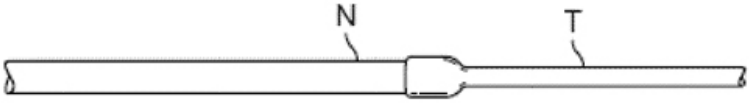


FIG. 3B

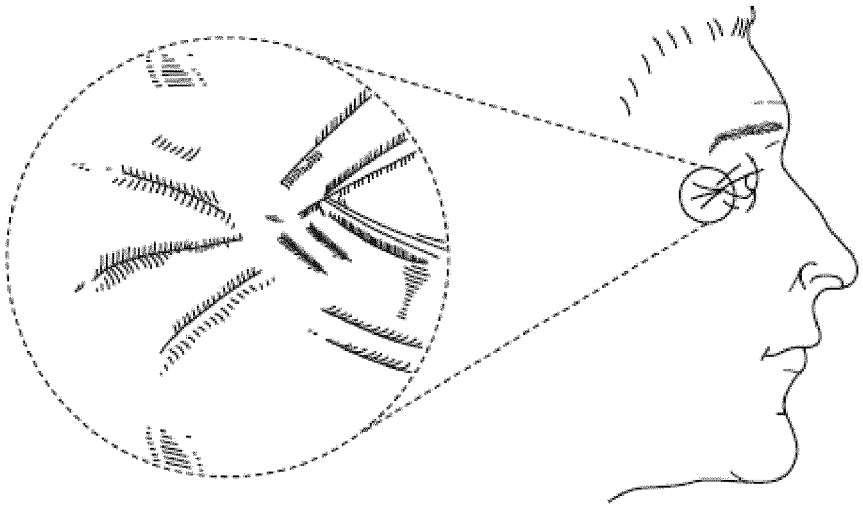


FIG. 4A

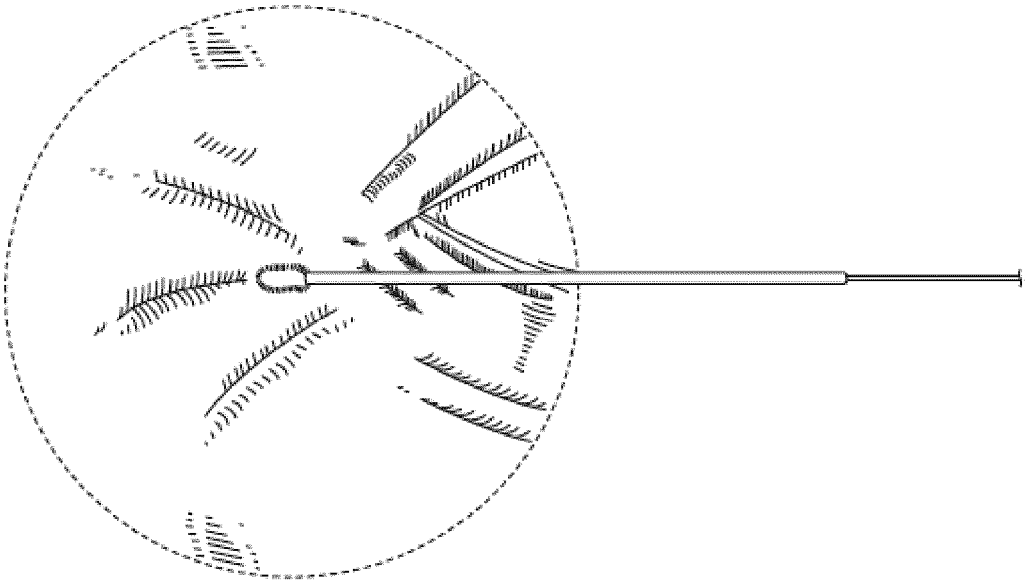


FIG. 4B

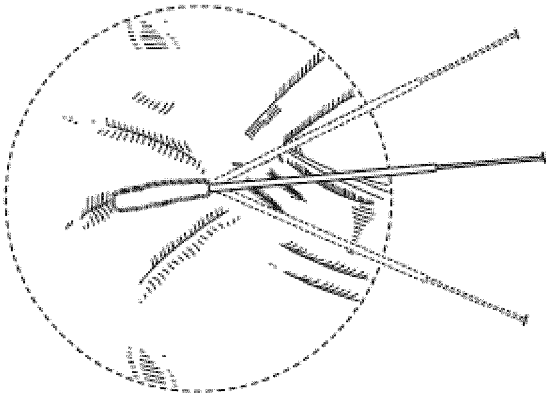


FIG. 4C

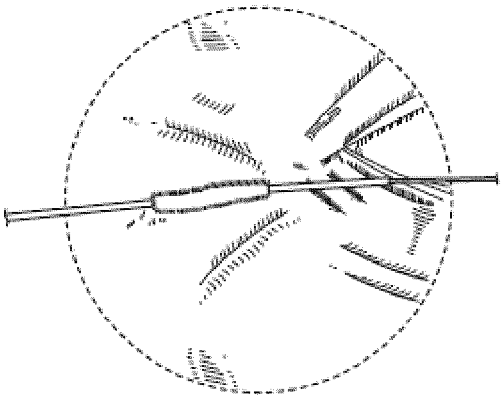


FIG. 4E

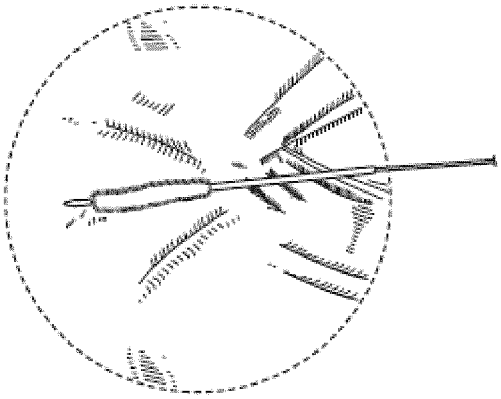


FIG. 4D

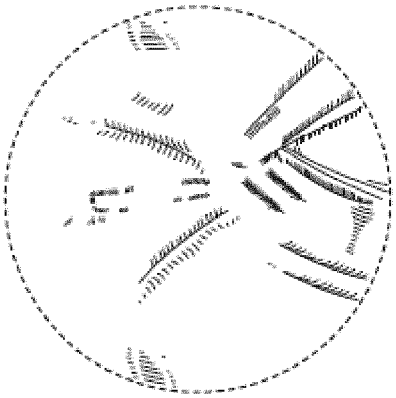


FIG. 4F

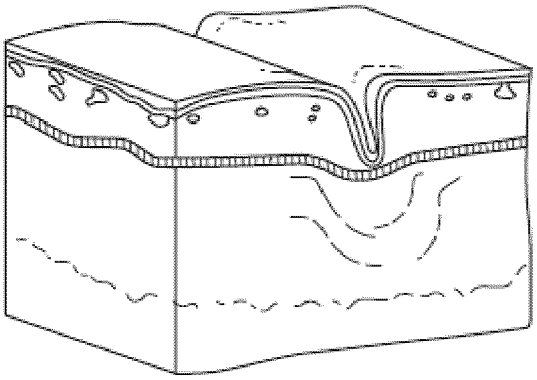


FIG. 5A

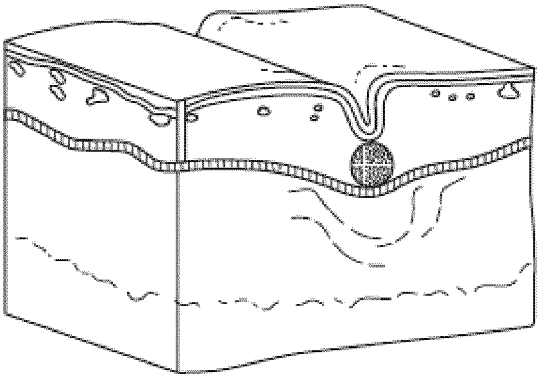


FIG. 5B

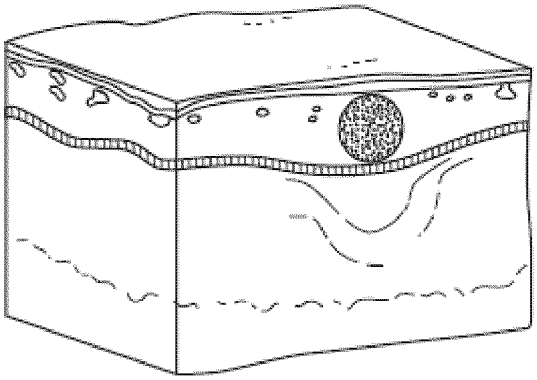


FIG. 5C

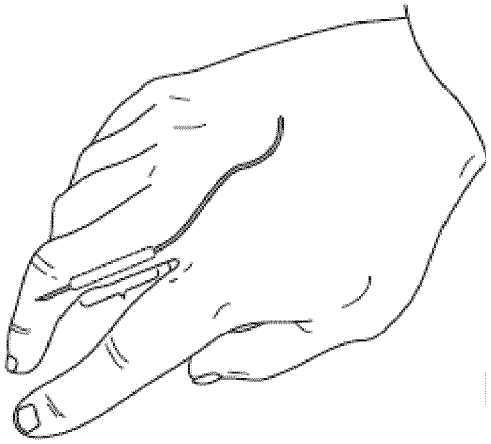


FIG. 6

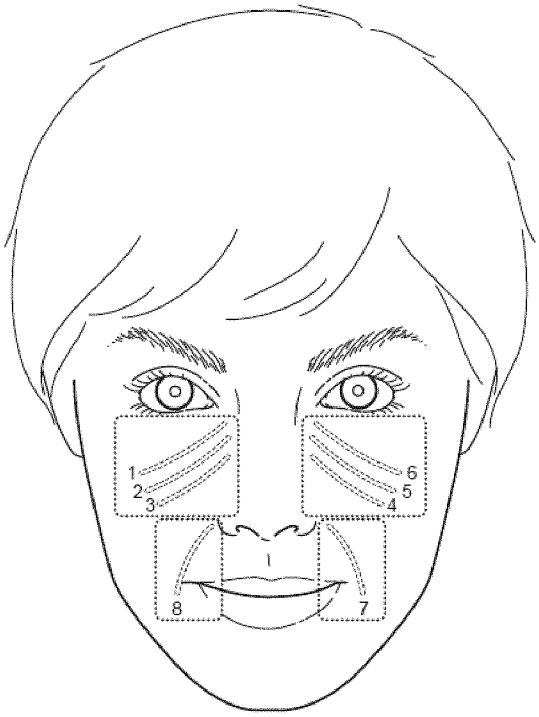


FIG. 7A

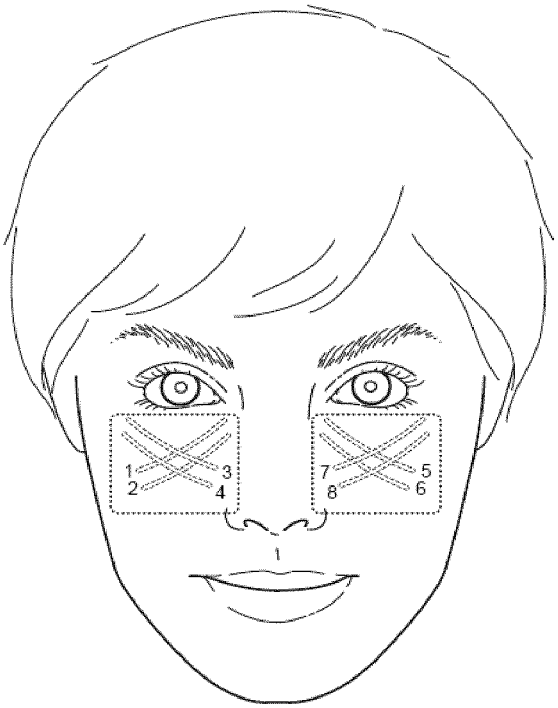


FIG. 7B

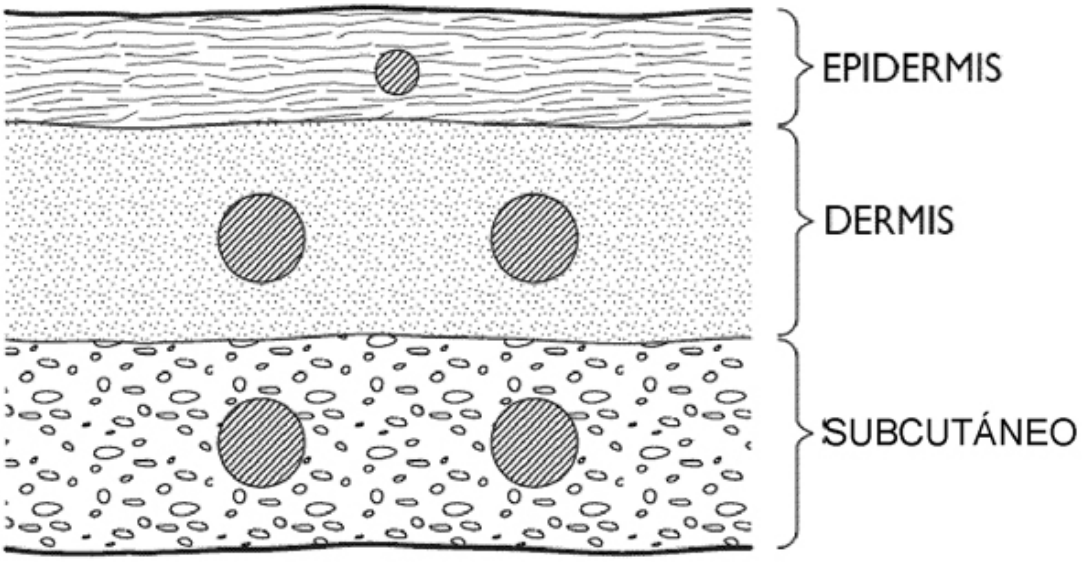

EPIDERMIS
DERMIS
SUBCUTÁNEO

FIG. 8A

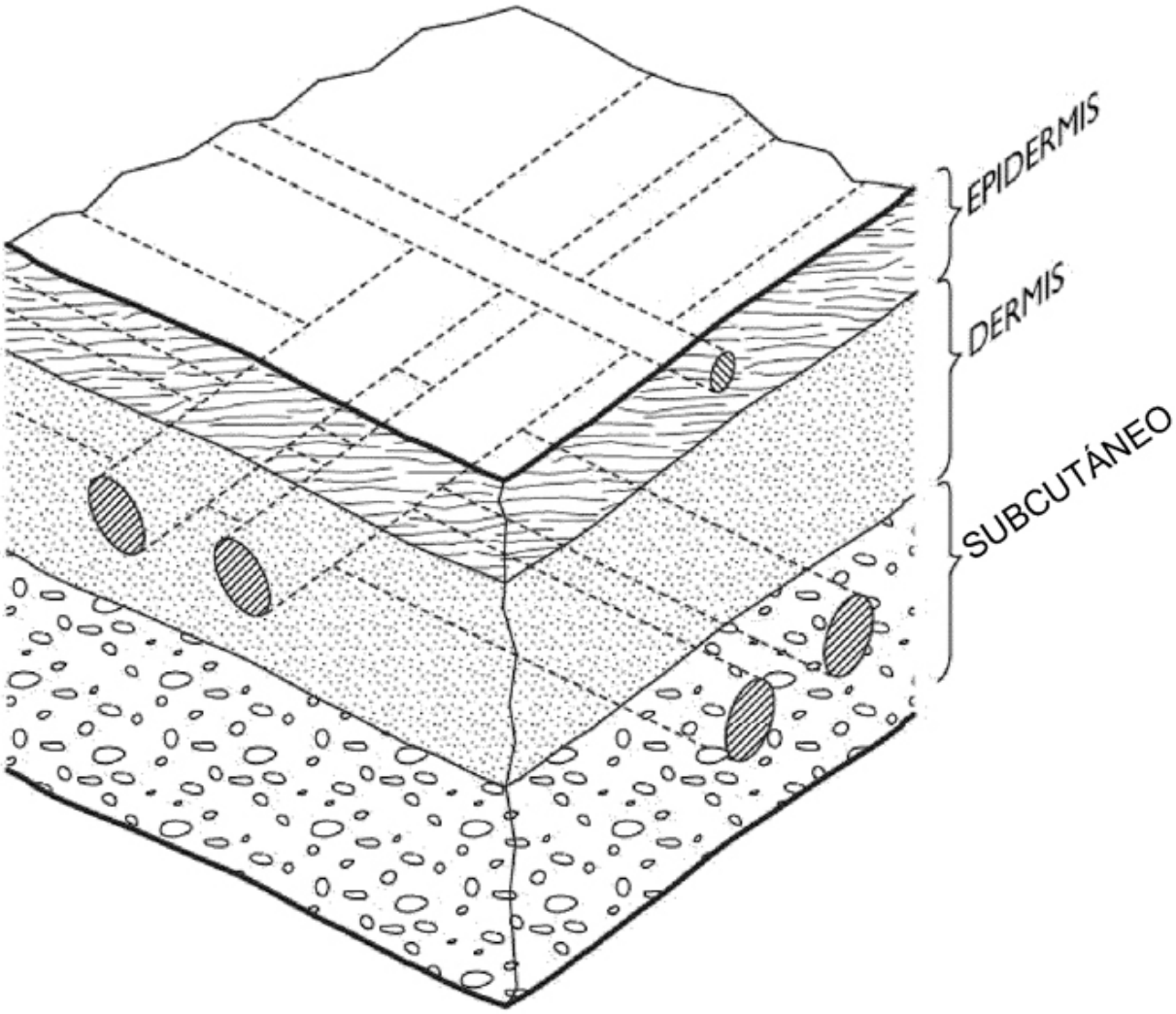

EPIDERMIS
DERMIS
SUBCUTÁNEO

FIG. 8B

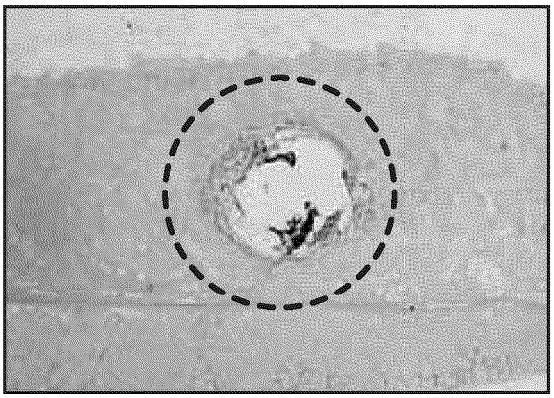


FIG. 9A

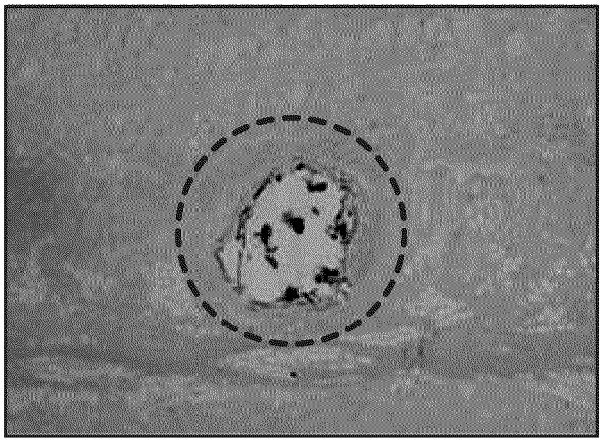


FIG. 9B

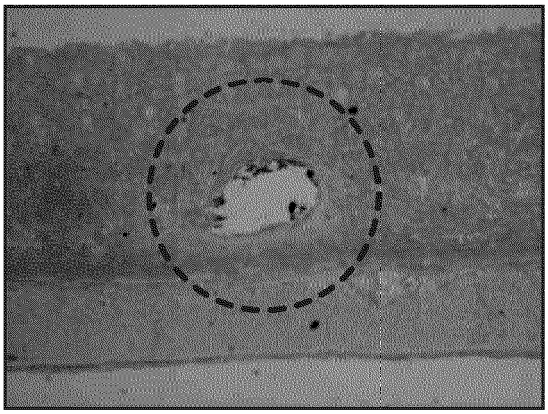


FIG. 9C

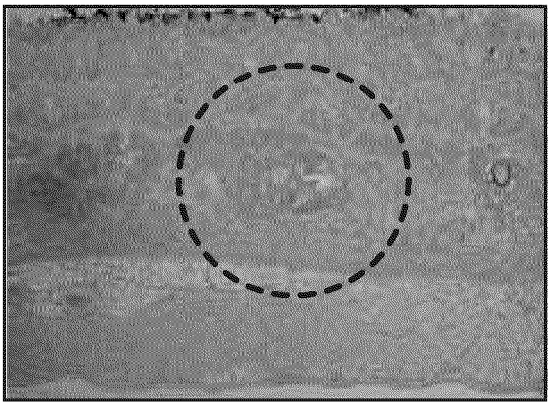


FIG. 9D

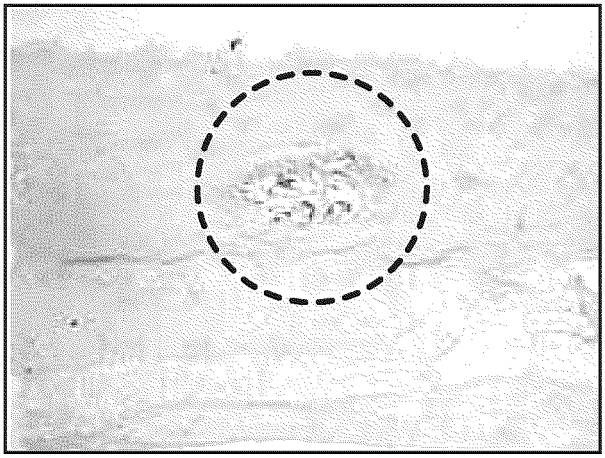


FIG. 9E

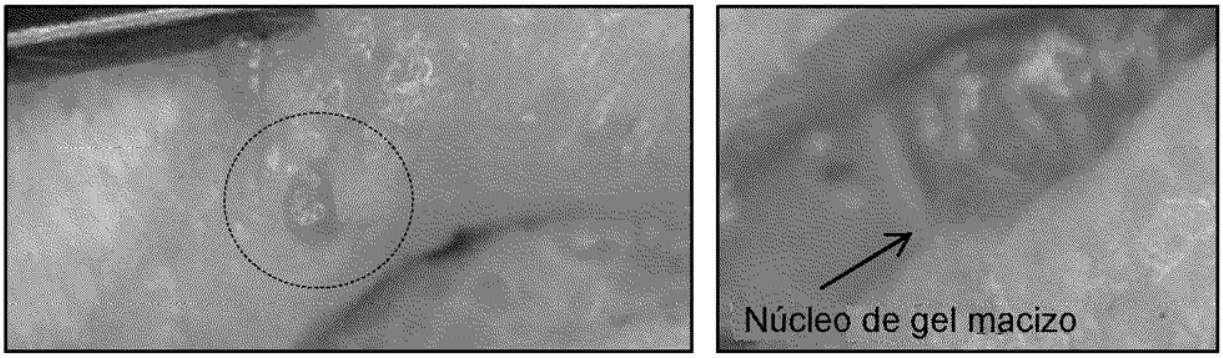


FIG. 10

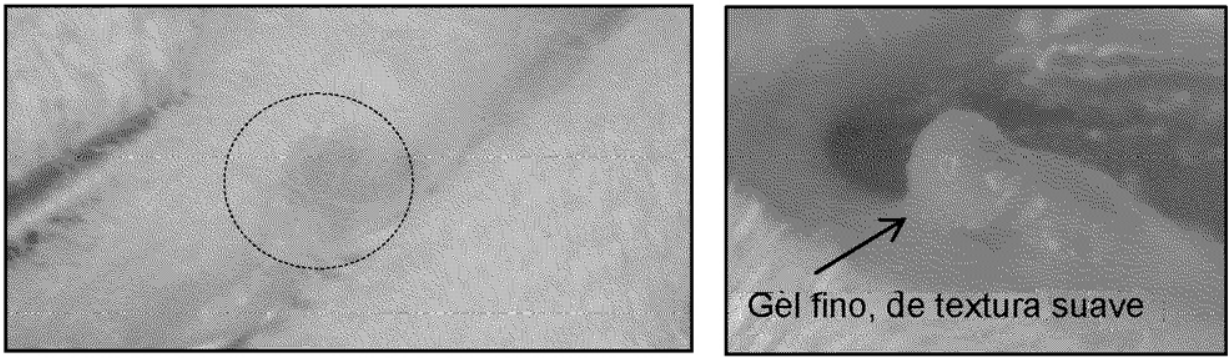


FIG. 11

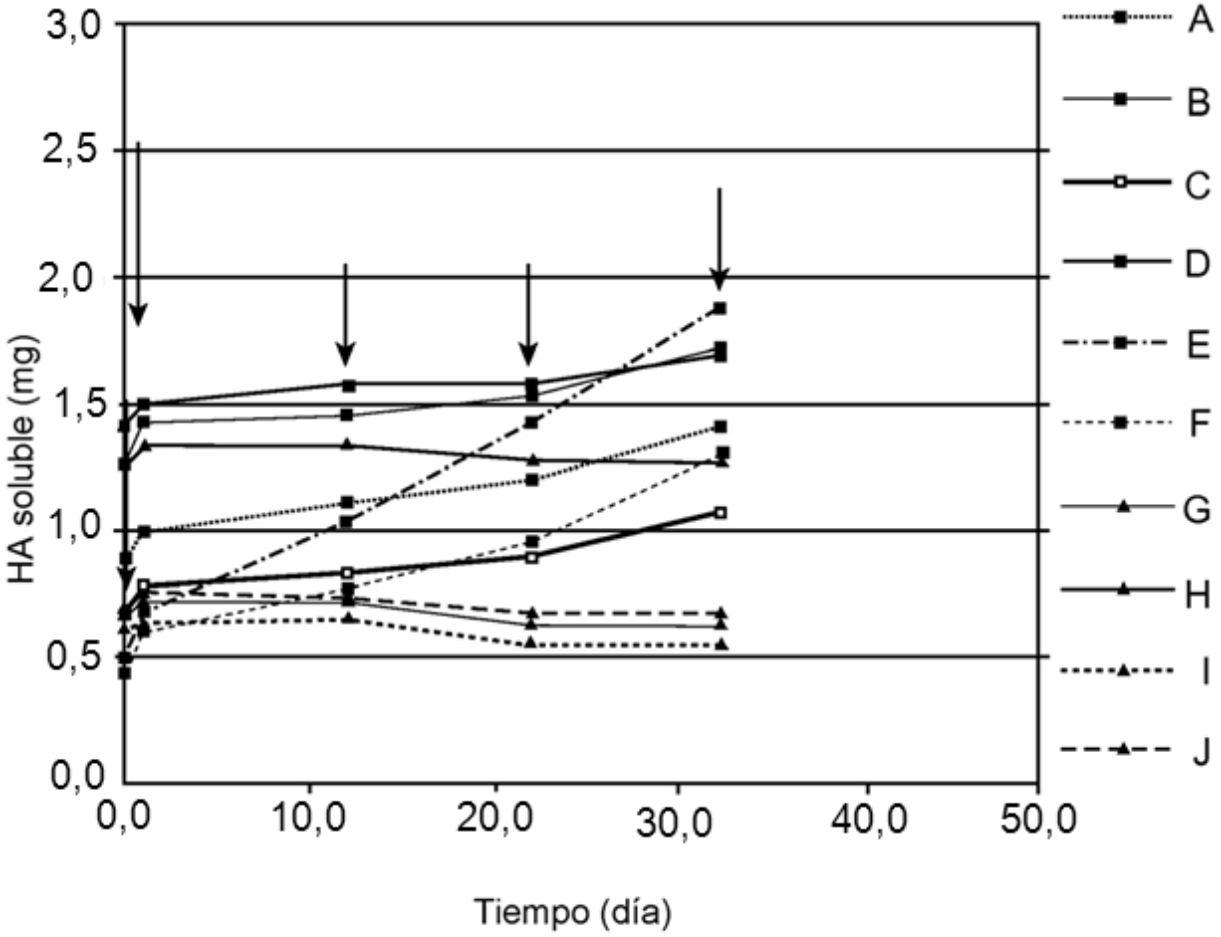

3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
HA soluble (mg)
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
Tiempo (día)
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J

FIG. 12

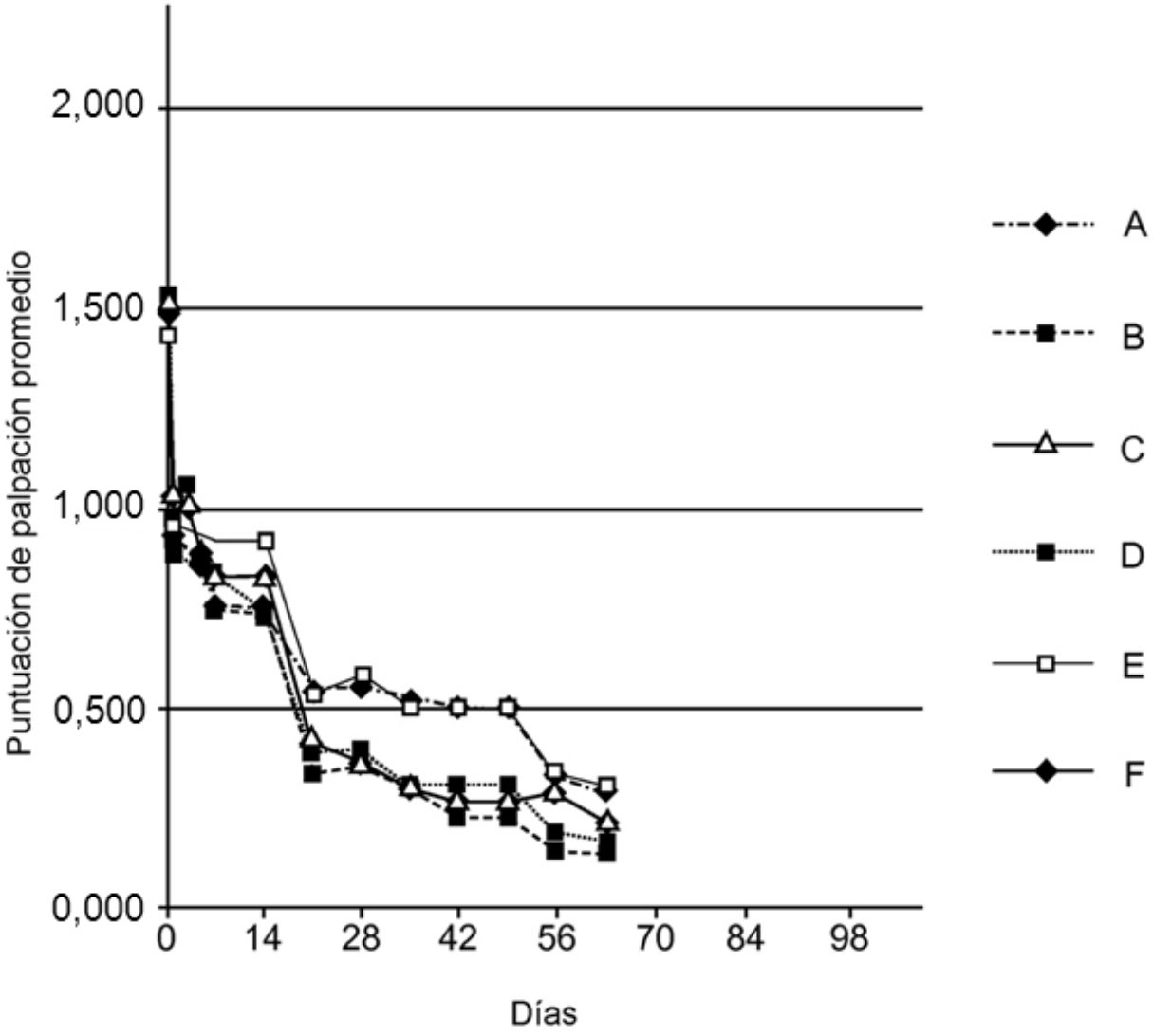

2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
Puntuación de palpación promedio
0
14
28
42
56
70
84
98
Días
A
B
C
D
E
F

FIG. 13

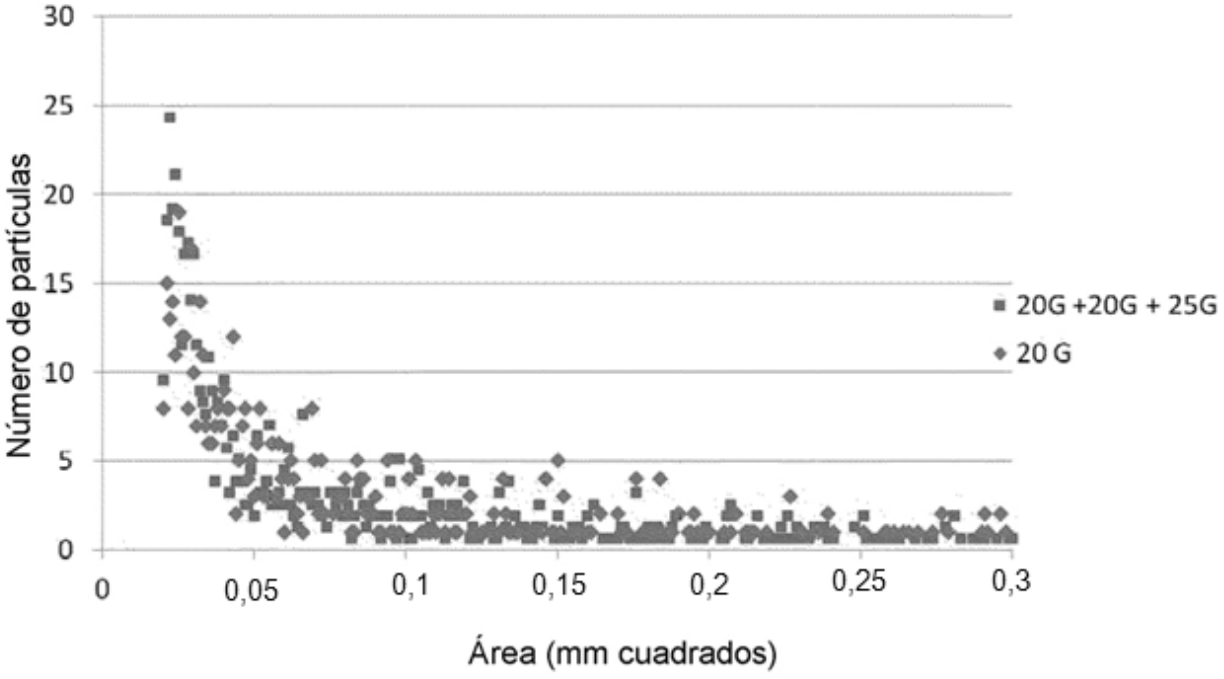

30
25
20
15
10
5
0
Número de partículas
0
0,05
0,1
0,15
0,2
0,25
0,3
Área (mm cuadrados)
20G +20G + 25G
20 G

FIG. 14