

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 227**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/20** (2006.01)  
**A61K 8/73** (2006.01)  
**A61K 31/738** (2006.01)  
**C08B 37/08** (2006.01)  
**C08J 3/075** (2006.01)  
**C08J 3/24** (2006.01)  
**C08L 5/08** (2006.01)  
**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2014 PCT/EP2014/001573**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14198406**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2014 E 14729220 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 3007737**

54 Título: **Método para reticular ácido hialurónico; método para preparar un hidrogel inyectable; hidrogel obtenido; uso del gel obtenido**

30 Prioridad:

**11.06.2013 FR 1301332**  
**10.12.2013 WO PCT/FR2013/000328**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.12.2017**

73 Titular/es:

**ANTEIS SA (100.0%)**  
**18 Chemin des Aulx**  
**1228 Plan-Les-Ouates, CH**

72 Inventor/es:

**TAUZIN, BÉNÉDICTE VINCENTE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 647 227 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para reticular ácido hialurónico; método para preparar un hidrogel inyectable; hidrogel obtenido; uso del gel obtenido

El objeto de la presente invención es:

- 5 - un método para reticular ácido hialurónico, o una de sus sales, y opcionalmente otros polímeros biocompatibles,
- un método para preparar un hidrogel inyectable obtenido de acuerdo con dicho método de reticulación,
- un hidrogel obtenido de acuerdo con dicho método de reticulación, y
- el uso del hidrogel obtenido de acuerdo con dicho método de reticulación en los campos de la estética y la medicina.

10 El ácido hialurónico es un polisacárido formado por la repetición de una unidad de disacárido que consiste en ácido D-glucurónico y N-actetilglucosamina. La estructura es lineal y sin especificidad de especie. El ácido hialurónico está ampliamente distribuido en organismos vivos humanos y animales, en los que cumple muchas funciones biológicas, tales como, por ejemplo, el control del nivel de hidratación o el mantenimiento de la viscoelasticidad de fluidos o tejidos. Se encuentra de manera notable en una alta concentración en el líquido sinovial, el humor vítreo del ojo y en la dermis. Un ser humano de 70 kilos tiene aproximadamente 15 g de ácido hialurónico, la mitad de los cuales está presente en la piel y esta cantidad disminuye con el envejecimiento.

Los geles de ácido hialurónico son conocidos y se han usado en amplios campos de la estética y la medicina durante muchos años. Estos geles, de manera notable se inyectan comúnmente:

- 20 - en los ojos, durante cirugías oftalmológicas, con el fin de mantener el espacio intraocular y proteger los tejidos del ojo,
- en las articulaciones, en el caso de la artrosis, para complementar la deficiencia de líquido sinovial y restaurar temporalmente las propiedades condroprotectoras de dicho líquido biológico,
- dentro o debajo de la piel para rellenar arrugas o aumentar el volumen de ciertas áreas de la cara o del cuerpo.

25 El ácido hialurónico tiene una corta vida media en organismos vivos (menos de 1 semana). En el caso de muchas aplicaciones en estética y medicina, los hidrogeles inyectables administrados contienen ácido hialurónico estabilizado por reticulación, lo que ofrece la posibilidad de aumentar considerablemente la vida (denominada en lo sucesivo remanencia) de este polisacárido *in vivo* y, por lo tanto, la duración de la eficacia del producto inyectado. En consecuencia, por medio de esta modificación mediante reticulación, un hidrogel basado en ácido hialurónico reticulado tiene, por ejemplo, la capacidad de rellenar arrugas durante un período de varios meses.

30 Con el fin de aumentar la remanencia *in vivo* de un hidrogel inyectable basado en ácido hialurónico, un experto en la técnica sabe que puede aumentar el grado de reticulación del ácido hialurónico; pero esta modificación de la molécula genera un aumento de la viscosidad del gel y, por lo tanto, se producen dificultades para extruirlo a través de una aguja y posteriormente inyectar este gel en el área deseada por el facultativo. Esto necesariamente implica:

- 35 - o bien, limitar el grado de reticulación del ácido hialurónico y, por consiguiente, la remanencia del gel *in vivo*, con el fin de mantener una fuerza de expulsión satisfactoria,
- o bien, usar agujas de mayor diámetro para poder disminuir la fuerza de expulsión requerida para extruir el gel a través de esta aguja, lo que genera mayor dolor para el paciente tratado y también mayor traumatismo (equimosis, manchas rojas, inflamación, edemas, ...) en el área de inyección.

40 Se han propuesto muchas soluciones para superar este problema, para ello hay profesionales que buscan proporcionar formulaciones inyectables que tengan propiedades de remanencia y de viscosidad adecuadas y, por lo tanto, niveles satisfactorios para extruir el gel a través de una aguja. Se pueden citar, por ejemplo,

- formulaciones basadas en partículas de ácido hialurónico reticulado obtenidas mediante la desintegración del gel reticulado en partículas, generalmente mediante trituración; se han descrito diversos métodos de preparación para obtener este tipo de formulación, como es el caso de la solicitud de patente WO 97/04012,
- 45 - las formulaciones basadas en ácido hialurónico reticulado que contienen diferentes entidades de reticulación basadas en un método de preparación específico descrito en la solicitud de patente WO 2005/085329,
- formulaciones basadas en partículas de ácido hialurónico reticulado que contienen mezclas de geles reticulados que no están reticulados entre sí, es decir, no están unidos entre sí a través de enlaces covalentes; estas formulaciones se obtienen de acuerdo con un método de preparación específico descrito en la solicitud de patente
- 50 FR 2 924 615, y

- formulaciones basadas en ácido hialurónico reticulado, que consisten en partículas de ácido hialurónico reticulado que están reticuladas junto con una matriz de ácido hialurónico reticulado; estas formulaciones se preparan de acuerdo con la solicitud de patente EP 2 011 816 o la solicitud de patente US 2010/0028435.

Estas soluciones, sin embargo, no son completamente satisfactorias.

5 La solicitud de patente WO 97/04012 describe un método de fabricación específico que ofrece la posibilidad de obtener productos basados en polisacáridos (que pueden ser ácido hialurónico) en forma de partículas. Los geles en partículas basados en ácido hialurónico reticulado, también llamados "geles bifásicos" en la bibliografía, se caracterizan por la presencia de partículas con un diámetro comprendido entre aproximadamente 200 micrómetros y más de 1.000 micrómetros, dispersas en una disolución de ácido hialurónico no reticulado lo que da la posibilidad de facilitar la expulsión por un fenómeno de lubricación. Estos geles no son totalmente satisfactorios en la medida en que la extrusión del gel a través de una aguja sea irregular, en particular, con productos que contienen partículas de gran diámetro; en donde la disolución a base de ácido hialurónico no reticulado que desempeña el papel de vehículo se reabsorbe rápidamente *in vivo*, lo que implica una pérdida al menos parcial del efecto deseado (especialmente, una pérdida de relleno en los días posteriores a la inyección de productos destinados a producir volumen); y finalmente, en donde el perfil de seguridad del producto no es tan bueno (es decir, un mayor nivel de efectos secundarios) que con un gel basado en ácido hialurónico que no contiene partículas que puedan provocar una respuesta a un cuerpo extraño y/o generar migración de estas partículas bajo la acción mecánica del área tratada.

La solicitud de patente WO 2005/085329 describe un método de fabricación específico que se caracteriza por una etapa para iniciar la reticulación de una cantidad determinada de al menos un polímero (que puede ser ácido hialurónico), y luego mediante la adición de una cantidad adicional de polímero (que puede ser ácido hialurónico) con una masa molecular de más de 500.000 Da en disolución con dilución de la mezcla de reacción con el fin de disminuir la concentración global del polímero en disolución mientras continúa la reacción de reticulación. Esta disolución no brinda la posibilidad de producir una reticulación eficaz del ácido hialurónico. De hecho, la adición de una cantidad adicional de polímero está acompañada por dilución y, por lo tanto, una disminución de la concentración de ácido hialurónico en la mezcla de reacción. Las probabilidades de un encuentro entre las cadenas de ácido hialurónico y el agente de reticulación, por lo tanto, se reducen y la reacción de reticulación no es muy eficaz.

La solicitud de patente FR 2 924 615 describe un método de fabricación caracterizado por la mezcla homogénea de x polímeros (que pueden ser ácido hialurónico), ya sean idénticos o diferentes, que son reticulados antes de su mezclado. Por mezclado se entiende una yuxtaposición de x polímeros sin que se generen enlaces covalentes entre éstos últimos. Esta disolución no es completamente satisfactoria puesto que los polímeros no están unidos entre sí y, por lo tanto, el gel así obtenido se puede disociar dentro del área inyectada, especialmente bajo la acción de una tensión mecánica que puede ser altamente significativa en la misma. Por ejemplo, se puede hacer mención al caso de un producto inyectado en los labios con el fin de generar volumen; los labios están sujetos a fuertes tensiones mecánicas. La acción mecánica experimentada puede generar migración del gel implantado y, por lo tanto, efectos secundarios en el área tratada, pero también alrededor de esta área.

La solicitud de patente EP 2 011 816 se refiere a geles inyectables de polisacáridos (que pueden ser ácido hialurónico) que comprenden al menos un primer gel de polisacárido muy reticulado en forma de partículas, y al menos un gel de polisacárido poco reticulado que forma una matriz; dicho al menos un primer gel se une a través de enlaces covalentes a dicho al menos un segundo gel. A diferencia de los productos de la solicitud de patente WO 97/04012, las partículas muy reticuladas se unen a la matriz de polisacárido poco reticulado; la migración de las partículas está por lo tanto muy limitada con esta disolución a corto y/o mediano plazo, pero no a largo plazo (liberación de partículas muy reticuladas, con la posibilidad de migración, después de que el polisacárido poco reticulado haya sido reabsorbido en el tejido). Dado que esta disolución comprende partículas de polisacáridos, las cuales están muy reticuladas, el riesgo de una respuesta a un cuerpo extraño es, por lo tanto, significativo debido a la naturaleza particulada del producto y al alto grado de reticulación de estas partículas (en consecuencia, el ácido hialurónico se modifica significativamente, provocando así el no reconocimiento de la molécula por parte del organismo).

La solicitud de patente US 2010/0028435 describe un método para la preparación de formulaciones basadas en ácido hialurónico reticulado, que están hechas a partir de partículas de ácido hialurónico reticulado que están correticuladas a una matriz de ácido hialurónico reticulado. Por lo tanto, los mismos comentarios a los anteriormente proporcionados para la solicitud de patente EP 2 011 816 se aplican *mutatis mutandis*.

La presente invención ofrece la posibilidad de resolver estos diferentes inconvenientes proponiendo un método nuevo para reticular ácido hialurónico, o una de sus sales, u opcionalmente otros polímeros biocompatibles, ofreciendo el método la posibilidad de obtener un hidrogel que se caracteriza principalmente por:

- una buena capacidad de ser extruido a través de agujas y, por lo tanto, de poder ser inyectado fácilmente por un facultativo en el área a ser tratada sin que esto implique dolores y lesiones significativas para el paciente,
- la no conversión de una o más fases constitutivas del hidrogel en partículas durante el método de reticulación (pero

- que presenta bajas fuerzas de inyección a pesar de la ausencia de partículas que generalmente reducen la fuerza de inyección); la ausencia de partículas correticuladas en el producto da lugar a un perfil de seguridad significativamente mejorado (menos efectos secundarios y complicaciones a corto y/o medio/largo plazo), una mayor capacidad de integración/implantación del hidrogel en el tejido (una distribución más uniforme del producto en el tejido), y también da como resultado un método de producción significativamente más corto y menos complejo (porque la producción no implica tediosas etapas de trituración),
- 5
- excelentes propiedades viscoelásticas derivadas de la estructura específica del hidrogel obtenido, que ofrece la posibilidad de proponer al facultativo un producto con propiedades mecánicas/reológicas particulares para satisfacer sus expectativas para tratar el área deseada, al tiempo que se respeta su anatomía, los mecanismos fisiológicos que
- 10
- la rigen y, si procede, las propiedades mecánicas/reológicas requeridas que le permitirán corregir la deficiencia determinada,
  - una capacidad de ser implantado de manera sencilla en los tejidos del área a tratar debido a la estructura específica "multiestructurada" (y sin partículas reticuladas) del hidrogel obtenido,
  - una seguridad reforzada del hidrogel obtenido debido a una mayor capacidad de no disociarse dentro del área tratada y, por lo tanto, de no migrar hacia otras áreas vecinas o más distantes, especialmente bajo la acción de tensiones mecánicas,
- 15
- una estructura compleja de la matriz del hidrogel obtenido, que se caracteriza por ser "multiestructurada", lo que permite la optimización de la liberación controlada de sustancias activas y/o biológicas cuando sea aplicable,
  - remanencia optimizada del hidrogel obtenido con el fin de extender la eficacia del tratamiento estético o terapéutico, dando así la posibilidad de limitar el número de administraciones por procedimiento médico o quirúrgico.
- 20
- Con este fin, el objeto de la invención es un método nuevo para la reticulación de ácido hialurónico, o una de sus sales, y opcionalmente otros polímeros biocompatibles, que comprende al menos las etapas de:
- a) preparar una primera fase acuosa de ácido hialurónico, y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, parcialmente reticulados, caracterizada porque:
- 25
- se añade ácido hialurónico o una de sus sales y, opcionalmente, otros polímeros biocompatibles, a una disolución acuosa para obtener una concentración C1 de ácido hialurónico,
  - se añade una cantidad Q1 de agente de reticulación,
  - se obtiene una reticulación parcial del ácido hialurónico controlando la temperatura T1 y la duración t1 de la reacción de reticulación,
- 30
- en donde la primera fase acuosa preparada de ácido hialurónico parcialmente reticulado generalmente no se convierte en partículas,
- b) preparar al menos una segunda fase acuosa de ácido hialurónico, y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, parcialmente reticulados, caracterizados porque:
- 35
- se introduce ácido hialurónico o una de sus sales y, opcionalmente, otros polímeros biocompatibles, en una disolución acuosa para obtener una concentración C2 de ácido hialurónico,
  - se introduce una cantidad Q2 de agente de reticulación,
  - se obtiene una reticulación parcial del ácido hialurónico controlando la temperatura T2 y la duración t2 de la reacción de reticulación,
- 40
- en donde la al menos una segunda fase acuosa preparada de ácido hialurónico parcialmente reticulado generalmente no se convierte en partículas,
- c) introducir al menos la segunda fase de ácido hialurónico parcialmente reticulado en la primera fase, y luego realizar el mezclamiento de dichas al menos dos fases añadiendo opcionalmente una cantidad adicional Qm de agente de reticulación,
- 45
- d) continuar la reticulación de la mezcla preparada de antemano controlando la temperatura Tm y la duración tm de la reacción de reticulación.
- La reacción de reticulación de la mezcla luego se detiene, de manera ventajosa, mediante dilución con una disolución acuosa y/o mediante la eliminación del agente de reticulación sin reaccionar al llevarse a cabo la purificación.
- El método de reticulación de acuerdo con la invención consiste, por lo tanto, en mezclar durante la reticulación al
- 50
- menos dos fases acuosas de ácido hialurónico, y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, que ya se han

reticulado parcialmente, y luego continuar la reacción de reticulación para unir dichas al menos dos fases a través de enlaces covalentes.

5 Por "parcialmente reticulado" se entiende el hecho de que dichas al menos 2 fases acuosas de ácido hialurónico, que contienen opcionalmente otros polímeros biocompatibles, todavía tienen sitios de reacción disponibles en las cadenas poliméricas que son capaces de reaccionar con un agente reticulante para reticular/puentear nuevas cadenas de ácido hialurónico y/o de otros polímeros biocompatibles.

10 Es importante especificar que el método de reticulación de acuerdo con la invención no implica la preparación y/o adición de partículas reticuladas de ácido hialurónico, o de una de sus sales, o de cualquier otro polímero, durante las etapas de dicho método de reticulación, es decir, durante las etapas a, b, c y d como se describió anteriormente. Todas las fases parcialmente reticuladas no se convierten en ningún momento en partículas durante dicho método de reticulación mediante, por ejemplo, trituración. Por lo tanto, el método de reticulación de acuerdo con la invención no da lugar a la posibilidad de que las partículas reticuladas se reticulen junto con un gel de ácido hialurónico.

15 De acuerdo con una realización de la invención, la segunda fase acuosa de ácido hialurónico parcialmente reticulado tiene un mayor grado parcial de reticulación que el de la primera fase acuosa de ácido hialurónico parcialmente reticulado. Esta particularidad ofrece la posibilidad de facilitar el mezclamiento de la segunda fase más altamente reticulada dentro de la primera fase.

20 Por "grado parcial de reticulación" se entiende el nivel de reticulación de la fase justo antes de su mezclamiento con otra fase; el nivel de reticulación es sólo parcial, ya que se desarrollará posteriormente con la continuación de la reticulación durante el mezclamiento de las fases. Este nivel de reticulación se puede determinar para cada fase relevante midiendo experimentalmente el grado de reticulación y comparándolo con el grado teórico máximo de reticulación (el cual se puede calcular evaluando la relación del número de moles de agente reticulante introducido y del número de moles de unidades poliméricas que tienen la capacidad de reticulación). El grado de reticulación se puede evaluar experimentalmente, o bien de manera indirecta (por ejemplo, midiendo la fuerza de expulsión, véase el Ejemplo 2) o bien de manera directa (por ejemplo, mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), por ejemplo, usando el método descrito por Kenne *et al.*, (Kenne *et al.*, *Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels - definitions and analytical methods*, *Carbohydr. Polym.* 2013, 91: 410-418).

25 Por lo tanto, en general, el "grado parcial de reticulación" de la fase parcialmente reticulada es inferior al 90% (del máximo grado de reticulación teóricamente calculado), o inferior al 70%, o incluso inferior al 50%, o incluso inferior al 30%, o incluso inferior al 10%.

30 De acuerdo con una realización de la invención, la concentración C2 de ácido hialurónico es mayor que o igual a la concentración C1. Esta particularidad ofrece la posibilidad de facilitar el mezclamiento de la segunda fase más altamente concentrada dentro de la primera fase, pero también de obtener una mayor expansión de la segunda fase dentro de la primera fase (el ácido hialurónico tiene la capacidad de expandirse en agua, y aún más puesto que su concentración es significativa). Esto ofrece en consecuencia la posibilidad de producir una máxima "incrustación" 35 estérica por enmarañamiento de cadenas poliméricas de la segunda fase dentro de la primera, pero también de producir la reacción de reticulación que unirá las cadenas poliméricas de la primera y de la segunda fase, debido a una mayor proximidad física de estas cadenas y, por lo tanto, una mayor eficacia de la reacción para unir estas cadenas.

40 De acuerdo con una realización de la invención, la cantidad de agente de reticulación Q2 es mayor que o igual a la cantidad Q1, con el fin de obtener un grado parcial de reticulación mayor para la segunda fase que para la primera fase.

45 De acuerdo con una realización de la invención, la temperatura de reticulación T2 es mayor que o igual a la temperatura T1, con el fin de obtener un mayor grado parcial de reticulación para la segunda fase que para la primera. La temperatura de reticulación Tm, en sí, es mayor que T2 con el fin de maximizar la eficacia de la reacción de reticulación, permitiendo que la primera y la segunda fase se unan a través de enlaces covalentes.

50 De acuerdo con una realización de la invención, la duración de reticulación t2 es mayor o igual que la duración t1, con el fin de obtener un mayor grado parcial de reticulación para la segunda fase que para la primera. La duración de reticulación tm, en sí, puede ser mayor o igual a, pero también menor que, las duraciones t1 y t2. Esta duración tm depende de la temperatura Tm seleccionada para lograr la reticulación de la mezcla de dichas al menos dos fases.

55 Durante la preparación de la mezcla, las masas de la primera y de la segunda fase pueden ser iguales o diferentes. Dependiendo de las propiedades que se desea dar al hidrogel obtenido, de acuerdo con la presente invención, durante el mezclamiento, la presencia de una fase se debe producir de manera apropiada en relación a la otra y, por lo tanto, se debe usar una masa mayor de esta fase, con respecto a la otra. En consecuencia, se puede afirmar que desde un punto de vista mecánico/reológico, la fase que tiene el mayor grado de reticulación confiere al gel de acuerdo con la invención propiedades dominantes de elasticidad y remanencia con respecto a la fase que tiene un menor grado de reticulación. Por otro lado, la fase que tiene el menor grado de reticulación proporciona una fuerza de expulsión menor a esta fase y, por lo tanto, un uso más fácil del producto a inyectar. Con el hidrogel de acuerdo

con la invención, se observa por lo tanto sinergia en las propiedades resultantes en términos de características mecánicas/reológicas, de remanencia y de inyectabilidad. Esta sinergia se obtiene debido a la optimización de los dos parámetros que actúan mutuamente el uno sobre el otro: el bajo grado de reticulación de una de las fases produce una mejor inyectabilidad, así como la cohesión y flexibilidad global del hidrogel y reduce la remanencia y la elasticidad al tiempo que el alto grado de reticulación de la otra fase produce la remanencia, una naturaleza viscoelástica aún más pronunciada en favor de la elasticidad y, *a contrario sensu*, reduce la inyectabilidad, la cohesión y la flexibilidad. Esta sinergia, por lo tanto, ofrece la posibilidad de combinar las ventajas de cada una de las diferentes fases constitutivas al minimizar sus inconvenientes, al tiempo que se evitan los inconvenientes descritos previamente acerca de las composiciones que contienen partículas de polímero reticuladas. La optimización de las proporciones de cada fase reticulada dentro del hidrogel ofrece la posibilidad de obtener un producto fácilmente inyectable con el que es posible satisfacer las diferentes necesidades expresadas para el tratamiento en estética o medicina en términos de inyectabilidad, propiedades mecánicas/reológicas y remanencia.

De acuerdo con una realización de la invención, la reticulación de la mezcla de las diferentes fases parcialmente reticuladas se detiene al producirse la purificación para eliminar el agente reticulante no reaccionado residual. Esta purificación se lleva a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, con un baño de diálisis o mediante lavado con un flujo continuo de agua. Preferiblemente, se selecciona la purificación por diálisis usando una disolución isoosmolar y que tenga un pH adecuado. Al final de la reacción de reticulación de la mezcla de las diferentes fases parcialmente reticuladas y antes de la etapa de purificación del gel, puede ser ventajoso neutralizar el gel obtenido, de acuerdo con los métodos convencionales conocidos en el campo técnico, y por ejemplo añadiendo un ácido cuando la reticulación se ha realizado en un medio básico, y añadiendo una base cuando la reticulación se ha realizado en un medio ácido.

La invención se refiere a la reticulación del ácido hialurónico o de una de sus sales, y en particular a sus sales fisiológicamente aceptables tales como sales de sodio, calcio, cinc, potasio, ventajosamente sal de sodio. El ácido hialurónico puede ser de origen animal o se puede obtener mediante fermentación bacteriana. Éste puede tener una masa molecular de algunos Da a varios millones de Da, ventajosamente de aproximadamente 0,1 a 4 millones de Da.

La invención también se refiere a la reticulación de otros polímeros biocompatibles, en combinación con ácido hialurónico. Estos polímeros de origen natural o sintético deberían tener funciones químicas que les permitieran reticularse y deberían ser biocompatibles para que se puedan poner en contacto con fluidos o tejidos biológicos. Se pueden citar, por ejemplo, la familia de polisacáridos, poliésteres, polianhídridos, polifosfazenos, poli- $\epsilon$ -caprolactona, ácidos polilácticos y sus derivados, ácidos polivinílicos, poliacrilamidas, N-vinilpirrolidona y polímeros acrílicos y derivados biológicamente aceptables.

Las reacciones de reticulación se llevan a cabo en disoluciones acuosas en un medio ácido o básico, ventajosamente en un medio básico que tenga un pH preferiblemente comprendido entre 8 y 13. Los valores de pH de las disoluciones pueden ser idénticos o diferentes.

Los agentes de reticulación que están implicados en las diferentes reacciones de reticulación pueden ser idénticos o diferentes. En general, estos son agentes de reticulación bi- o polifuncionales de diferentes tipos y se pueden seleccionar, por ejemplo, de divinilsulfona, epóxidos bifuncionales o polifuncionales, carbodiimidas y formaldehídos. Preferiblemente, se seleccionan agentes de la familia de epóxidos bifuncionales o polifuncionales y, especialmente, 1,4-butanodioldiglicidiléter (BDDE), diepoxi-octano o 1,2-bis-(2,3-epoxipropil)-2,3-etileno. El uso de BDDE se prefiere más particularmente para cada una de las reacciones de reticulación que se llevarán a cabo.

Las temperaturas de reticulación generalmente están comprendidas entre aproximadamente 15°C y 60°C. Ventajosamente, son inferiores a 35°C para la reticulación de fases parcialmente reticuladas y superiores a 45°C para la reticulación de la mezcla de diferentes fases parcialmente reticuladas.

Las duraciones de reticulación son por lo general de varias horas, ventajosamente de más de 1 hora hasta aproximadamente 12 horas.

La reticulación de la mezcla de las diferentes fases parcialmente reticuladas se lleva a cabo preferiblemente con 2 fases, pero también se puede llevar a cabo con más de 2 fases que tengan diferentes grados parciales de reticulación.

Las proporciones en peso de cada fase parcialmente reticulada en la mezcla a reticular pueden variar ampliamente dependiendo de la composición exacta seleccionada, de los grados parciales de reticulación de las diferentes fases relevantes y de las propiedades finales deseadas. Generalmente, en la mezcla, la proporción en peso de la fase que tiene el mayor grado parcial de reticulación está comprendida entre aproximadamente 0,1 y 99,9%, o además entre aproximadamente 5 y 95%, o además entre 10 y 90%, o además entre 20 y 80%, o además entre 30 y 70%, o además entre 40 y 60%, o además entre 45 y 55% de la masa total de las diferentes fases de la mezcla.

El método de reticulación de acuerdo con la invención es diferente de los descritos en la técnica anterior. Ninguno de estos métodos implica la reticulación que consiste en mezclar durante la reticulación al menos 2 fases acuosas de ácido hialurónico y opcionalmente otros polímeros biocompatibles, que ya se han reticulado parcialmente, y luego

continuar la reacción de reticulación para unir dichas al menos 2 fases a través de enlaces covalentes, sin preparar y/o añadir artículos de ácido hialurónico reticulado o una sal del mismo, o de cualquier otro polímero, en las etapas de dicho método de reticulación.

5 Los documentos relevantes de la técnica anterior considerados como los más cercanos a la presente invención son los siguientes:

- La solicitud de patente WO 97/04012 describe un método de reticulación específico para un polisacárido que puede ser ácido hialurónico; un método que comprende las etapas de:

- o poner el polisacárido en una disolución acuosa,
- o iniciar la reacción de reticulación añadiendo un agente de reticulación,

10 o introducir condiciones estéricas desfavorables para la reacción de reticulación, siendo estas condiciones preferiblemente una dilución de la mezcla de reacción durante la reticulación, y

o reintroducir condiciones estéricas favorables para la reacción de reticulación, siendo estas condiciones preferiblemente una concentración de la mezcla de reacción por evaporación para completar la reacción de reticulación.

15 A diferencia de la presente invención, esta solicitud de patente no implica el mezclamiento de diferentes fases de ácido hialurónico parcialmente reticuladas durante la reticulación. Por otro lado, la presente invención no se caracteriza por proporcionar condiciones estéricas desfavorables (tal como una dilución) y luego condiciones estéricas favorables (tal como una evaporación) durante la reacción de reticulación: la reticulación de acuerdo con la invención se lleva a cabo en condiciones favorables con el fin de optimizar el rendimiento.

20 - La solicitud de patente WO 2005/085329 describe un método de reticulación específico que se caracteriza por:

- o una etapa para iniciar la reticulación de una cantidad determinada de al menos un polímero, y
- o adición de una cantidad adicional de polímero con una masa molecular de más de 500.000 Da en disolución, con dilución de la mezcla de reacción con el fin de disminuir la concentración global del polímero en la disolución mientras continúa la reacción de reticulación.

25 A diferencia de la presente invención, esta solicitud de patente no implica el mezclamiento de diferentes fases de ácido hialurónico parcialmente reticuladas durante la reticulación.

Esta solicitud de patente implica una adición de polímero durante la reacción de reticulación, pero este polímero no ha sido sometido a reticulación preliminar, ya sea parcial o total. Por otro lado, a diferencia de la presente invención, esta adición de polímero va necesariamente acompañada de una dilución de la mezcla de reacción que tiene la consecuencia de proporcionar condiciones estéricas desfavorables y, por lo tanto, una continuación no muy eficaz de la reacción de reticulación.

30

- La solicitud de patente FR 2 924 615 describe un método para preparar un hidrogel caracterizado por el mezclamiento homogéneo de x polímeros, ya sean idénticos o diferentes, reticulados antes de mezclar.

35 A diferencia de la presente invención, esta solicitud de patente no implica el mezclamiento de diferentes fases de ácido hialurónico parcialmente reticuladas durante la reticulación. Los x polímeros, reticulados de antemano y cuya reacción de reticulación se detuvo para cada uno de ellos, se mezclan con el fin de obtener una yuxtaposición sencilla de estos x polímeros sin generar enlaces covalentes: no hay reticulación entre estos diferentes polímeros.

- La solicitud de patente EP 2 011 816 describe un método para preparar un hidrogel que comprende las etapas de:

40 o preparar partículas de un primer polisacárido muy reticulado de acuerdo con técnicas de trituración conocidas por un experto en la técnica con el fin de obtener partículas con un tamaño de gránulo deseado,

- o suspender estas partículas,
- o agregar al menos un segundo polisacárido, y

45 o reticular dicho al menos un segundo polisacárido hasta un grado de reticulación X2 para obtener al menos un segundo polisacárido poco reticulado y reticular conjuntamente dicho al menos un segundo polisacárido poco reticulado con dichas partículas.

A diferencia de esta solicitud de patente, la presente invención no implica el uso de partículas reticuladas (preparación y/o adición en la mezcla de reacción) durante la reticulación. Especialmente, no hay etapa de trituración que permita la preparación de las partículas de ácido hialurónico reticuladas durante el método de reticulación de la presente invención:

- para fases parcialmente reticuladas, antes de mezclar estas fases para continuar la reticulación, y
- para mezclar las fases parcialmente reticuladas, durante la continuación de la reticulación.

- La solicitud de patente US 2010/0028435 describe un método para preparar un gel inyectable similar al de la solicitud de patente EP 2 011 816.

5 El gel de la solicitud de patente US 2010/0028435 se obtiene al conseguir la mutua reticulación de partículas reticuladas de ácido hialurónico con un gel de ácido hialurónico.

A diferencia de esta solicitud de patente (pero también a diferencia de la solicitud de patente EP 2 011 816), el método de reticulación de acuerdo con la invención no implica ninguna preparación y/o adición de partículas reticuladas de ácido hialurónico, o de una de sus sales, o de cualquier otro polímero, durante las etapas de dicho método de reticulación. El método de reticulación de acuerdo con la invención, por lo tanto, no permite la reticulación mutua de las partículas reticuladas con un gel de ácido hialurónico.

La invención también se refiere a un método para preparar un hidrogel inyectable formado por ácido hialurónico, o una de sus sales, y opcionalmente otros polímeros biocompatibles, reticulados de acuerdo con el método de reticulación descrito anteriormente. Este método de preparación se caracteriza porque comprende al menos las siguientes etapas sucesivas:

- reticular el ácido hialurónico, o una de sus sales, y opcionalmente otros polímeros biocompatibles, de acuerdo con el método de reticulación descrito anteriormente,
- purificar la mezcla por medio de una disolución isoosmolar que tenga un pH adecuado,
- homogenizar la mezcla con la adición opcional de uno o varios polímeros biocompatibles y/o de una o varias sustancias que puedan proporcionar un beneficio para el organismo como sustancias activas,
- opcionalmente, desgasificar y/o liofilizar,
- acondicionar en una jeringa o en un matraz o en cualquier otro recipiente hermético, y
- esterilizar

Ventajosamente, el hidrogel inyectable de acuerdo con la invención se acondiciona en jeringas, y luego se esteriliza de acuerdo con cualquier medio *per se* conocido y preferiblemente por autoclave, para uso directo y/o comercialización.

La invención también se refiere a un hidrogel obtenido de acuerdo con el método de reticulación descrito anteriormente. Este hidrogel consiste en al menos ácido hialurónico reticulado o una de sus sales, y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, caracterizado por una mezcla de varias fases de ácido hialurónico reticulado que tienen diferentes grados de reticulación, estando dichas fases unidas entre sí a través de enlaces covalentes. Por lo tanto, el hidrogel obtenido mediante el método de reticulación de acuerdo con la invención se puede caracterizar como que está compuesto por una sola fase reticulada "multiestructurada" sin partículas correticuladas.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el hidrogel puede estar basado en un derivado de ácido hialurónico, es decir, basado en la molécula obtenida al modificar a través de una ruta química, o cualquier otra ruta, la molécula de ácido hialurónico.

El hidrogel de acuerdo con la invención tiene una buena capacidad de ser extruido a través de agujas y, por lo tanto, de ser fácilmente inyectado por un facultativo en el área a tratar sin que esto implique dolor y lesiones significativas para el paciente. Esta ventaja resulta de la matriz compleja "multiestructurada" derivada del método de reticulación de acuerdo con la invención, que ofrece la posibilidad de producir una mejor inyectabilidad debido a la lubricación inducida por la presencia dentro del producto de una fase que tiene un menor grado de reticulación.

El hidrogel de acuerdo con la invención no incluye y no está compuesto por partículas correticuladas. Esto ofrece la ventaja de un perfil de seguridad significativamente mejorado en comparación con los productos que contienen partículas (menos efectos secundarios y complicaciones a corto y/o medio/largo plazo) y una mayor capacidad de integración/implantación del hidrogel en el tejido (distribución más uniforme del producto en el tejido).

Debido a su característica "multiestructurada", el hidrogel de acuerdo con la invención posee excelentes propiedades mecánicas/reológicas de viscoelasticidad (es decir, de viscosidad y elasticidad). La presencia dentro del hidrogel de acuerdo con la invención de al menos 2 fases en proporciones iguales o diferentes, y con diferentes grados de reticulación, ofrece la posibilidad de satisfacer de manera óptima las necesidades de los facultativos para tratar el área deseada, al tiempo que se respeta su anatomía, los mecanismos fisiológicos que la rigen y, si corresponde, las propiedades mecánicas/reológicas requeridas que le permitirán corregir la deficiencia determinada (por ejemplo, fuerte elasticidad para generar volumen alrededor de un pómulo).

El hidrogel de acuerdo con la invención tiene buena capacidad de ser "bioimplantado" en los tejidos. Su matriz "multiestructurada" proporciona una gran flexibilidad que permite la infiltración optimizada del producto en los tejidos dando lugar así a la limitación de las lesiones posteriores a la inyección y por lo tanto la limitación de efectos secundarios como dolor en el área inyectada, pero también la reacción inflamatoria después de cualquier inyección.

5 La estructura específica del hidrogel, caracterizada por el hecho de que las diferentes fases están unidas entre sí mediante enlaces covalentes, también permite reforzar la seguridad del implante administrado al mejorar la capacidad del producto de no disociarse y, por lo tanto, de migrar hacia otras áreas vecinas o más alejadas, especialmente bajo la acción de tensiones mecánicas del área tratada.

10 La matriz "multiestructurada" del hidrogel también ofrece la posibilidad de tener fases con un alto grado de reticulación conservándose al mismo tiempo un producto inyectable, lo que da lugar a una mejor remanencia del hidrogel y, por lo tanto, una extensión de la eficacia del tratamiento estético o terapéutico, pero limitando aún más el número de administraciones por procedimiento médico o quirúrgico.

15 El alto nivel de seguridad del implante de la presente invención, junto con su estructura compleja específica que le otorga de manera notable propiedades mecánicas/reológicas y de biointegración que se pueden adaptar y optimizar dependiendo del área a tratar, lo convierte en un producto de elección para liberación controlada y/o retardada de una o varias sustancias que pueden proporcionar un beneficio para el organismo y especialmente sustancias activas y/o entidades biológicas tales como células, plaquetas enriquecidas, genes, fragmentos de ADN o factores de crecimiento. La presencia de diferentes fases dentro del producto, fases que tienen diferentes grados de reticulación pero también diferentes concentraciones de polímeros, ofrecen la posibilidad de liberar cada una de estas  
20 sustancias en diferentes momentos y, por lo tanto, optimizar la desalinización y el perfil de acción de uno o varios ingredientes o compuestos activos de origen biológico para tratamiento local o general.

El hidrogel de acuerdo con la invención se implanta ventajosamente por inyección en los tejidos y/o fluidos de organismos humanos o animales vivos.

25 El hidrogel de acuerdo con la invención también se puede usar en una forma no inyectable. En este caso, el facultativo implanta el producto estéril de la presente invención depositándolo en el área a tratar por medio de instrumentos médicos y/o quirúrgicos adecuados.

30 El hidrogel de acuerdo con la invención también se puede usar en composiciones de uso tópico, de acuerdo con una formulación adecuada, por ejemplo, en la piel, el cabello, las uñas, la córnea del ojo, los dientes, los labios, las mucosas internas y externas y heridas. En este caso, puede contener todos los compuestos que pueden proporcionar uno o varios beneficios al área a tratar, como por ejemplo vitaminas, antioxidantes, moléculas hidratantes, proteínas, sustancias activas con o sin acción farmacológica, entidades biológicas tales como células, plaquetas enriquecidas, genes, fragmentos de ADN o factores de crecimiento, agentes colorantes, pigmentos, moléculas olorosas o moléculas aromáticas. Estos compuestos están dispersados en el hidrogel, o injertados en uno o varios de los polímeros del hidrogel, o contenidos/encapsulados en otro material disperso dentro del hidrogel.

35 De acuerdo con un aspecto de la invención, la concentración total de hidrogel de ácido hialurónico, o de una de sus sales, está comprendida entre 0,01 y 50 mg/ml, preferiblemente entre 1 y 35 mg/ml, ventajosamente entre 8 y 30 mg/ml.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el hidrogel de acuerdo con la invención se liofiliza parcial o totalmente para obtener un semisólido o un polvo.

40 De acuerdo con un aspecto de la invención, el hidrogel de acuerdo con la invención contiene una o varias sustancias activas de origen natural o sintético con o sin acción farmacológica, tales como, por ejemplo, antioxidantes, antiinflamatorios, antisépticos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes anticancerígenos, anestésicos locales, proteínas, hormonas, ya sean solos o como una combinación. Estas sustancias activas están dispersadas en el hidrogel o injertadas en uno o varios polímeros del hidrogel, o contenidas/encapsuladas en otro material disperso dentro del hidrogel. En el último caso, como ejemplo, se puede hacer mención a la encapsulación de una  
45 sustancia activa, tal como un antiinflamatorio, en microesferas basadas en un polímero derivado de ácido poliláctico o poli-ε-caprolactona.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el hidrogel de acuerdo con la invención contiene lidocaína dispersa dentro de su matriz reticulada.

50 De acuerdo con un aspecto de la invención, el hidrogel de acuerdo con la invención contiene uno o varios compuestos de origen biológico tales como células, plaquetas enriquecidas, genes, fragmentos de ADN o factores de crecimiento. Estos compuestos están dispersados preferiblemente en el hidrogel, pero también pueden estar injertados en uno o varios de los polímeros del hidrogel o pueden estar contenidos/encapsulados en otro material disperso dentro del hidrogel.

55 De acuerdo con un aspecto de la invención, el hidrogel de acuerdo con la invención contiene polímeros que están dispersados dentro de la matriz reticulada del hidrogel. Por ejemplo, se pueden citar los polímeros de la familia de

polisacáridos, poliésteres, polianhídridos, polifosfacenos, poli-ε-caprolactona, ácidos polilácticos y derivados de los mismos, ácidos polivinílicos, poliacrilamidas, N-vinilpirrolidona y polímeros acrílicos y derivados biológicamente aceptables.

5 De acuerdo con un aspecto de la invención, el hidrogel de acuerdo con la invención contiene sustancias minerales que se dispersan dentro de la matriz reticulada del hidrogel. Por ejemplo, se puede hacer mención a la hidroxiapatita o a los fosfatos tricálcicos tal como el fosfato tricálcico β.

10 De acuerdo con un aspecto de la invención, el hidrogel de acuerdo con la invención se mezcla con una o varias otras sustancias, preferiblemente estériles, que puedan proporcionar un beneficio para el organismo, justo antes de su administración a un paciente. El mezclamiento es llevado a cabo luego por el usuario final, es decir, por un facultativo o por personal autorizado, de acuerdo con un método adecuado usando uno o varios dispositivos de mezclamiento que dan la posibilidad de producir una mezcla satisfactoria y de mantener la esterilidad si se requiere. Por ejemplo, se puede hacer mención al mezclamiento realizado por el usuario final del hidrogel de acuerdo con la invención y de uno o varios compuestos tales como sustancias activas, entidades biológicas o sustancias minerales:

15 - realizando viajes de ida y vuelta entre dos recipientes (uno lleno con el hidrogel de acuerdo con la invención y el otro lleno con el compuesto a dispersar en el hidrogel), estos recipientes pueden ser, por ejemplo, jeringas, y

- extruyendo simultáneamente los contenidos de ambos recipientes (uno lleno con el hidrogel de acuerdo con la invención y el otro lleno con el compuesto a dispersar en el hidrogel) con el fin de unir los diferentes compuestos y/o mezclarlos en otro recipiente antes de su administración al paciente.

20 La invención también se refiere al uso del hidrogel obtenido de acuerdo con el método de reticulación descrito anteriormente para aplicaciones estéticas o terapéuticas.

Los beneficios proporcionados por la presente invención hacen posible usar el hidrogel obtenido de acuerdo con el método de reticulación descrito anteriormente para muchas aplicaciones en estética y en medicina, y especialmente en aquellas ya ampliamente descritas en la bibliografía para el ácido hialurónico (véase, por ejemplo, Volpi *et al.*, *Curr. Med. Chem.* 2009, 16: 1718 - 45).

25 El hidrogel de acuerdo con la invención se usa, por lo tanto, para aplicaciones estéticas o terapéuticas en humanos o en animales. Se implanta ventajosamente en el organismo del paciente mediante inyección, pero también se puede implantar en forma no inyectable y, en este caso, se deposita en el área a tratar por un facultativo por medio de un instrumento médico y/o quirúrgico adecuado. Finalmente, puede ser utilizado por aplicación tópica.

El hidrogel de acuerdo con la invención se usa especialmente para:

30 - llenar volúmenes,

- generar espacios dentro de ciertos tejidos, favoreciendo así su funcionamiento óptimo,

- sustitución de líquidos fisiológicos o tejidos deficientes,

- estimular o favorecer la regeneración de los tejidos,

- hidratación y protección de los tejidos, y

35 - entrega de sustancias que pueden proporcionar un beneficio para el organismo y, en particular, sustancias activas y/o entidades biológicas.

Como ejemplo, se pueden mencionar los usos del hidrogel en los siguientes casos:

- formulación de una composición intradérmica o implantable por vía subcutánea para mejorar la calidad de la piel, rellenar arrugas o restaurar volúmenes faciales (pómulos, mentón, labios, nariz, ...) o del cuerpo,

40 - formulación de un cosmético o cosmeceútico que tenga la finalidad de hidratar y/o proporcionar al organismo compuestos de diferentes naturalezas, como vitaminas, antioxidantes, moléculas hidratantes, sustancias activas, entidades biológicas, agentes colorantes, pigmentos, moléculas olorosas o moléculas aromáticas,

- formulación de una composición tópica oftalmológica, por ejemplo, para hidratar la córnea a largo plazo,

45 - formulación de una composición tópica o implantable para uso dental, por ejemplo, para rellenar bolsas parodontales y/o para estimular la regeneración de los tejidos alrededor del diente,

- formulación de una composición implantable por vía intraocular, especialmente para su aplicación durante la cirugía de la catarata, del glaucoma, de la presbicia o del humor vítreo,

- formulación de composiciones implantables por vía intraarticular para aplicaciones en ortopedia o en reumatología, especialmente en el ámbito de la viscosuplementación de líquidos sinoviales deficientes para el tratamiento de la

artrosis, pero también para la reconstrucción ósea o regeneración del cartílago,

- formulación de una composición implantable por vía urinaria para aplicaciones en el tratamiento de la incontinencia urinaria o fecal,

5 - formulación de una composición tópica o implantable utilizada en medicina o en cirugía general en el ámbito del tratamiento de la fibrosis o para mejorar la cicatrización de heridas, y

- formulación de una composición farmacéutica tópica o implantable que permita la liberación retardada y/o controlada de sustancias activas y/o entidades biológicas para diferentes aplicaciones médicas.

### Ejemplos

La invención se ilustrará ahora de forma no limitativa mediante los siguientes ejemplos.

10 El hialuronato sódico, la carboximetilcelulosa sódica, el hidrocloreuro de lidocaína, la hidroxiapatita fosfocálcica y todo el resto de otros compuestos usados en los ejemplos tienen un alto grado de pureza.

La inyectabilidad de los geles preparados se determinó midiendo la fuerza requerida (en Newtons) para expulsar el gel contenido en una jeringa de vidrio de 1 ml (BD Hypak SCF, RF-PRTC de 1 ml de longitud) a través de una aguja dada a una velocidad de 12,5 mm/min.

15 Las propiedades reológicas de los geles se midieron a 25°C por medio de un reómetro AR2000 (TA Instruments) usando una geometría plana de 40 mm y un espacio de 1.000 µm.

### Ejemplo 1

Preparación de un gel 1 de acuerdo con la invención

#### a) Preparación de una fase parcialmente reticulada A

20 Se pesaron 4,70 g de fibras de hialuronato de sodio (NaHA) con una masa molecular aproximadamente igual a 3,0 MDa y con un nivel de humedad del 13,8%, a lo que se añadieron 45,75 g de una disolución acuosa de NaOH al 1% en peso.

La hidratación de las fibras tardó 1 h 20 min, con homogenización manual regular con una espátula.

25 Se añadieron 1,41 g de una disolución de 1,4-butanodiol diglicidiléter (BDDE) diluido a 1:5 en una disolución de NaOH al 1% en peso al medio de reacción, seguido de homogenización manual durante 15 minutos.

El gel así obtenido se dividió en tres masas iguales para preparar las siguientes tres fracciones:

- la fracción 1 se introdujo en un baño termostático a 30°C durante 1 h y luego se diluyó con una disolución tampón de fosfato que contenía HCl para obtener una concentración de NaHA de 20 mg/ml y un pH neutro (= fase A'). La fase A' se homogenizó mecánicamente durante 10 min (= gel A').

30 - la fracción 2 se introdujo en un baño termostático a 50°C durante 2 h y luego se diluyó con una disolución tampón de fosfato que contenía HCl para obtener una concentración de NaHA de 20 mg/ml y un pH neutro (= fase A''). La fase A'' se homogenizó mecánicamente durante 10 min (= gel A'').

- la fracción 3 se introdujo en un baño termostático a 30°C durante 1 h.

Que A sea la fase parcialmente reticulada obtenida.

#### 35 b) Preparación de una fase B parcialmente reticulada

Se pesaron 5,25 g de fibras de hialuronato de sodio (NaHA) con una masa molecular aproximadamente igual a 3,0 MDa y con un nivel de humedad del 13,8%, a lo que se añadieron 45,75 g de una disolución acuosa de NaOH al 1% en peso.

La hidratación de las fibras tardó 1 h 20 min, con homogenización manual regular con una espátula.

40 Se añadieron 2,73 g de una disolución de 1, 4-butanodiol diglicidiléter (BDDE) diluido a 1:5 en una disolución de NaOH al 1% en peso a la mezcla de reacción, seguido de 15 minutos de homogenización manual con una espátula.

El gel así obtenido se dividió en tres masas iguales para preparar las siguientes tres fracciones:

45 - la fracción 1 se introdujo en un baño termostático a 30°C durante 1 h y luego se diluyó con una disolución tampón de fosfato que contenía HCl para obtener una concentración de NaHA de 20 mg/ml y un pH neutro (= fase B'). La fase B' se homogenizó mecánicamente durante 10 min (= gel B').

- la fracción 2 se introdujo en un baño termostático a 50°C durante 2 h y luego se diluyó con una disolución tampón de fosfato que contenía HCl para obtener una concentración de NaHA de 20 mg/ml y un pH neutro (= fase B"). La fase B" se homogenizó mecánicamente durante 10 min (= gel B").

- la fracción 3 se introdujo en un baño termostático a 30°C durante 1 h.

5 Que B sea la fase parcialmente reticulada obtenida.

*c) Combinación de las fases parcialmente reticuladas A y B, y continuación de la reticulación*

Se añadieron 9,0 g de la fase parcialmente reticulada A en 13,0 g de la fase parcialmente reticulada B y se sometieron a mezclamiento mecánico durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la inmersión en un baño termostático a 50°C durante 2 h.

10 El producto reticulado se neutralizó a un pH = 7,0 en una disolución tampón de fosfato que contenía HCl, en la cual se dejó expandir durante 24 h y luego se dializó durante 24 h con una disolución tampón de fosfato para eliminar el BDDE que no había reaccionado.

Después de la homogenización mecánica durante 10 minutos, se obtuvo un gel 1 que tenía una concentración de hialuronato de sodio de 20 mg/ml.

15 **Ejemplo 2**

Caracterización del gel 1 del Ejemplo 1

Los geles 1, A', A'', B' y B'' se introdujeron en jeringas de vidrio de 1 ml y las fuerzas requeridas para extruir los geles a través de una aguja de 27G½ a una velocidad de 12,5 mm/min se indican en la tabla a continuación.

Gel sometido a ensayo	Fuerza de expulsión (N)
1	23,3
A'	6,1
B'	7,0
A''	6,7
B''	25,1

20 Se ve que:

- las reacciones de reticulación son parciales para las fases A y B. De hecho, las fuerzas de eyección de A'' y B'' son mayores que las de A' y B', respectivamente, lo que demuestra que los geles A'' y B'' están más reticulados que A' y B', y

25 - el gel 1 de acuerdo con la invención tiene una fuerza de expulsión menor que la de B'' y, por lo tanto, tiene una inyectabilidad mejor que el gel que no ha sido sometido al método de reticulación de acuerdo con la invención.

Las propiedades reológicas de viscoelasticidad G' y G'' del gel 1 a 1,0 Hz también se miden.

Gel sometido a ensayo	G' (1,0 Hz) en Pa	G'' (1,0 Hz) en Pa
1	96	0,40

**Ejemplo 3**

Preparación de un gel 2 de acuerdo con la invención

30 a) *Preparación de una fase parcialmente reticulada C*

Se pesaron 4,2 g de polvo de hialuronato de sodio (NaHA) con una masa molecular aproximadamente igual a 2,0 MDa y un nivel de humedad del 6,3%, a lo que se agregaron 0,3 g de carboximetilcelulosa de sodio (42 mPa·s, 2% en agua, a 20°C) con un nivel de humedad del 2,0%, y se añadieron 33,6 g de una disolución acuosa de NaOH al 1% en peso.

35 La hidratación del polvo tardó 1 h 20 min, con homogenización manual regular con una espátula.

Que H sea la fase hidratada obtenida.

5 Se añadieron 1,80 g de una disolución de 1,4-butanodiol diglicidiléter (BDDE) diluida a 1:5 en una disolución de NaOH al 1% en peso a 27,0 g de la fase H, luego se llevó a cabo una homogenización manual con una espátula durante 15 minutos, seguido de la introducción de la mezcla de reacción en un baño termostático a 50°C durante 1 h 30 min.

*b) Preparación de una fase parcialmente reticulada D*

10 Se añadieron 0,10 g de una disolución de 1,4-butanodiol diglicidiléter (BDDE) diluida a 1:5 en una disolución de NaOH al 1% en peso a 3,0 g de la fase H anteriormente obtenida, luego se llevó a cabo una homogenización manual con una espátula durante 15 min, seguido de la introducción de la mezcla de reacción en un baño termostático a 50°C durante 2 h.

*c) Combinación de las fases parcialmente reticuladas C y D, y continuación de la reticulación*

La fase parcialmente reticulada D se añadió a la fase parcialmente reticulada C y se sometió a mezclado mecánico durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la inmersión en un baño termostático a 50°C durante 2 h 30 min.

15 El producto reticulado se neutralizó a un pH = 7,0 en una disolución tampón de fosfato que contenía HCl, en la que se dejó expandir durante 24 h y luego se dializó durante 24 h con una disolución tampón de fosfato para eliminar el BDDE que no había reaccionado.

Después de la homogenización mecánica durante 10 minutos, se obtuvo un gel 2 que tenía una concentración de hialuronato de sodio de 20 mg/ml.

20 **Ejemplo 4**

Preparación de una formulación inyectable 1 de acuerdo con la invención

En el 25% de la masa del gel 2 obtenido en el Ejemplo 3, se añadió 0,3% en peso de hidrocloreto de lidocaína en polvo y se llevó a cabo la homogenización mecánica durante 15 minutos.

25 El gel así obtenido se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml, y luego las jeringas se esterilizaron en un autoclave a 121°C durante 20 min.

**Ejemplo 5**

Preparación de una formulación inyectable 2 de acuerdo con la invención

30 En el 25% de la masa del gel 2 obtenido en el Ejemplo 3, se añadió 30% en peso de un polvo de hidroxiapatita fosfocálcica con un tamaño de partícula de entre 30 y 50 µm y se llevó a cabo la homogenización mecánica durante 15 minutos.

El gel así obtenido se introdujo en jeringas de vidrio de 1 ml, y estas jeringas se esterilizaron luego en un autoclave a 121°C durante 20 min.

**Ejemplo 6**

Caracterización de la formulación inyectable 1 del Ejemplo 4

35 La formulación estéril obtenida en el Ejemplo 4 resultó ser fácilmente inyectable a través de una aguja fina de 27G½; se midió una fuerza de inyección de 21,3 N a una velocidad de 12,5 mm/min.

El pH y la osmolaridad de esta formulación son fisiológicos:

- pH = 6,9

- Osmolaridad = 290 mOsm/kg H<sub>2</sub>O

40 Las caracterizaciones reológicas dieron como resultado un módulo elástico G' de 74 Pa y una Tan δ de 0,25 a una frecuencia de 1,0 Hz.

Es importante señalar que estas características reológicas son compatibles con la inyección en la dermis o por vía subcutánea.

En dos matraces de 10 ml F1 y F2 que contenían 8 ml de agua purificada, se introdujeron:

45 - 1 ml de gel Restylane® (Galderma Q-Med, Uppsala, Suecia) en F1;

Restylane® es un producto a base de ácido hialurónico reticulado a 20 mg/ml conocido durante más de 10 años en medicina estética, y

- 1 ml de la formulación inyectable 1 en F2.

- 5 F1 y F2 se agitaron manualmente durante 5 segundos. Después de otros 10 segundos, se observó que el producto Restylane® estaba completamente disociado en agua (suspensión de partículas hialurónicas reticuladas en agua), que no es el caso de la formulación inyectable 1 que siempre estuvo en forma de gel en agua. El nivel de cohesividad de la formulación inyectable 1 es, por lo tanto, mucho más alto que el del producto Restylane®.

### Ejemplo 7

- 10 Comparación de la producción de un gel de acuerdo con la invención con el de la técnica anterior (solicitud de patente US 2010/0028435)

a) Preparación de un gel 2 de acuerdo con la invención

Véase el Ejemplo 3.

b) Preparación de un gel X de la técnica anterior de acuerdo con el Ejemplo 4 de la solicitud de patente US 2010/0028435

- 15 Se pesaron 3,50 g de polvo de hialuronato de sodio (NaHA) con una masa molecular aproximadamente igual a 2,0 MDa y con un nivel de humedad del 6,3%, a lo que se añadieron 24,0 g de una disolución acuosa de NaOH al 1% en peso.

La hidratación del polvo tardó 1 h, seguido de la homogenización manual durante 10 minutos con una espátula.

- 20 Se añadieron 700 µl de BDDE al medio de reacción, seguido de la homogenización manual durante 10 minutos con una espátula antes de la inmersión en un baño termostático a 50°C durante 2 h.

El producto reticulado se neutralizó a un pH = 7,0 en una disolución tampón de fosfato que contenía HCl, en la que se dejó expandir durante 24 h (volumen final = 92 ml).

El gel así obtenido se trituró en partículas por el paso en serie del mismo a través de una rejilla de 250 µm.

Que Xp sea las partículas obtenidas.

- 25 Se pesaron 3,50 g de polvo de hialuronato de sodio (NaHA) con una masa molecular aproximadamente igual a 2,0 MDa y con un nivel de humedad del 6,3%, a lo que se añadieron 30,5 g de una disolución acuosa de NaOH al 1% en peso.

La hidratación del polvo tardó 1 h seguido de una homogenización manual de 10 minutos con una espátula.

- 30 Se añadieron 263 µl de BDDE al medio de reacción, seguido de una homogenización manual durante 10 minutos con una espátula antes de la inmersión en un baño termostático a 50°C durante 2 h.

Que Xg sea el producto reticulado obtenido.

Se añadieron 58 g de partículas Xp y 24 g de una disolución acuosa de NaOH al 1% en peso al producto reticulado Xg, seguido de homogenización con una espátula durante 10 min y la continuación de la reacción de reticulación durante 6 h a 25°C.

- 35 El producto reticulado se neutralizó a un pH = 7,0 en una disolución tampón de fosfato que contenía HCl, en la que se dejó expandir durante 24 h, y luego se dializó durante 24 h con una disolución tampón de fosfato para eliminar el BDDE sin reaccionar.

Después de la homogenización mecánica durante 30 minutos, se obtuvo un gel X.

c) Comparación de los procedimientos de producción del gel 2 y el gel X

- 40 El gel 2 y el gel Y se introdujeron en jeringas de vidrio de 1 ml y se extruyeron a través de agujas de 27G½ (6 ensayos para cada gel/inyección manual por un técnico). El gel 2 y el gel X se inyectaron fácilmente a través de la aguja, sin embargo, es importante señalar que se encontró que el gel 2 de acuerdo con la invención tenía una homogeneidad mucho mayor dentro de la jeringa. De hecho, durante las inyecciones, el técnico que realizó el ensayo observó muchas irregularidades con el gel X (no fue el caso con el gel 2 de la invención) con respecto a la fuerza que debe aplicarse al émbolo de la jeringa; irregularidades caracterizadas por el técnico como "presiones".
- 45 Por otro lado, entre las seis jeringas analizadas del gel X, no se pudieron descargar completamente dos jeringas porque la aguja estaba completamente bloqueada/obstruida por el gel (no fue el caso con el gel 2 de acuerdo con la invención).

Como se describió anteriormente, la técnica anterior enseña que la conversión de un gel reticulado en partículas permite disminuir la fuerza de expulsión del producto y, por lo tanto, mejorar su inyectabilidad a través de una aguja (el hidrogel muy reticulado se trituró formando partículas de pequeño tamaño que es más probable que pasen por el agujero de la aguja). Sorprendentemente, el gel 2 de la invención, que no se sometió a ninguna etapa de trituración de fases parcialmente reticuladas (una de las cuales está muy reticulada y la otra está menos reticulada), pero tiene una fase reticulada obtenida de la combinación y reticulación de dichas dos fases parcialmente reticuladas, también se encontró que fue fácilmente inyectable y también más homogéneo. La estructura compleja "multiestructurada" (y sin reticulación) de acuerdo con la invención hace posible, por lo tanto, abordar el problema de la inyectabilidad descrito en la técnica anterior sin tener que triturar el producto para convertirlo en partículas.

Se realizaron ensayos de tinción con azul de toluidina en muestras de gel tomadas durante el procedimiento de preparación del gel 2 y del gel X con el fin de evaluar si la estructura del gel era particulada o no. Con este fin, se dispusieron aproximadamente 0,1 g de gel a someter a ensayo en un portaobjetos de vidrio y se añadieron cinco gotas de una disolución acuosa de azul de toluidina (0,1 g de azul de toluidina por 100 g de agua desionizada), y luego se colocó un segundo portaobjetos de vidrio sobre el primer portaobjetos de vidrio. El resultado fue visto bajo un microscopio con un aumento de 40X y se tomó una fotografía.

Se realizaron los siguientes ensayos de color:

- para el gel 2: para las fases parcialmente reticuladas C y D (véanse las figuras 1 y 2) y para el producto reticulado obtenido de las fases parcialmente reticuladas C y D (véase la Figura 3), después de la neutralización a un pH neutro de tres muestras;

- para el gel X: para las partículas Xp (véase la Figura 4) y para el producto reticulado obtenido por correticulación de partículas Xp (véase la Figura 5), después de la neutralización a un pH neutro de dos muestras.

En contraste con la Figura 4 (y también la Figura 5), en la que las partículas reticuladas con NaHA son claramente visibles, la estructura del gel de las figuras 1 a 3 que se refiere al gel 2 de acuerdo con la invención no está particulada. La no conversión de las fases parcialmente reticuladas durante el método de reticulación de la invención permite obtener un hidrogel que no contiene partículas de NaHA correticuladas.

Esto representa una ventaja significativa sobre los productos de la técnica anterior, y especialmente sobre los productos descritos en el documento de patente US 2010/0028435 y también en el documento de patente EP 2 011 816. De hecho, como se describe en la bibliografía y también en las solicitudes de patente US 2010/0028435 y EP 2 011 816, las partículas reticuladas generan efectos secundarios y complicaciones a corto plazo, así como a largo plazo (en el documento de patente EP 2 011 816, las partículas reticuladas se describen específicamente como que generan reacciones más o menos fuertes contra materias extrañas). En la presente invención, la ausencia de partículas correticuladas representa, por lo tanto, una mejora importante con respecto a las invenciones descritas en los documentos de patente US 2010/0028435 y EP 2 011 816 con respecto a un mejor perfil de seguridad del producto al tiempo que sigue siendo fácilmente inyectable.

Por otra parte, también es importante señalar que los documentos de patente US 2010/0028435 y EP 2 011 816 reivindican limitar la migración de partículas altamente reticuladas dentro del cuerpo debido a la correticulación de estas partículas con una matriz de NaHA poco reticulada. Esto es cierto a corto plazo, pero la migración de partículas altamente reticuladas vuelve a ser posible a largo plazo, cuando se ha reabsorbido la matriz de NaHA poco reticulada. Este último punto corrobora aún más el perfil de seguridad mejorado del hidrogel inyectable de acuerdo con la invención, en donde no se produce el problema de migración de partículas reticuladas a largo plazo (el hidrogel de acuerdo con la invención no contiene partículas correticuladas).

Otra ventaja importante es la mejor integración (= biointegración/bioimplantación) en los tejidos del producto de acuerdo con la invención en comparación con los productos de partículas correticuladas conocidas a partir del documento de patente US 2010/0028435 y también del documento de patente EP 2 011 816. De hecho, como se describe en diversas publicaciones científicas (por ejemplo, Tran C. *et al.*, *In vivo bio-integration of three HA fillers in human skin: a histological study*, *Dermatology* 2014, 228: 4754, o Micheels, P. *et al.*, *Superficial dermal injection of HA soft tissue fillers: comparative ultrasound study*, *Dermatol. Surg.* 2012, 38: 1162-1169), la inyección de productos a base de NaHA reticulado y particulado en la dermis (por ejemplo, de los productos divulgados en los documentos de patente US 2010/0028435 y EP 2 011 816) se distribuyen de forma significativamente más heterogénea en comparación con los productos a base de NaHA reticulado y no particulado (como en el caso del hidrogel de acuerdo con la invención).

También es importante señalar que el método de preparación de un hidrogel de acuerdo con la invención requiere un tiempo significativamente más corto para fabricar un producto en comparación con los métodos descritos en los documentos de patente US 2010/0028435 y EP 2 011 816. Una comparación del tiempo de fabricación para el gel 2 de la invención (aproximadamente 55 h) y el gel X de acuerdo con el documento de patente US 2010/0028435 (aproximadamente 85 h) pueden ilustrar este punto. Esto proporciona una clara ventaja económica y también minimiza el riesgo de contaminación bacteriana del gel durante la fabricación, que aumenta con la duración del proceso de fabricación.

**Ejemplo 8**

Comparación de la producción de un gel de acuerdo con la invención con el de la técnica anterior (documento de patente EP 2 011 816)

*a) Preparación de un gel 2 de acuerdo con la invención*

5 Véase el Ejemplo 3.

*b) Preparación de un gel Y de la técnica anterior de acuerdo con el Ejemplo 1 de solicitud de patente EP 2 011 816*

Se pesaron 1,00 g de polvo de hialuronato de sodio (NaHA) con una masa molecular aproximadamente igual a 2,0 MDa y con un nivel de humedad del 6,3%, a lo que se añadieron 6,2 g de una disolución acuosa de NaOH al 1% en peso.

10 La hidratación del polvo tardó 1 h 20 min, con homogenización manual regular con una espátula.

Se añadieron 0,15 g de BDDE al medio de reacción, seguido de homogenización manual durante 10 minutos con una espátula antes de la inmersión en un baño termostático a 50°C durante 2 h 30 min.

El producto reticulado se introdujo en agua desionizada durante 24 h, en donde se usaron tres baños sucesivos, cada uno durante 8 h, con el fin de eliminar el BDDE sin reaccionar.

15 El gel así obtenido se trituró en partículas por el paso en serie del mismo a través de una rejilla de 250 µl y las partículas se dejaron drenar durante 2 h.

Que Yp sea las partículas obtenidas.

20 Se añadieron 5,0 g de partículas Yp a 0,8 g de polvo de hialuronato de sodio (NaHA) con una masa molecular aproximadamente igual a 2,0 MDa y con un nivel de humedad del 6,3%, a lo que se añadieron 2,0 g de una disolución acuosa de NaOH al 1% en peso.

La mezcla se homogenizó manualmente durante 30 minutos antes de la adición de 0,03 g de BDDE y luego se homogenizó de nuevo durante 30 minutos antes de la inmersión de la mezcla de reacción en un baño termostático a 50°C durante 2 h 30 min.

Que Yg sea el producto reticulado obtenido.

25 El producto Yg reticulado se neutralizó a un pH = 7,0 en una disolución tampón de fosfato que contenía HCl, en la que se dejó expandir durante 24 h, y luego se dializó durante 24 h con una disolución tampón de fosfato para eliminar el BDDE sin reaccionar.

Después de la homogenización manual durante 30 minutos, se obtuvo un gel Y.

*c) Comparación de los procedimientos de producción del gel 2 y el gel Y*

30 Como en el Ejemplo 7, los geles 2 e Y se cargaron en jeringas de vidrio de 1 ml y se extruyeron a través de una aguja de 27G½. Se encontró que los dos geles se inyectaron fácilmente a través de la aguja y se aplican los mismos comentarios que los proporcionados con respecto al Ejemplo 7: se encontró que el gel 2 de acuerdo con la invención fue más homogéneo ya que su inyección a través de la aguja fue más regular que la del gel Y. Sorprendentemente, aunque el gel 2 de la invención, que no se sometió a ninguna etapa de trituración para convertirlo en partículas con el fin de facilitar su inyectabilidad, la estructura compleja "multiestructurada" del gel 2 presenta una baja fuerza de expulsión similar a la del gel Y, que se sometió a una etapa de convertir su fase muy reticulada en partículas.

35 Como en el Ejemplo 7, la tinción con azul de toluidina se realizó en muestras de gel tomadas durante el procedimiento de preparación del gel 2 y el gel Y.

Se realizaron los siguientes ensayos de color:

40 - para el gel 2: para las fases parcialmente reticuladas C y D (véanse las figuras 1 y 2) y para el producto reticulado obtenido de las fases parcialmente reticuladas C y D (véase la Figura 3), después de la neutralización a un pH neutro de tres muestras;

- para el gel Y: para las partículas Yp (véase la Figura 6) y para el producto reticulado obtenido por correticulación de partículas Yp (véase la Figura 7), después de la neutralización a un pH neutro de dos muestras.

45 La conclusión es la misma que la del Ejemplo 7. En contraste con la Figura 6 (y también la Figura 7), en la que las partículas reticuladas de NaHA son claramente visibles, la estructura de gel de las figuras 1 a 3 relacionada con el gel 2 de acuerdo con la invención no es particulada.

Por lo tanto, la presente invención permite obtener un hidrogel fácilmente inyectable, a pesar del hecho de que no se trituró (parcial o totalmente) para formar partículas durante su procedimiento de reticulación. En consecuencia, la ausencia de partículas correticuladas en el gel permite lograr una mejora significativa (en comparación con el gel obtenido en el documento de patente EP 2 011 816):

5 - se mejora el perfil de seguridad a corto y largo plazo, en particular, no hay migración de partículas altamente reticuladas a largo plazo como en el documento de patente EP 2 011 816;

- se mejora la biointegración del gel en los tejidos (distribución más homogénea) debido a la ausencia de partículas correticuladas.

10 Finalmente, como en el Ejemplo 7, es importante resaltar que la fabricación del gel de acuerdo con la invención tiene una ventaja económica y minimiza el riesgo de contaminación por partículas y bacterias ya que el proceso de fabricación es significativamente más rápido que el descrito en el documento de patente EP 2 011 816 (aproximadamente 55 h para el gel de acuerdo con la invención en comparación con 83 h para el gel de acuerdo con el documento de patente EP 2 011 816), y no se requieren una o varias etapas de trituración complejas y tediosas como las requeridas en el documento de patente EP 2 011 816.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para reticular ácido hialurónico, o una de sus sales, y opcionalmente otros polímeros biocompatibles, caracterizado porque comprende al menos las etapas de:
- 5 a) preparar una primera fase acuosa de ácido hialurónico, y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, parcialmente reticulados, caracterizada por:
- la adición de ácido hialurónico o una de sus sales y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, en una disolución acuosa con el fin de obtener una concentración de ácido hialurónico C1
  - la adición de una cantidad Q1 de agente de reticulación
  - lograr una reticulación parcial del ácido hialurónico al controlar la temperatura T1 y la duración t1 de la reacción de reticulación,
- 10 en donde, la primera fase acuosa preparada de ácido hialurónico parcialmente reticulado no se convierte en partículas;
- b) preparar al menos una segunda fase acuosa de ácido hialurónico, y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, parcialmente reticulados, caracterizada por:
- 15 - la adición de ácido hialurónico, o una de sus sales y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, en una disolución acuosa con el fin de obtener una concentración de ácido hialurónico C2
- la adición de una cantidad Q2 de agente de reticulación
  - lograr la reticulación parcial del ácido hialurónico al controlar la temperatura T2 y la duración t2 de la reacción de reticulación,
- 20 en donde, la al menos una segunda fase acuosa preparada de ácido hialurónico parcialmente reticulado no se convierte en partículas;
- c) añadir la al menos una segunda fase de ácido hialurónico parcialmente reticulado en la primera fase, y luego producir una mezcla de dichas al menos dos fases añadiendo opcionalmente una cantidad adicional Qm de agente de reticulación; y
- 25 d) continuar la reticulación de la mezcla preparada de antemano controlando la temperatura Tm y la duración tm de la reacción de reticulación,
- en donde, el método de reticulación no implica la adición de partículas de ácido hialurónico reticulado o una de sus sales, o de cualquier otro polímero, durante los etapas a, b, c y d de dicho método de reticulación.
- 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la segunda fase acuosa de ácido hialurónico parcialmente reticulado tiene un grado parcial de reticulación mayor que el de la primera fase acuosa de ácido hialurónico parcialmente reticulado y/o porque la concentración de ácido hialurónico C2 es mayor que o igual a la concentración C1.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la cantidad de agente de reticulación Q2 es mayor o igual que la cantidad Q1 y/o porque la temperatura de reticulación T2 es mayor que o igual a la temperatura T1, y la temperatura de reticulación Tm es mayor que la temperatura T2.
- 35 4. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la duración de reticulación t2 es mayor que o igual a la duración t1 y/o porque las masas respectivas de la primera y de la segunda fases acuosas de ácido hialurónico parcialmente reticulado en la mezcla son iguales o diferentes.
5. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la reticulación de la mezcla se detiene por dilución con una disolución acuosa y/o por eliminación del agente de reticulación sin reaccionar al llevarse a cabo la purificación lograda por diálisis.
- 40 6. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque las reacciones de reticulación se llevan a cabo mediante la acción de uno o varios agentes de reticulación polifuncionales, por ejemplo, seleccionados del grupo de epóxidos bifuncionales o polifuncionales, divinilsulfona, carbodiimidas o formaldehído, particularmente porque las reacciones de reticulación se llevan a cabo por acción del agente de reticulación 1,4-butanodioldiglicidiléter (BDDE).
- 45 7. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque las sales de ácido hialurónico son las de sodio, calcio, cinc o potasio.
8. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el ácido hialurónico, o una de

sus sales, tiene una masa molecular comprendida entre 0,1 y 4 millones de Da.

9. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el ácido hialurónico puede ser un derivado de ácido hialurónico, es decir, una molécula obtenida al modificar a través de una ruta química, o a través de cualquier otra ruta, la molécula de ácido hialurónico.

5 10. Un método para preparar un hidrogel inyectable, caracterizado porque comprende al menos las siguientes etapas sucesivas:

- reticulación de ácido hialurónico, o de una de sus sales y opcionalmente de otros polímeros biocompatibles, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,

- purificación de la mezcla por medio de una disolución isoosmolar y con un pH adecuado,

10 - homogenización de la mezcla con la adición opcional de uno o varios polímeros biocompatibles y/o de una o varias sustancias que puedan proporcionar un beneficio al organismo tal como sustancias activas,

- desgasificación y/o liofilización opcional,

- acondicionamiento en una jeringa o en un matraz o en cualquier otro recipiente hermético, y

- esterilización.

15 11. Un hidrogel obtenido de acuerdo con la reivindicación 10, que consiste en al menos ácido hialurónico reticulado o una de sus sales y opcionalmente en otros polímeros biocompatibles, caracterizado por una mezcla de varias fases de ácido hialurónico reticulado que tienen diferentes grados de reticulación, estando dichas fases unidas entre sí a través de enlaces covalentes, en donde la concentración total de ácido hialurónico o de una de sus sales está comprendida, por ejemplo, entre 0,01 y 50 mg/ml.

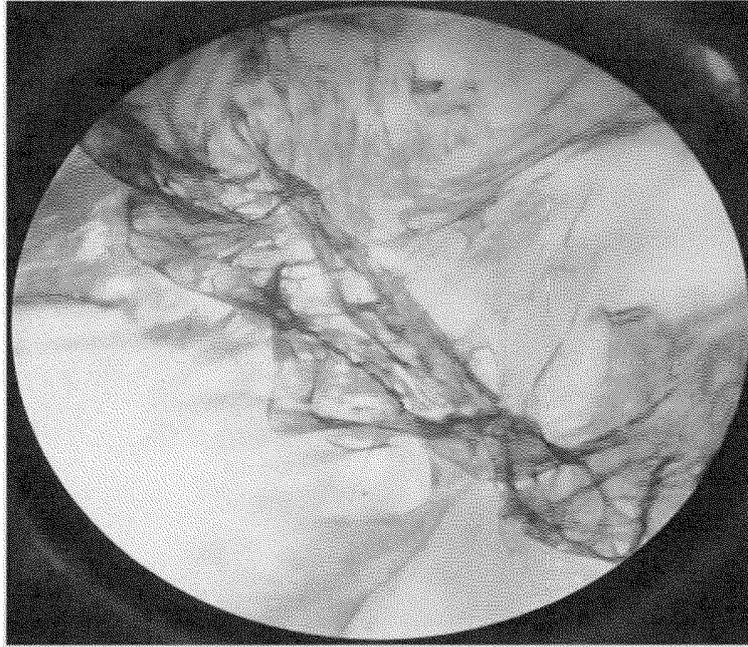
20 12. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque comprende una o varias sustancias activas, con o sin acción farmacológica, tales como, por ejemplo, antioxidantes, antiinflamatorios, antisépticos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes anticancerígenos, proteínas, hormonas, anestésicos locales, entidades biológicas, solos o como una combinación.

25 13. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, caracterizado porque contiene lidocaína dispersa dentro de su matriz reticulada y/o porque contiene una o varias sustancias minerales dispersas dentro de la matriz reticulada.

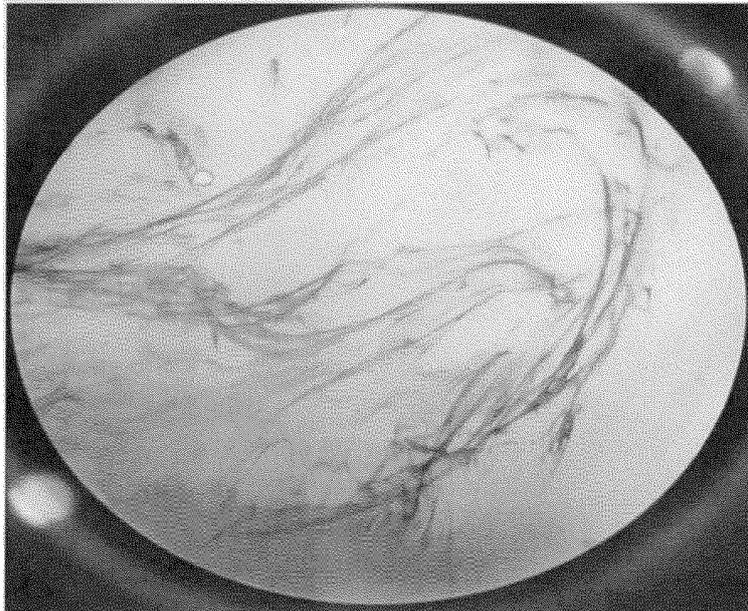
14. Un kit que comprende un hidrogel de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 a 13, acondicionado en jeringas estériles.

15. El uso de un hidrogel de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 a 13, para aplicaciones estéticas no terapéuticas y no quirúrgicas.

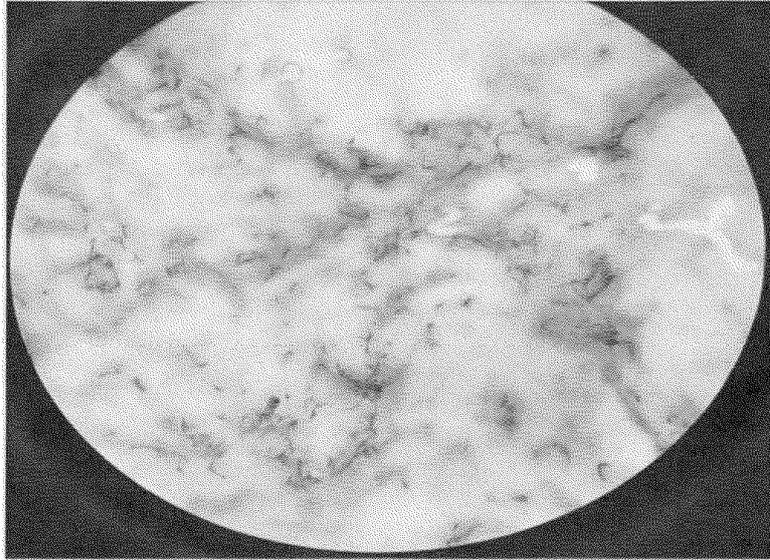
30 16. Un hidrogel de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 a 13, para usar en terapia.



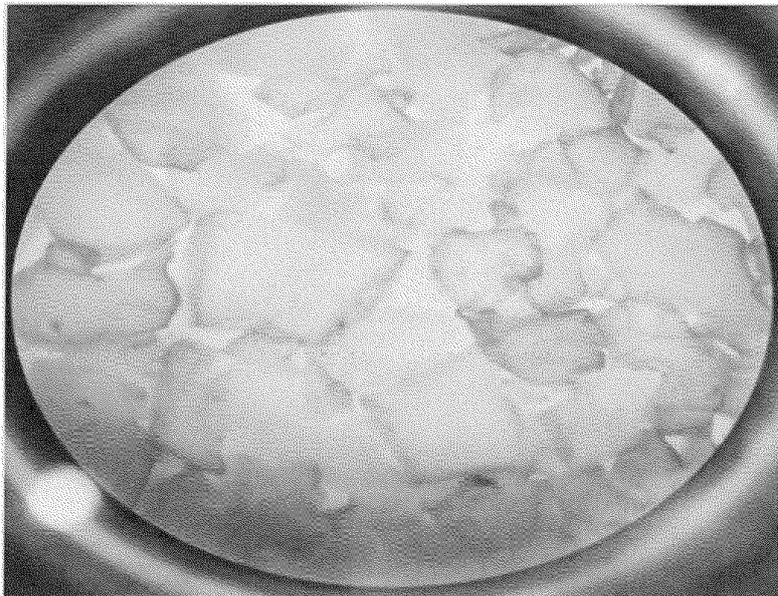
**Figura 1**



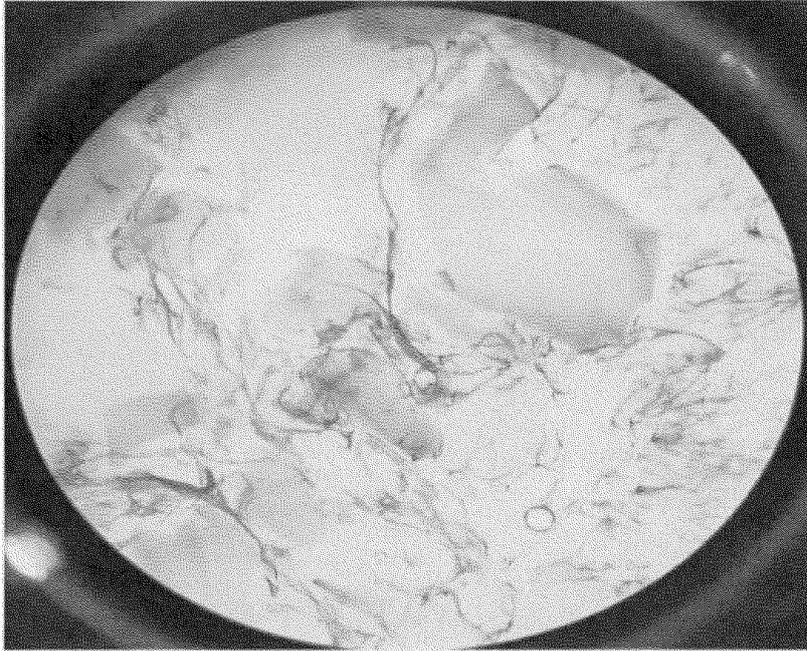
**Figura 2**



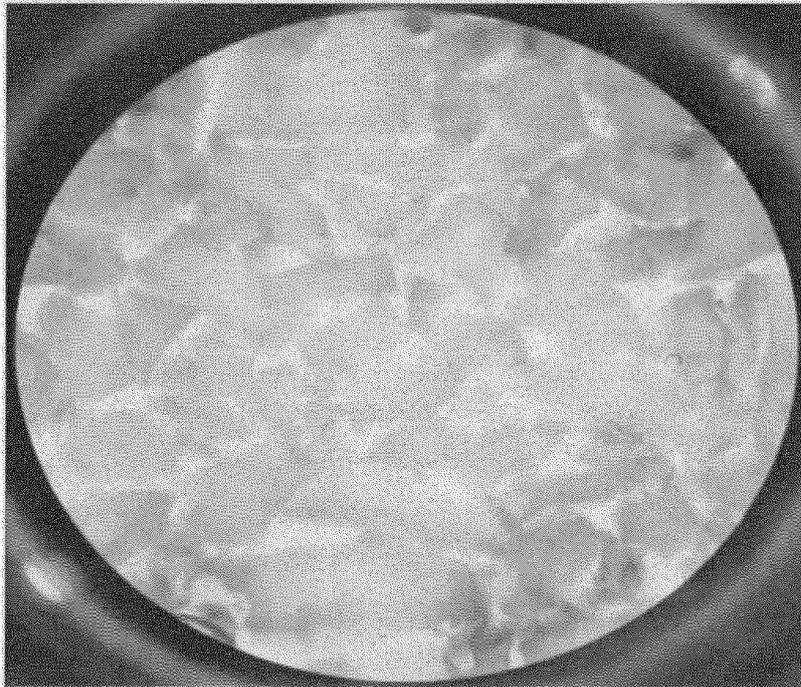
**Figura 3**



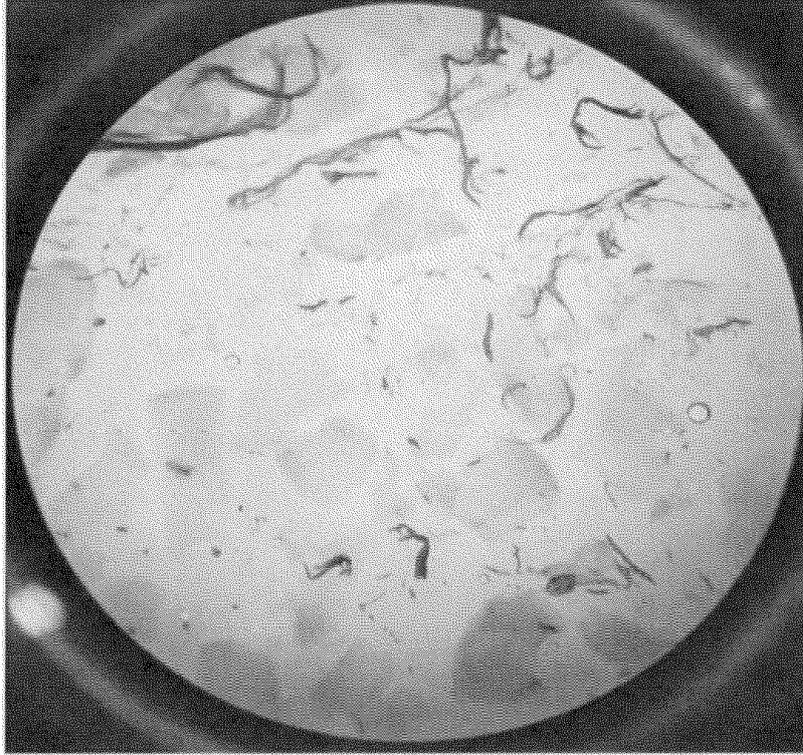
**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**