

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 547**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/73** (2006.01)

**A61K 31/738** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

**C08J 3/24** (2006.01)

**A61J 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/IB2010/052027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10131175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10726239 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2429486**

54 Título: **Procedimiento para preparar un gel reticulado**

30 Prioridad:

**11.05.2009 FR 0953108**

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

**22.12.2017**

73 Titular/es:

**TEOXANE (100.0%)  
Les Charmilles Rue de Lyon 105  
1203 Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**BOURDON, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 647 547 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**

Procedimiento para preparar un gel reticulado

La presente invención se refiere a un nuevo método para preparar hidrogeles basados en un polímero reticulado, más particularmente que se derivan de polisacárido, y preferiblemente de ácido hialurónico o de una de sus sales.

- 5 La presente invención propone, en particular, un procedimiento que hace posible obtener una calidad de hidrogel que es particularmente ventajosa para el relleno de larga duración de defectos volumétricos de la piel.

10 El ácido hialurónico es conocido por sus propiedades viscoelásticas y también por su gran propensión a absorber agua. Sus propiedades explican en gran medida la elasticidad de la piel. Sus biocompatibilidades, tolerancia y ausencia de toxicidad son tales que durante más de diez años esta molécula ha tenido aplicaciones en campos médicos y cosméticos.

El ácido hialurónico se utiliza especialmente para rellenar arrugas.

15 Las arrugas se originan más particularmente a partir de un debilitamiento local de la estructura de la dermis. Por lo tanto, la inyección en la dermis de un hidrogel polimérico reticulado en las arrugas a tratar hace posible reducir, o incluso eliminar la depresión de la epidermis. Las inyecciones se llevan a cabo utilizando jeringas pre-cargadas que contienen el hidrogel estéril. Sin embargo, las depresiones más profundas requieren la inyección de geles relativamente viscosos.

20 Se sabe, en general, que cualquier molécula es mucho más resistente a la degradación y al calor cuando se reticula. Por lo tanto, se conoce la ventaja de reticulación de ácido hialurónico. Este ácido hialurónico reticulado es, además, mucho más estable en el cuerpo que la molécula de ácido hialurónico. También es más capaz de resistir la esterilización en un autoclave.

25 Ya se ha propuesto un cierto número de procedimientos para preparar geles reticulados de polímeros, o incluso de polisacáridos. En general, estos procedimientos requieren dos etapas principales, la primera consiste en disolver el polímero en cuestión en un medio adecuado para su homogeneización y la segunda pretende añadir un agente capaz de inducir la reticulación del mismo. Dependiendo de las condiciones específicas utilizadas para la reticulación, resulta posible ajustar la viscosidad o también las propiedades reológicas del hidrogel reticulado formado.

30 A modo de ilustración de estos procedimientos, se pueden mencionar especialmente los procedimientos descritos en el documento US 2006/0105022, que comprende el uso de una mezcla que comprende al menos 10% de ácido hialurónico, un agente reticulante y agua en condiciones ácidas o básicas, en el documento WO 2006/056204, que comprende una etapa de tratar el gel de ácido hialurónico reticulado con divinilsulfona y en el documento US 2007/0036745, que da como resultado un gel cohesivo partiendo de un polímero hialurónico reticulado con divinilsulfona (DVS).

Sin embargo, todos estos procedimientos no dan una satisfacción completa.

35 Como se deduce de lo anterior, la reticulación hace que sea necesario tener primero una disolución homogénea del polímero de partida.

40 Sin embargo, para disolver un polímero, tal como ácido hialurónico, la disolución se debe llevar a cabo con agitación suave, a fin de preservar, lo mejor posible, la integridad y el tamaño inicial de las cadenas poliméricas, del orden de varios millones de Dalton en el caso del ácido hialurónico. Para satisfacer esta limitación, esta etapa de homogeneización se lleva a cabo convencionalmente con una agitación mecánica muy reducida y, por lo tanto, debe prolongarse en el tiempo, por ejemplo hasta 12 horas, lo que, a escala industrial, resulta perjudicial.

Con respecto a la reticulación, que condiciona las cualidades del hidrogel reticulado final, también es importante que sea uniforme en el gel.

45 Sin embargo, los procedimientos actuales no posibilitan dar a un gel un grado idéntico de reticulación en ningún punto. De hecho, estos procedimientos generalmente requieren formular el polímero dentro de un receptáculo, tal como recipientes o tanques (lote) que no permiten una difusión uniforme de las condiciones ambientales necesarias para que tenga lugar la reticulación o su detención, especialmente en el caso de una reticulación estática. Esto da como resultado geles reticulados que pueden tener una disparidad relativa en términos de grado de reticulación, afectando esta uniformidad, por supuesto, a sus cualidades.

Finalmente, con respecto al uso para el que están destinados estos geles, es importante asegurarse de que tengan cualidades sanitarias irreprochables. Esta inocuidad podría reforzarse especialmente minimizando considerablemente los contactos de los diversos medios adquiridos en estos procedimientos con el entorno externo.

5 La presente invención tiene como objetivo precisamente proponer un procedimiento que haga posible responder favorablemente a las restricciones mencionadas anteriormente.

Por lo tanto, los autores de la invención han descubierto que es posible no solo mejorar la homogeneización del polímero antes de la reticulación, sino también mejorar la progresión correcta del proceso de reticulación, sujeto al uso de todas las etapas necesarias para su conversión en un gel reticulado dentro de una cavidad hermética específica.

10 Por tanto, la presente invención describe un procedimiento para preparar un gel reticulado de al menos un polímero o una de sus sales, que comprende al menos las etapas que consisten en:

- a) proporcionar un medio acuoso que contiene dicho polímero,
- b) formar un gel homogéneo a partir del medio de la etapa a),
- 15 c) poner en contacto el gel obtenido en la etapa b) con una cantidad eficaz de al menos un agente reticulante;
- d) reticular dicha mezcla formada en la etapa c); y
- e) recuperar dicho hidrogel reticulado,

20 en el que al menos dichas etapas a) a d) se llevan a cabo dentro de una cavidad hermética delimitada, al menos parcialmente, por una pared deformable, estando dicha mezcla presente en la cavidad expuesta, en la etapa d), a condiciones propicias para la reticulación.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un gel reticulado de al menos un polisacárido o una de sus sales, que comprende al menos las etapas que consisten en:

- a) proporcionar un medio acuoso que contiene dicho polisacárido,
- 25 b) formar un gel homogéneo a partir del medio de la etapa a),
- c) poner en contacto el gel obtenido en la etapa b) con una cantidad eficaz de al menos un agente reticulante;
- d) reticular dicha mezcla formada en la etapa c); y
- e) recuperar dicho hidrogel reticulado,

en el que

- 30 - al menos dichas etapas a) a d) se llevan a cabo dentro de una cavidad hermética delimitada, al menos parcialmente, por una pared deformable, haciéndose dicha cavidad dentro de una bolsa deformable, siendo expuesta la mezcla presente en la cavidad, en la etapa d), a condiciones propicias para la reticulación,
- la homogeneización, considerada en la etapa b), se lleva a cabo opcionalmente mediante deformaciones mecánicas sucesivas de la cara externa de la pared deformable o de la bolsa.

35 De acuerdo con una realización particular, el procedimiento comprende, además, una etapa f) de detener la reticulación que consiste en exponer el gel reticulado a condiciones que conducen a detener su reticulación, siendo posible llevar a cabo esta etapa antes, junto con o después de la etapa de recuperación e).

De acuerdo con una variante de realización preferida, la etapa f) se lleva a cabo antes de la etapa de recuperación e).

40 De acuerdo con esta realización ventajosa, todas las etapas a) a d) y f) se llevan a cabo dentro de dicha cavidad. La reticulación se detiene exponiendo el gel presente en la cavidad hermética a condiciones que conducen a detener la reticulación.

45 De acuerdo con una realización preferida, el receptáculo en el que está hecha la cavidad puede estar provisto de medios de sellado, por una parte propicia a la incorporación de reaccionantes y, por otra parte, adecuados para garantizar una hermeticidad total durante las etapas b) a d), o incluso a) y f).

Sin embargo, esta hermeticidad también puede obtenerse mediante el ajuste del receptáculo dentro del aparato utilizado para asegurar la homogeneización de la etapa b).

50 De acuerdo con una realización particular, la etapa a) de dicho procedimiento se caracteriza por el hecho de que la cavidad contiene inicialmente el polímero o una de sus sales, introduciéndose dicho medio acuoso consecutivamente o viceversa.

De acuerdo con una variante de realización preferida, dicha cavidad está hecha dentro con una bolsa deformable.

Más particularmente, el polímero es un polisacárido, ácido hialurónico o una de sus sales.

Ventajosamente, el gel de polímero obtenido es un gel de fase única y más particularmente un gel sólido, es decir despojado de la capacidad de fluir bajo su propio peso tal como, por ejemplo, una goma.

5 Contra toda expectativa y como se desprende de los tests presentados más adelante, el hecho de llevar a cabo la homogeneización y la reticulación en una cavidad como se definió arriba, y más particularmente una bolsa deformable, hace posible obtener una calidad de hidrogel que no puede obtenerse por medio de un procedimiento convencional, es decir, en el que todas las operaciones se llevan a cabo dentro de un receptáculo abierto y sólido, es decir, un receptáculo no hermético e indeformable.

10 Las propiedades de deformabilidad del receptáculo de acuerdo con la invención y su naturaleza hermética hacen posible, aparentemente, llevar a cabo las etapas de homogeneización y reticulación en condiciones óptimas que dan como resultado un gel reticulado que tiene propiedades de inyectabilidad mayores que las mostradas por un gel obtenido de acuerdo con un procedimiento convencional. Las propiedades de inyectabilidad en cuestión de acuerdo con la invención son las mostradas por el gel reticulado, recuperado una vez que se ha detenido la reticulación, es decir, sin un tratamiento complementario.

15 Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención posibilita una agitación de acuerdo con la etapa a) por deformación de la pared o de todas las paredes deformables que delimitan la cavidad, o incluso del receptáculo cuando se trata de una bolsa, que contiene dicho gel.

Las ventajas de esta técnica se caracterizan por una homogeneización que es suave, está optimizada, es rápida y sin el riesgo de contaminación del producto.

20 A este respecto, debe señalarse que el procedimiento de la invención es ventajosamente compatible con la implementación de polímeros que tienen un peso molecular muy alto, por ejemplo mayor que 4 MDa, a diferencia de los métodos convencionales de homogeneización.

25 De hecho, los métodos convencionales muestran una limitación con respecto al peso molecular de los polímeros en la medida en que la alta viscosidad exhibida por los geles obtenidos a partir de dichos polímeros no es adecuada para obtener una homogeneización satisfactoria.

Con respecto a la reacción de reticulación, ésta también se puede llevar a cabo en condiciones óptimas, con respecto, por una parte, a la buena homogeneidad del gel obtenido al final de la etapa b) y, por otra parte, a la naturaleza del receptáculo que contiene dicho gel. Ventajosamente, este receptáculo hermético puede estar directamente expuesto, en su totalidad, a las condiciones utilizadas para la reticulación.

30 Por ejemplo, en el caso de una reticulación por medios térmicos, esto último se puede llevar a cabo ventajosamente sumergiendo directamente el receptáculo, por ejemplo la bolsa, en un baño termostático a una temperatura que conduzca a esta reticulación, que de este modo permita asegurar una excelente conducción de calor y un gradiente de temperatura homogéneo en todo el volumen del gel.

35 El procedimiento de acuerdo con la invención también resulta particularmente ventajoso desde el punto de vista de la inocuidad en la medida en que minimiza eficazmente los contactos del gel no reticulado, luego reticulado, con la atmósfera.

Finalmente, otra ventaja sustancial desde un punto de vista industrial del proceso de acuerdo con la invención radica en su compatibilidad con una implementación de la etapa de reticulación sobre una cantidad de material sustancialmente mayor que la que se puede contemplar con los procedimientos actuales.

#### 40 **I) Receptáculo**

Como se especifica anteriormente, el procedimiento de acuerdo con la invención implementa un receptáculo hermético en el que está hecha una cavidad delimitada, al menos parcialmente, por una pared deformable.

En la Figura 1 que figura más adelante, se representan diversas realizaciones de un receptáculo de este tipo.

45 Por ejemplo, la Figura 1b representa una realización provista de una única pared deformable colocada en la superficie de un marco que forma una cavidad hermética.

Ventajosamente, todas las paredes que delimitan la cavidad son deformables.

Una bolsa, tal como las ilustradas en las Figuras 1a, 1c, 1d y 1e, es especialmente representativa de esta realización.

5 En primer lugar, la pared deformable, o incluso la bolsa, tiene propiedades mecánicas que se ajustan para soportar las tensiones ejercidas, especialmente internamente, durante la homogeneización y durante la manipulación del receptáculo, con el fin de evitar cualquier riesgo de rasgado.

Como se especifica anteriormente, la pared deformable o la bolsa tiene un grado de deformabilidad tal que puede deformarse manualmente, es decir, bajo el efecto de una presión que resulta, por ejemplo, de una simple palpación.

Tal como se especifica más adelante, esta presión también se puede aplicar mecánicamente.

10 El grado de deformabilidad de la pared deformable puede ser tal que, de acuerdo con una realización particular, permita el contacto, especialmente cuando la cavidad está vacía, de la pared deformable con la cara que es opuesta a la misma.

Además, dicha pared, o incluso dicha bolsa, que es capaz de ser sometida a condiciones específicas de temperatura, especialmente con respecto a la etapa de reticulación, exhibe propiedades de resistencia a grandes variaciones de temperatura, por ejemplo de 0 a 140°C.

15 El receptáculo, o incluso la bolsa, de acuerdo con un aspecto práctico, pero también con vistas a limitar lo más posible los contactos con el entorno exterior, tienen una naturaleza hermética.

Sin embargo, el receptáculo de acuerdo con la invención puede estar equipado ventajosamente con un sistema o lumbrera de apertura, preferiblemente resellable, y adecuado para introducir cualquier compuesto utilizado para la fabricación de un gel de acuerdo con la invención.

20 Estos sistemas de apertura se ilustran especialmente en las Figuras 1c y 1d.

Este sistema puede ser adecuado, por ejemplo, para introducir, por ejemplo a través de una aguja, componentes adicionales dentro de dicha cavidad (Figura 1d).

Por lo tanto, la cavidad puede contener inicialmente el polímero y el medio acuoso se introduce posteriormente allí a través de un sistema de apertura de este tipo.

25 Se puede prever especialmente un sistema o lumbrera de apertura similar al descrito en el documento EP 0 812 158.

De acuerdo con otra alternativa, cuando el receptáculo es una bolsa, el sistema de cierre puede tener la forma de al menos una lengüeta colocada en el borde superior de la bolsa y a lo largo de toda la longitud de la parte posterior de la misma, estando los bordes laterales de dicho lengüeta posiblemente doblados en la periferia (Figura 1e).

30 De acuerdo con aún otra alternativa, el sistema de cierre de dicha bolsa tiene forma de una cremallera, similar a las que se pueden encontrar en determinadas bolsas de alimentos (Figura 1c).

Ventajosamente, la o las membranas deformables constituyentes de dicho receptáculo tiene (tienen) un grosor entre 10  $\mu\text{m}$  y 1 mm, preferiblemente entre 40  $\mu\text{m}$  y 0,3 mm.

35 El volumen de dicha cavidad también es adecuado para la cantidad total de compuestos utilizados para la fabricación de un hidrogel de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una realización particular, la cavidad tiene un volumen tal que dicho medio en cuestión en la etapa a) llena al menos 1/10, preferiblemente al menos 1/5 del mismo.

La cavidad en cuestión de acuerdo con la invención tiene preferiblemente un volumen del orden de 50 a 10 000  $\text{cm}^3$ , preferiblemente de 200 a 4000  $\text{cm}^3$ .

40 Dicha cavidad puede tener ventajosamente una forma regular, por ejemplo cuadrada o rectangular, o bien ser de tipo de caja pequeña, tal como las presentadas en la Figura 1.

El receptáculo en cuestión de acuerdo con la invención puede prestarse ventajosamente a un almacenamiento del medio que contiene en una atmósfera inerte, o incluso en vacío.

Ventajosamente, este receptáculo está hecho de un material que es inerte con respecto a los diversos compuestos utilizados para la fabricación de un hidrogel de acuerdo con la invención.

5 La pared deformable o la bolsa está hecha, además, de un material que hace posible dar satisfacción con respecto a las características mecánicas arriba descritas. Este material se puede elegir especialmente entre los polímeros de plástico tales como, en particular, polietileno de calidad farmacéutica para su uso en la industria farmacéutica o biomédica.

Con respecto al destino de los productos que resultan de un procedimiento de acuerdo con la invención, el receptáculo es ventajosamente estéril. Para cumplir este requisito, este último, antes de su uso, también puede envasarse en un envase estéril.

10 Con el fin de facilitar la implementación de un procedimiento de acuerdo con la invención, al menos uno de los componentes del receptáculo es preferiblemente transparente o está en un material que es lo suficientemente claro como para poder observar los cambios llevados a cabo internamente.

Como se especifica arriba, de acuerdo con una variante preferida, el receptáculo es una bolsa.

15 Una realización específica de esta variante preferida puede consistir en una bolsa de dos caras que tiene, preferiblemente a lo largo de uno de sus bordes, un medio de cierre de tipo rosca sobre el que se puede enroscar una tapa (Figura 1d) o también un medio de cierre del tipo cremallera/deslizamiento (Figura 1c).

De acuerdo con otra realización particular, la bolsa es una bolsa de compartimiento único.

Por lo tanto, una variante consiste en tener una bolsa que puede estar vacía o que comprende de antemano:

- al menos un medio acuoso o al menos el polímero o sal de polímero a reticular;

20 - o al menos un medio acuoso que comprende ya dicho polímero o sal de polímero a reticular.

De acuerdo con aún otra realización particular, la bolsa es una bolsa multi-compartimientos, y más particularmente una bolsa de dos compartimientos.

25 Por lo tanto, la bolsa puede tener al menos dos compartimientos separados entre sí por una membrana que es estanca, pero lo suficientemente débil como para romperse bajo la acción de una compresión, estando destinado cada uno de los compartimientos para almacenar al menos un compuesto utilizado para la fabricación de un gel de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una primera alternativa, el primer compartimiento comprende al menos un medio acuoso, y el segundo compartimiento comprende al menos un polímero o sal de polímero.

30 De acuerdo con una segunda alternativa, el primer compartimiento comprende al menos una mezcla de al menos un medio acuoso en combinación con al menos un polímero o sal de polímero, y el segundo compartimiento comprende al menos un agente reticulante.

De acuerdo con una tercera realización particular, la bolsa es una bolsa de tres compartimientos, pudiendo estar dedicado cada uno de los compartimientos, respectivamente, para envasar el polímero a reticular, el medio acuoso y el agente reticulante.

35 Sin embargo, las dos últimas realizaciones no están favorecidas con respecto a la falta de estabilidad de determinados agentes reticulantes.

Las realizaciones arriba descritas hacen posible eliminar cualquier etapa que requiera el contacto del gel con el entorno exterior, reduciendo de esta manera de forma significativa los riesgos de contaminación.

## **II) Procedimiento**

40 Un procedimiento de acuerdo con la invención requiere, en primer lugar, tener una cavidad que comprenda al menos un medio acuoso con al menos un polímero o sales poliméricas.

Esto se refiere más particularmente a la etapa a).

De acuerdo con una alternativa, la cavidad de acuerdo con la invención puede contener sólo uno de los dos compuestos, siendo introducido el segundo posteriormente en el mismo.

- 5 En la realización en la que el receptáculo es una bolsa de dos compartimientos en la que los diversos compuestos pueden separarse ventajosamente entre sí dentro de compartimientos respectivos, la etapa a) implica romper primero la membrana que separa estos dos compartimientos, por ejemplo, mediante simple presión.

#### 1) Homogeneización

De acuerdo con la invención, el receptáculo en cuestión de acuerdo con la invención permite una homogeneización mejorada de los compuestos utilizados para la formación de un hidrogel de acuerdo con la invención.

- 10 El término "mejorado" se entiende, dentro del significado de la invención, en el sentido de una calidad de homogeneización mayor que la observada con los procedimientos convencionales, pero también un tiempo de homogeneización reducido.

El objetivo de la homogeneización es más particularmente disolver completamente el polímero en el medio acuoso y disponer la formación de las cadenas de dicho polímero con el fin de activar el último en preparación para la reticulación.

- 15 La homogeneización se considera satisfactoria cuando la disolución obtenida tiene una coloración homogénea, sin aglomerados, y una viscosidad uniforme.

Como se especificó previamente, la homogeneización debe ser lo suficientemente suave como para limitar la degradación de las cadenas de polímero.

- 20 Esta etapa es incluso más importante cuando el polímero tiene un alto peso molecular. Esto se debe a que la hidratación de un compuesto de este tipo tiene la tendencia a conducir a la formación de una disolución de alta viscosidad dentro de la cual se observa comúnmente la aparición de grumos.

De acuerdo con la invención, la pared deformable, o incluso la bolsa, tiene un grado de deformabilidad tal que la homogeneización, considerada en la etapa b), se lleva a cabo mediante deformaciones mecánicas, opcionalmente sucesivas, de la cara exterior de la pared deformable, o incluso de la bolsa.

- 25 Las deformaciones en cuestión en la presente solicitud se pueden llevar a cabo utilizando cualquier medio conocido por una persona experta en la técnica. La homogeneización puede llevarse a cabo manualmente, en particular mediante simples compresiones manuales sucesivas de las caras exteriores de la pared o de dicha bolsa, por ejemplo mediante palpaciones.

- 30 De acuerdo con otra alternativa, las deformaciones se pueden llevar a cabo mecánicamente, por ejemplo utilizando un dispositivo del tipo "molino de paletas", comúnmente utilizado para la preparación de muestras biológicas.

De acuerdo con una de estas realizaciones, el receptáculo se coloca en el dispositivo, luego se lleva a cabo la homogeneización en virtud de un sistema de dos cuchillas una al lado de la otra que alternativamente presionan la pared deformable o al menos una de las paredes deformables siguiendo un movimiento hacia adelante y hacia atrás.

- 35 De acuerdo con otra realización, el receptáculo puede colocarse sobre una cinta transportadora que ejerce un movimiento hacia adelante y hacia atrás, en la proximidad de la cual está posicionado al menos un rodillo, estando dicho rodillo colocado a una distancia tal que ejerce una compresión sobre la pared deformable o al menos una de las paredes deformables durante el paso de la misma y así genera una deformación de este último que conduce a la homogeneización.

- 40 De acuerdo con aún otra realización, una bolsa de acuerdo con la invención puede exponerse a un movimiento hacia adelante y hacia atrás entre dos rodillos diametralmente opuestos, ejerciendo cada uno de ellos, durante el paso de dicha bolsa, una compresión sobre cada una de las caras externas de la bolsa.

Un tiempo de homogeneización satisfactorio depende de la naturaleza del polímero, y más particularmente de su peso molecular, de su concentración, de las condiciones de funcionamiento dentro del medio acuoso y también del dispositivo de homogeneización utilizado.

- 45 Los tiempos de homogeneización hacen posible obtener un hidrogel suficientemente homogéneo que cae dentro del conocimiento general de una persona experta en la técnica.

Preferiblemente, el procedimiento de acuerdo con la invención permite un tiempo de homogeneización de menos de 400 minutos, en particular de menos de 150 minutos, incluso comprendido entre 30 y 100 minutos.

Cuando la disolución del polímero o mezcla de polímeros en el disolvente acuoso no es completamente satisfactoria, se aplican tantos ciclos de agitación como sea necesario.

- 5 Por ejemplo, el tiempo de homogeneización necesario para obtener un gel satisfactorio, partiendo de hialuronato sódico de peso molecular superior a 0,5 MDa y un molino de paletas, es de alrededor de 40 a 120 minutos.

De acuerdo con una realización particular, la homogeneización se puede llevar a cabo en primer lugar mediante palpación, utilizando luego un dispositivo mecánico.

De acuerdo con aún otra realización, estos diversos medios de homogeneización pueden utilizarse alternativamente.

## 10 2) Reticulación

Tal como se mencionó previamente, una etapa de este tipo requiere condiciones particulares que dependen simultáneamente de la naturaleza del polímero, de su peso molecular, del medio acuoso y de la naturaleza del agente reticulante.

- 15 El término "condiciones" también se entiende que designa el elemento que inicia la reticulación tal como, por ejemplo, calentamiento o exposición a UV.

La elección de los medios de iniciación adecuados para obtener un gel reticulado cae dentro del conocimiento general de una persona experta en la técnica.

Ventajosamente, la etapa de reticulación se lleva a cabo por medios térmicos.

- 20 A este respecto, un elemento de iniciación de tipo "calentamiento" puede lograrse mediante:  
- inmersión del receptáculo, o incluso de la bolsa, en un baño que contiene un fluido caliente;  
- exposición de este último a radiación de determinadas longitudes de onda de tipo UV, por ejemplo, a radiación de microondas o también a radiación infrarroja.

- 25 En el caso de reticulación por medios térmicos, el receptáculo en cuestión de acuerdo con la invención, y más particularmente la bolsa, hace posible mantener una misma temperatura en cualquier punto del gel que contiene. A partir de allí se produce una reticulación optimizada en términos de homogeneidad.

Los medios de calentamiento y su intensidad están, por supuesto, ajustados con respecto al método de reticulación, el grado de reticulación y la viscosidad del gel que se desean.

Una temperatura particularmente adecuada para la etapa de reticulación de ácido hialurónico en presencia de un agente de reticulación tal como BDDE está entre 40 y 65°C.

- 30 Sin embargo, otros métodos también son ventajosamente compatibles con el receptáculo en cuestión de acuerdo con la invención, tales como:  
- irradiación utilizando radiación ionizante, tal como el procedimiento descrito en el documento US 2008/0139796;  
- reticulación enzimática.

- 35 El grado de reticulación también depende del tiempo de reticulación impuesto a los geles. Cuanto más largo sea el tiempo, mayor será, sin embargo con un óptimo que no debe excederse, el riesgo de degradar el agente reticulante y/o el polímero.

Por lo tanto, la etapa de reticulación puede llevarse a cabo durante un tiempo que oscila entre 30 y 300 minutos, preferiblemente entre 100 y 200 minutos.

- 40 Ventajosamente, las condiciones de reticulación se ajustan para obtener un grado de reticulación tal que el gel formado sea un gel viscoso, viscoelástico o incluso sólido.

De acuerdo con una realización particularmente preferida, la etapa de reticulación de hialuronato de sodio se lleva a cabo en un medio básico, disponiendo la bolsa que contiene el gel correspondiente en un baño termostático llevado a una temperatura de alrededor de 50 a 55°C, durante un período de 2 a 4 horas.

Con el fin de distribuir homogéneamente el agente reticulante dentro de la disolución viscosa de ácido hialurónico, se puede prever una etapa de homogeneización posterior a la adición de dicho agente en la bolsa. Dicha operación puede tener lugar mediante palpaciones y/o agitación mecánica en el caso de una bolsa, o mediante cualquier otro medio adecuado, a lo largo de un período que oscila entre 15 y 20 minutos.

5 3) Detener la reticulación

Tal como se sabe previamente, la detención de la reticulación (etapa f)) puede tener lugar antes, junto con o después de la etapa e) de recuperación del gel.

10 Dicha etapa, de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la invención, requiere exponer el gel reticulado o gel en el proceso de ser reticulado, o incluso el receptáculo que lo contiene, a condiciones que conducen a la detención de la reticulación, o bien a condiciones capaces de detener la formación de enlaces entre las diversas cadenas poliméricas.

15 De acuerdo con una variante de realización preferida, la etapa f) se lleva a cabo antes de la etapa e). De acuerdo con esta realización ventajosa, todas las etapas a) a f) se llevan a cabo dentro de dicha cavidad, y la detención de la reticulación consiste entonces en exponer el gel todavía presente en la cavidad hermética a condiciones que conducen a esta detención de la reticulación.

Por ejemplo, con respecto a las condiciones térmicas que se habrán aplicado con el fin de iniciar el proceso de reticulación, la reticulación puede detenerse:

- 20 - por simple retirada del receptáculo del baño termostatzado, luego por enfriamiento hasta que regrese a la temperatura ambiente;
- colocando el receptáculo en un baño de agua fría, preferiblemente a una temperatura por debajo de la temperatura ambiente, hasta que la temperatura dentro de dicho receptáculo esté próxima a la temperatura ambiente; o
- extrayendo el gel de dicho receptáculo.

En el caso de reticulación por radiación, esto se detiene al detener la exposición de dicho gel a la radiación.

25 El gel reticulado, así obtenido, puede, por ejemplo, desmoldearse de dicho receptáculo, por ejemplo, mediante una simple apertura del receptáculo o también mediante laceración de la pared deformable o una de sus paredes deformables.

El receptáculo también puede estar provisto de un sistema de apertura que hace posible extraer, o incluso desmoldear, el gel reticulado en su totalidad sin dañar su estructura.

30 El gel reticulado obtenido al final del procedimiento tal como se describió previamente no es generalmente inyectable directamente, debido, en particular, a su concentración de polímero excesivamente alta y la posible presencia de residuos de agentes de reticulación, o bien a sus condiciones fisiológicas o de pH.

35 Sin embargo, después de una simple expansión en un medio acuoso, este gel obtenido ya tiene un perfil de inyectabilidad que se mejora con respecto a lo que tienen los geles convencionales, tal como se ilustra en las Figuras 5, 6 y 7.

El gel obtenido al final de la implementación del procedimiento tal como se describió previamente puede tener especialmente una rigidez demasiado alta como para ser inyectado en un paciente tal como está.

Por consiguiente, se pueden llevar a cabo varias etapas adicionales, conocidas por una persona experta en la técnica.

40 Más particularmente, se requiere un paso de neutralizar y expandir este gel con el fin de darle sus cualidades de implante. Las cadenas de la red de polímero se estiran e hidratan entonces, mientras que el pH se lleva al de la dermis.

45 También se puede llevar a cabo una etapa de protección y de redensificación del gel con el fin de mejorar adicionalmente las cualidades del implante, de acuerdo con el conocimiento de una persona experta en la técnica. El gel debe formularse fisiológicamente en virtud de la presencia de sales en cantidades equivalentes a las del medio inyectado.

Para una pureza mejorada adicionalmente, se puede llevar a cabo, además, una etapa de purificación adicional.

La última etapa consiste en llenar una jeringa con el gel, la cual se lleva a cabo bajo condiciones atmosféricas controladas, seguido de una esterilización térmica final que tiene lugar inmediatamente después del llenado de la jeringa.

### **III) Polímero**

- 5 El término "polímero" de acuerdo con la invención se entiende que significa cualquier macromolécula constituida por el enlace repetido de una y la misma unidad o de unidades diferentes, conectadas entre sí mediante enlaces covalentes.

10 Un polímero se selecciona más particularmente con respecto a las propiedades en las que se desea ver el gel reticulado obtenido de acuerdo con la visualización de la invención. Más particularmente, dicho polímero debe tener una buena biocompatibilidad.

Por lo tanto, un polímero o sal de polímero fisiológicamente aceptable puede ser de origen natural o sintético.

15 Los polímeros adecuados para la invención se pueden seleccionar especialmente de glicosaminoglicanos tales como sulfato de condroitina, queratán, sulfato de queratán, heparina, sulfato de heparina, xantano, carragenano, polisacáridos tales como ácido hialurónico, quitosano, celulosa y sus derivados, alginato, almidón, dextrano, pululano, galactomanano y sales biológicamente aceptables de los mismos, una proteína o un polímero sintético tal como ácido poliacrílico o poli(alcohol vinílico), y preferiblemente entre polisacáridos.

Las sales de polisacáridos de acuerdo con la invención se eligen más particularmente entre las sales fisiológicamente aceptables, tales como la sal de sodio, la sal de potasio y la mezcla de las mismas, preferiblemente la sal de sodio.

- 20 Un polisacárido particularmente preferido es ácido hialurónico o una de sus sales, preferiblemente hialuronato de sodio (NaHA).

Como se citó previamente, el procedimiento de la invención permite ventajosamente la implementación de polímeros que tienen un peso molecular muy alto, y especialmente polímeros que tienen un peso molecular mayor que 4 MDa, a diferencia de los métodos convencionales de homogeneización.

- 25 Preferiblemente, un polímero o sal de polímero de acuerdo con la invención tiene un alto peso molecular, preferiblemente un peso molecular mayor que o igual a 100 000 Da, o incluso mayor que 3 MDa dependiendo de la aplicación en cuestión.

Este polímero se formula en la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención en un medio acuoso.

- 30 La expresión "medio acuoso" de acuerdo con la invención se entiende que significa cualquier medio líquido que tiene la propiedad de disolver un polímero, y más específicamente, un polisacárido o una de sus sales.

La naturaleza del medio acuoso está más particularmente condicionada con respecto al tipo de reticulación previsto, pero también con respecto al tipo de polímero utilizado.

A este respecto, un medio acuoso capaz de ser adecuado puede ser ácido o básico.

- 35 Un medio acuoso particularmente preferido es un medio alcalino, preferiblemente hidróxido sódico (NaOH), más particularmente una disolución de hidróxido sódico que tiene un pH mayor que 12.

### **IV) Agente reticulante**

La expresión "agente reticulante" de acuerdo con la invención se entiende que significa cualquier compuesto capaz de inducir una reticulación entre las diversas cadenas poliméricas.

- 40 La elección de este agente reticulante con respecto al polímero a reticular cae claramente dentro de la competencia de una persona experta en la técnica.

Un agente reticulante de acuerdo con la invención se elige entre epóxidos, aldehídos, compuestos de poliaziridilo, divinil-sulfona (DVS) o butanodiol-diglicidil-éter (BDDE), preferiblemente butanodiol-diglicidil-éter, teniendo este último la toxicidad más baja entre los agentes reticulantes estándares.

El agente reticulante, de naturaleza variable y muy a menudo inestable, está almacenado, dentro de un receptáculo de acuerdo con la invención, en un entorno de protección, garantizando así que la etapa subsiguiente de reticulación tenga lugar con éxito.

5 El procedimiento de acuerdo con la invención también garantiza una difusión rápida, completa y uniforme del agente de reticulación a través de la red de cadenas poliméricas.

A partir de ello se produce una mejora sustancial en la calidad y en el rendimiento de la reticulación, y también una reducción considerable en la cantidad de agente reticulante requerida en comparación con los procedimientos convencionales.

10 El ajuste de la cantidad de agente reticulante para llevar a cabo la reacción de reticulación también cae claramente dentro de la competencia de una persona experta en la técnica.

De acuerdo con una realización particularmente preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención implementa hialuronato de sodio en un medio alcalino con butanodiol-diglicidil-éter (BDDE), como agente reticulante.

Los siguientes ejemplos y figuras se presentan a modo de ilustración de la invención de una manera no limitativa.

Figuras:

15 - Figura 1: ilustra representaciones esquemáticas de receptáculos de acuerdo con la invención.

- Las Figuras 2, 3 y 4: respectivamente, ilustran el cambio en la temperatura durante la reacción de reticulación de las muestras 1, 2 y 3.

- Las Figuras 5 a 7: ilustran el perfil de inyectabilidad de las muestras 1, 2 y 3.

20 Los estudios comparativos siguientes se llevan a cabo en tres muestras de geles de ácido hialurónico reticulados que ilustran un procedimiento de acuerdo con la invención (muestra 1) o un procedimiento convencional (muestras 2 y 3).

- Muestra 1: procedimiento llevado a cabo en una bolsa estéril de 400 ml, agitación con un molino de paletas, reticulación durante 3 horas a 52°C,

25 - Muestra 2: procedimiento llevado a cabo en un recipiente de plástico estéril de 400 ml, agitación con una espátula; reticulación durante 3 horas a 52°C,

- Muestra 3: procedimiento llevado a cabo en un recipiente de plástico estéril de 400 ml, agitación con una espátula; reticulación durante 3 horas a 55,5°C.

Ejemplo 1: Preparación del gel de ácido hialurónico homogéneo

30 Para cada una de las muestras, se disuelven 10 g de NaHA en una disolución de hidróxido de sodio al 1% con el fin de obtener una disolución que contiene 12% de NaHA.

La bolsa (volumen de trabajo: 400 ml, longitud: 310 mm, anchura: 180 mm, PE de calidad alimentaria) en la que se disuelve la muestra 1 se expone a una homogeneización mecánica. Para hacer esto, la bolsa se expone a ciclos de agitación sucesivos durante una duración total de 1 hora a 210 rpm ( $22 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) utilizando un molino de paletas.

35 Para las muestras 2 y 3, la agitación es manual mediante una espátula de acero inoxidable estéril durante 5 a 10 minutos, seguido de un nuevo ciclo de agitación manual cada 30 minutos hasta completar la hidratación.

La disolución del NaHA se considera completa una vez que todo el NaHA se hidrata y la solución es perfectamente homogénea (ausencia de aglomerados y color uniforme). En el caso en que la disolución no parezca ser completa, se puede llevar a cabo un ciclo de agitación suplementario.

40 Los tiempos de disolución total del NaHA en la disolución de hidróxido sódico al 1% para las tres muestras se indican en la Tabla 1 que figura a continuación.

Tabla 1: tiempo total de disolución

## ES 2 647 547 T3

	Muestra 1 (bolsa)	Muestra 2 (recipiente)	Muestra 3 (recipiente)
Tiempo total de disolución (minutos)	60	114	106

5 La homogeneización del ácido hialurónico en la bolsa es más rápida que la homogeneización en un recipiente con una espátula sin requerir un aumento en la temperatura, como con la muestra 3. Esta alternativa también es más limpia, ya que el gel no está en contacto con el exterior y no existe fricción directa sobre el medio de reacción que podría generar partículas.

### Ejemplo 2: Reticulación

Se añade una disolución de BDDE diluido a 1/5 en una disolución de hidróxido sódico al 1%, para cada una de las muestras obtenidas en el Ejemplo 1, a la disolución de NaHA homogénea obtenida al final de la etapa precedente.

10 La homogeneización del medio de reacción de la muestra 1 se lleva a cabo luego en virtud de sucesivos ciclos de agitación que comprenden cada uno de ellos:  
 - 5 a 10 minutos de agitación manual mediante el amasado de la bolsa; y  
 - 5 de agitación utilizando un molino de paletas a 210 rpm ( $22 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

La homogeneización de los medios de reacción de las muestras 2 y 3 se lleva a cabo mediante agitación con una espátula de acero inoxidable estéril durante 15 minutos.

15 Luego se colocan tres sondas de temperatura en cada uno de los productos a reticular (dos en la periferia y diametralmente opuestos, y uno en el medio) con el fin de poder registrar las temperaturas dentro del medio de reacción durante la reacción de reticulación.

Para la muestra 1, la bolsa sellada se coloca en un baño de agua a  $52^\circ\text{C}$  durante 3 horas, asegurándose de que la abertura de la bolsa permanezca fuera del baño.

20 Para las muestras 2 y 3, los recipientes se colocan en el baño de agua durante 3 horas, respectivamente a  $52^\circ\text{C}$  y a  $55,5^\circ\text{C}$ .

La temperatura dentro del medio de reacción se controló durante toda la reacción de reticulación en virtud de tres sondas de temperatura.

25 Las Figuras 1 a 3 representan los perfiles de temperatura observados durante las reacciones de reticulación de las tres muestras.

Los números 1 a 3 en cada uno de los perfiles corresponden a las tres sondas de temperatura que se colocaron en la bolsa o en los recipientes con el fin de controlar el cambio de temperatura dentro del medio de reacción.

30 Para la muestra 1, se observa un aumento casi inmediato de la temperatura dentro de la bolsa, luego se observa una retención uniforme de la temperatura del medio de reacción a alrededor de  $52^\circ\text{C}$ , independientemente de la sonda de temperatura. La temperatura es por lo tanto uniforme en todo el medio de reacción.

Para las muestras 2 y 3 se observa un aumento de la temperatura más lento que para el procedimiento de la bolsa, por lo que se observan entonces diferencias marcadas entre las temperaturas medidas por las tres sondas diferentes alrededor de  $52^\circ\text{C}$  (muestra 2) o  $55,5^\circ\text{C}$  (muestra 3). Por lo tanto, la temperatura no es uniforme en todo el medio de reacción.

35 Una vez que finaliza la reacción de reticulación, la bolsa y los recipientes se retiran del baño termostático y se disponen en un recipiente que contiene agua estéril refrigerada hasta que la temperatura se haya enfriado a  $25^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente).

El rendimiento se define relacionando el peso del producto obtenido con el peso de los reactivos de partida.

### Tabla 2: Rendimientos en peso de las reacciones de reticulación

40

	Muestra 1 (bolsa)	Muestra 2 (recipiente)	Muestra 3 (recipiente)
Rendimiento (%)	99,6	94,5	94,6

Se observa que el rendimiento de la reacción de reticulación llevada a cabo en una bolsa es mejor que la de la reacción llevada a cabo en un recipiente, incluso en presencia de un aumento de temperatura.

5 Ejemplo 3: Caracterización de los geles obtenidos en el Ejemplo 2

1) Protocolo

Las tres muestras de geles reticulados obtenidas en el Ejemplo 2 se dividen en pequeños cubos de alrededor de 1 cm<sup>3</sup>.

10 Para cada uno de los geles obtenidos, las piezas se introducen en un recipiente de plástico rígido de 1 L estéril que contiene la cantidad apropiada de tampón fosfato estéril apirógeno (PB) para llevar el gel a una concentración de 20 mg/g. La cantidad de disolución de PB se ajusta para obtener un gel que contiene 20 mg/m de HA. La cantidad de ácido clorhídrico se ajusta para neutralizar el pH. El contenido del recipiente se agita durante 5 minutos utilizando una espátula de acero inoxidable estéril. A continuación, el recipiente se coloca en un agitador tridimensional durante 20 horas a temperatura ambiente.

15 Los geles reticulados, así obtenidos, tienen un pH cercano a la neutralidad y una concentración fisiológica de NaCl.

Para cada una de las muestras obtenidas de acuerdo con esta etapa, se retira una cantidad dada de producto utilizando cinco jeringas de vidrio de 1 ml BD Hypack<sup>®</sup> con el fin de llevar a cabo mediciones de las fuerzas de inyectabilidad (aguja hipodérmica 27G1/2) y del pH.

20 Las mediciones del pH y de las fuerzas de inyectabilidad se presentan en la tabla que figura a continuación (Tabla 3). Las jeringas llenas con gel reticulado se sometieron a una compresión de 12,5 Nmm<sup>-1</sup> y los valores de la medición de las fuerzas de inyectabilidad obtenidas representan un promedio de las mediciones realizadas en tres jeringas para cada uno de los geles reticulados.

Tabla 3: Mediciones del pH y de las fuerzas de inyectabilidad

	Muestra 1 (bolsa)	Muestra 2 (recipiente)	Muestra 3 (recipiente)
pH	7,3	7,2	6,9
Fuerza de inyectabilidad (N)	45,6	34,7	43
Desviación estándar (%)	5,6	5,2	16,7

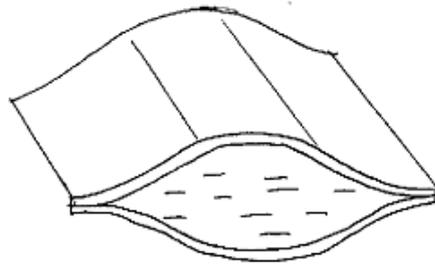
25 Los autores de la invención también observaron que los geles resultantes del procedimiento en bolsa tienen una mayor tolerancia a la esterilización, en términos de propiedades reológicas, que los geles obtenidos por el procedimiento en recipiente.

30 Además, se observa que el procedimiento utilizado para la implementación de la muestra 1 hace posible obtener un gel reticulado para el cual el contenido residual de BDDE antes de la reticulación es sustancialmente menor que el registrado para las muestras 2 y 3, en torno a un factor de 2.

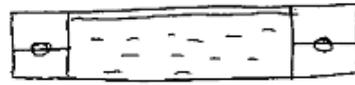
**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para preparar un gel reticulado de al menos un polisacárido o una de sus sales, que comprende al menos las etapas que consisten en:
- a) proporcionar un medio acuoso que contiene dicho polisacárido,
  - b) formar un gel homogéneo a partir del medio de la etapa a),
  - c) poner en contacto el gel obtenido en la etapa b) con una cantidad eficaz de al menos un agente reticulante;
  - d) reticular dicha mezcla formada en la etapa c); y
  - e) recuperar dicho hidrogel reticulado,
- en el que
- al menos dichas etapas a) a d) se llevan a cabo dentro de una cavidad hermética delimitada, al menos parcialmente, por una pared deformable, haciéndose dicha cavidad dentro de una bolsa deformable, siendo expuesta la mezcla presente en la cavidad, en la etapa d), a condiciones propicias para la reticulación,
  - la homogeneización, considerada en la etapa b), se lleva a cabo opcionalmente mediante deformaciones mecánicas sucesivas de la cara externa de la pared deformable o de la bolsa.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, una etapa f) de detener la reticulación, llevándose a cabo esta etapa antes, junto con o después de la etapa de recuperación e).
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la etapa f) se lleva a cabo antes de la etapa de recuperación e).
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que todas las etapas a) a d) y f) se llevan a cabo dentro de dicha cavidad.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bolsa está equipada con un sistema de apertura.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bolsa está hecha de plástico, preferiblemente de polietileno de calidad farmacéutica.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la homogeneización tiene lugar a lo largo de una duración de menos de 400 minutos, preferiblemente de menos de 150 minutos, incluso comprendido entre 30 y 100 minutos.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de reticulación se lleva a cabo por medios térmicos.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la reticulación tiene lugar a lo largo de una duración que oscila entre 30 y 300 minutos, preferiblemente entre 100 y 200 minutos.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polisacárido es ácido hialurónico o una de sus sales.
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que implementa hialuronato sódico en un medio alcalino con butanodiol-diglicidil-éter (BDDE) como agente reticulante.
12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el gel reticulado es un gel sólido.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha homogeneización de la etapa b) se lleva a cabo manualmente, en particular mediante simples compresiones manuales sucesivas de las caras exteriores de la pared o de dicha bolsa.
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha homogeneización de la etapa b) se lleva a cabo en virtud de un sistema de dos cuchillas una al lado de la otra que alternativamente presionan la pared deformable o al menos una de las paredes deformables siguiendo un movimiento hacia adelante y hacia atrás.
15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha homogeneización de la etapa b) se lleva a cabo primeramente mediante palpación, después utilizando un dispositivo mecánico, o utilizando estos medios de homogeneización de forma alternativa.

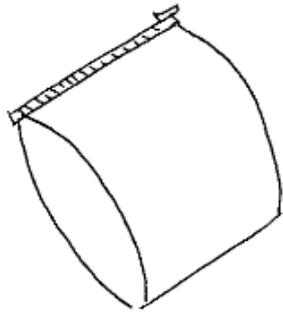
Figura 1



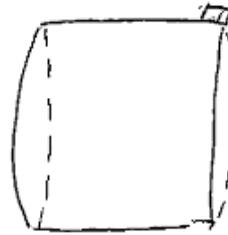
1a



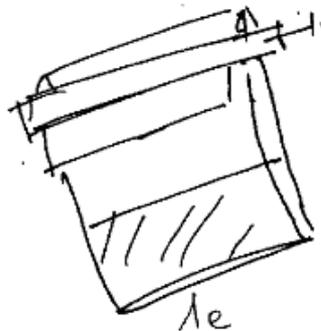
1b



1c



1d



1e

Figura 2

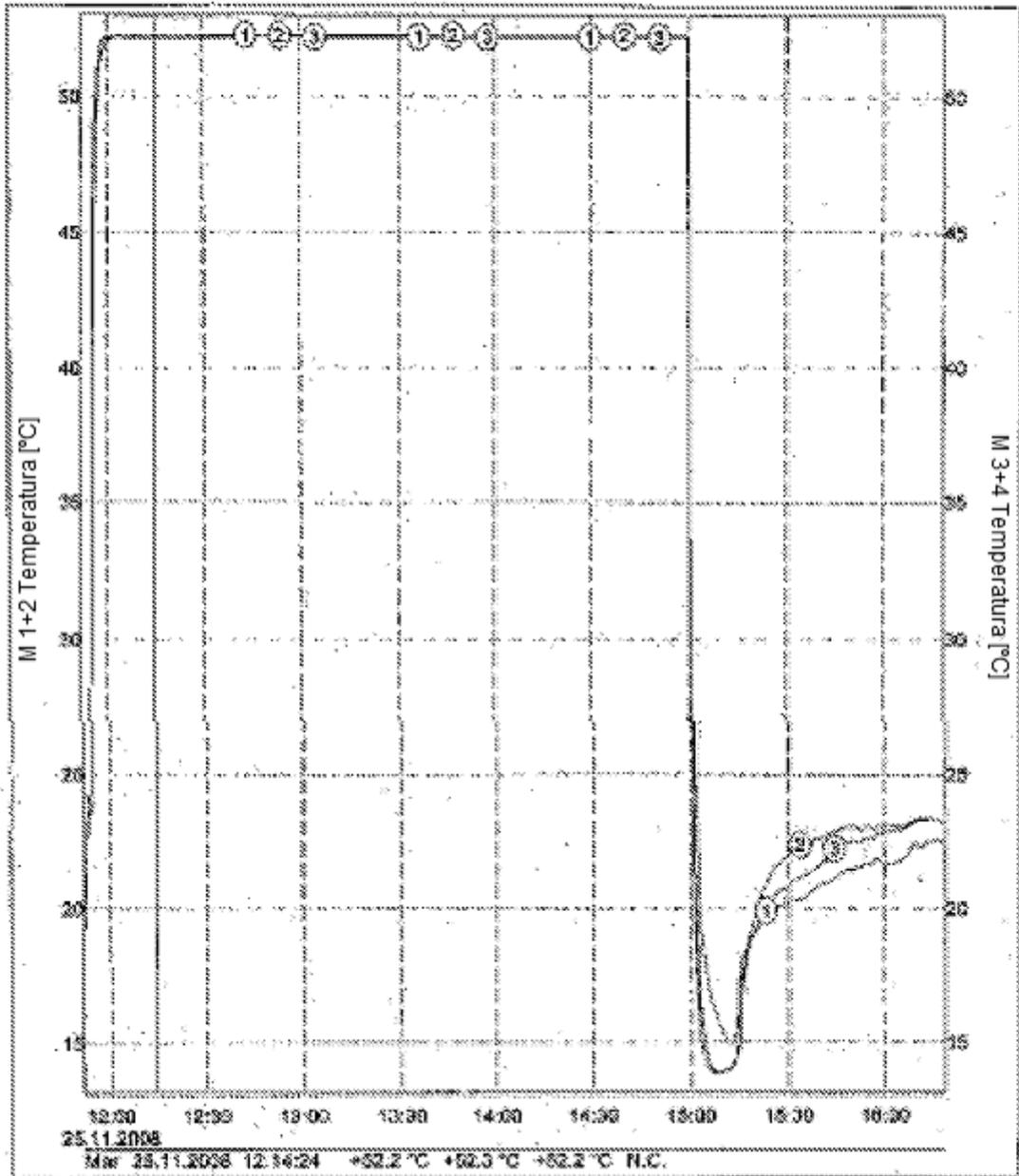


Figura 3

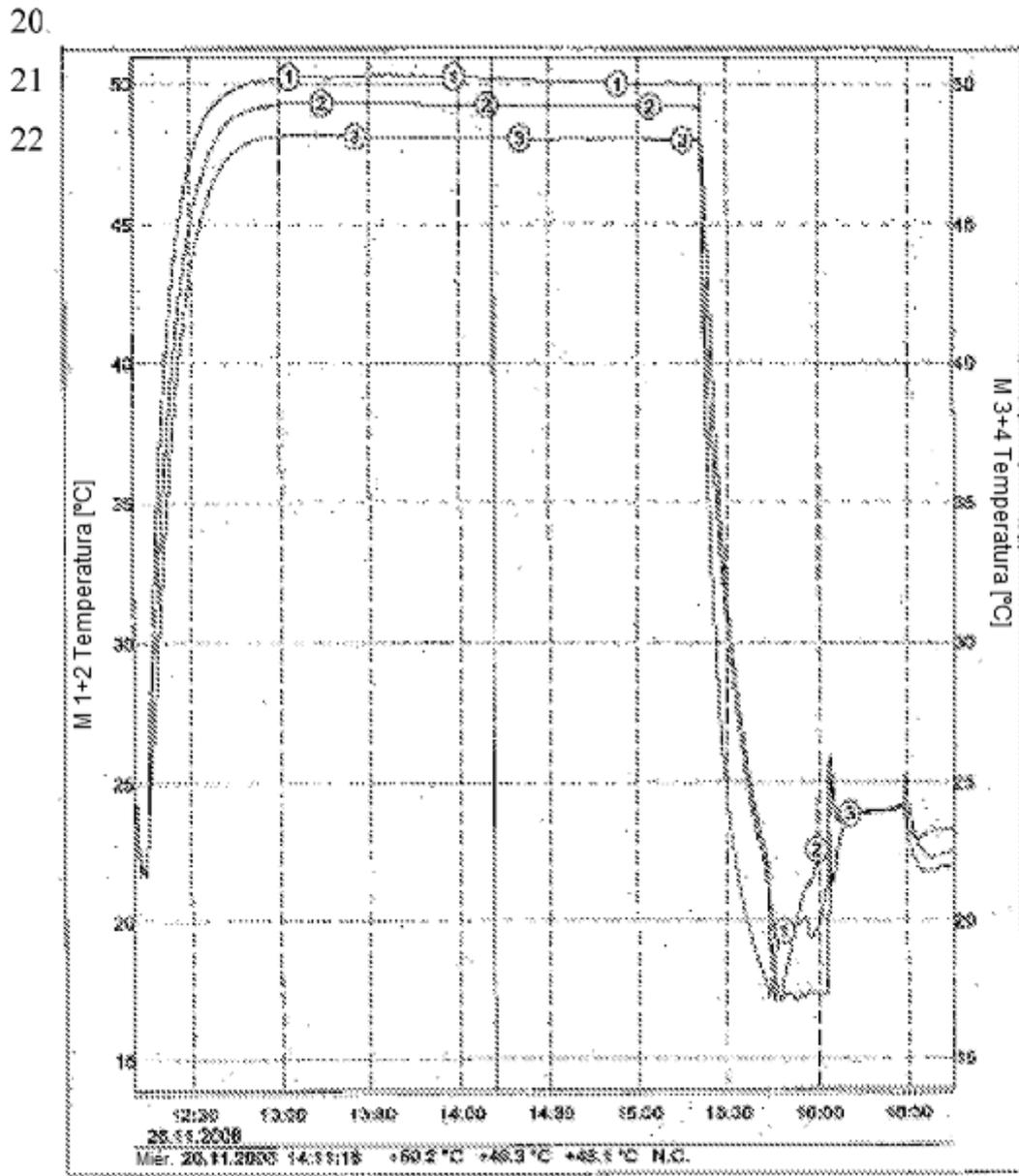


Figura 4

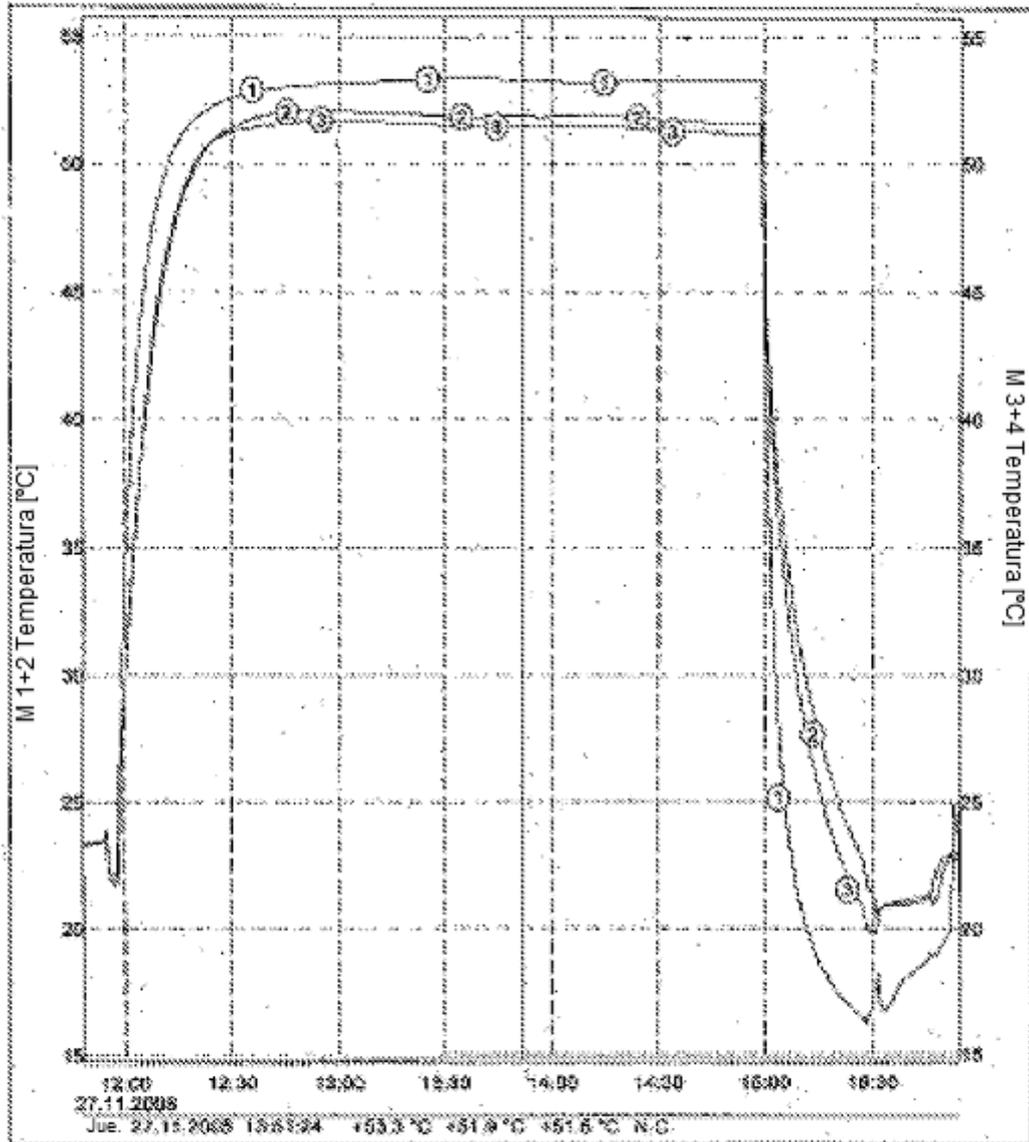


Figura 5

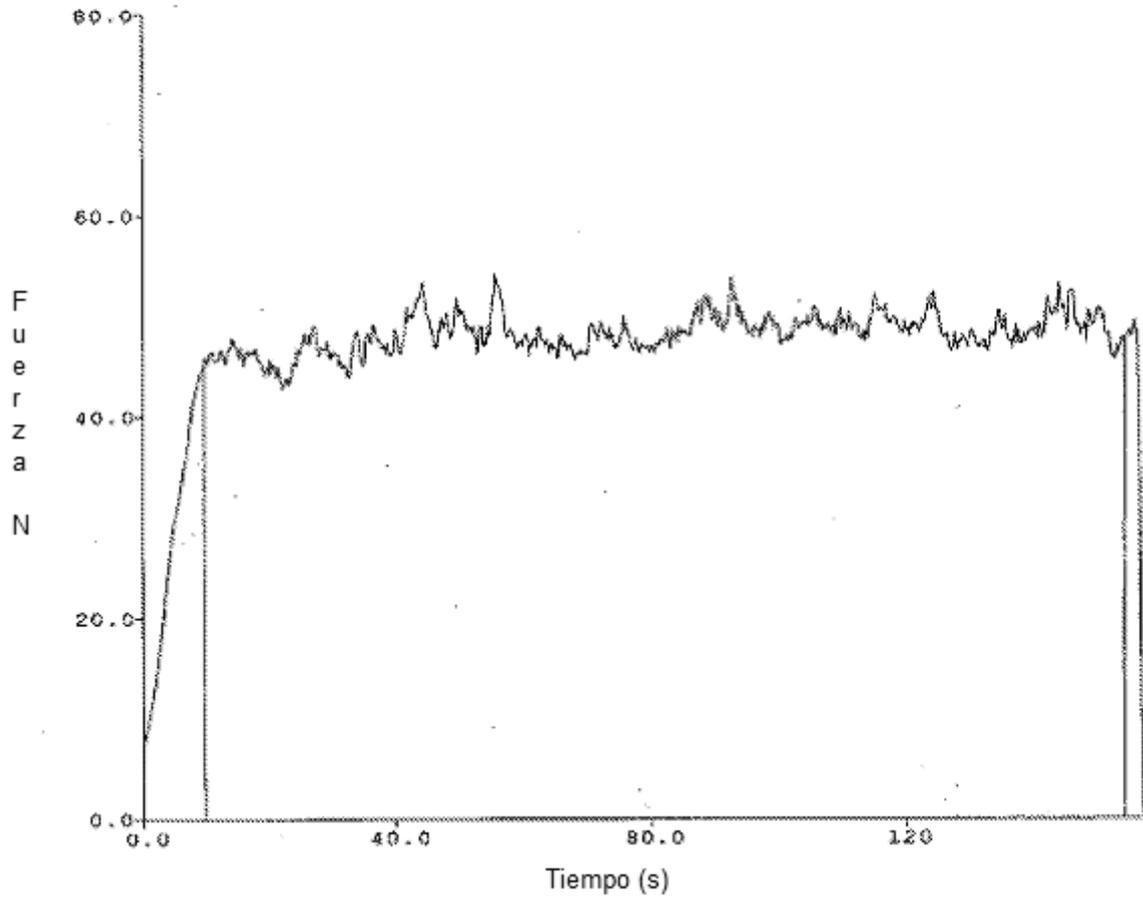


Figura 6

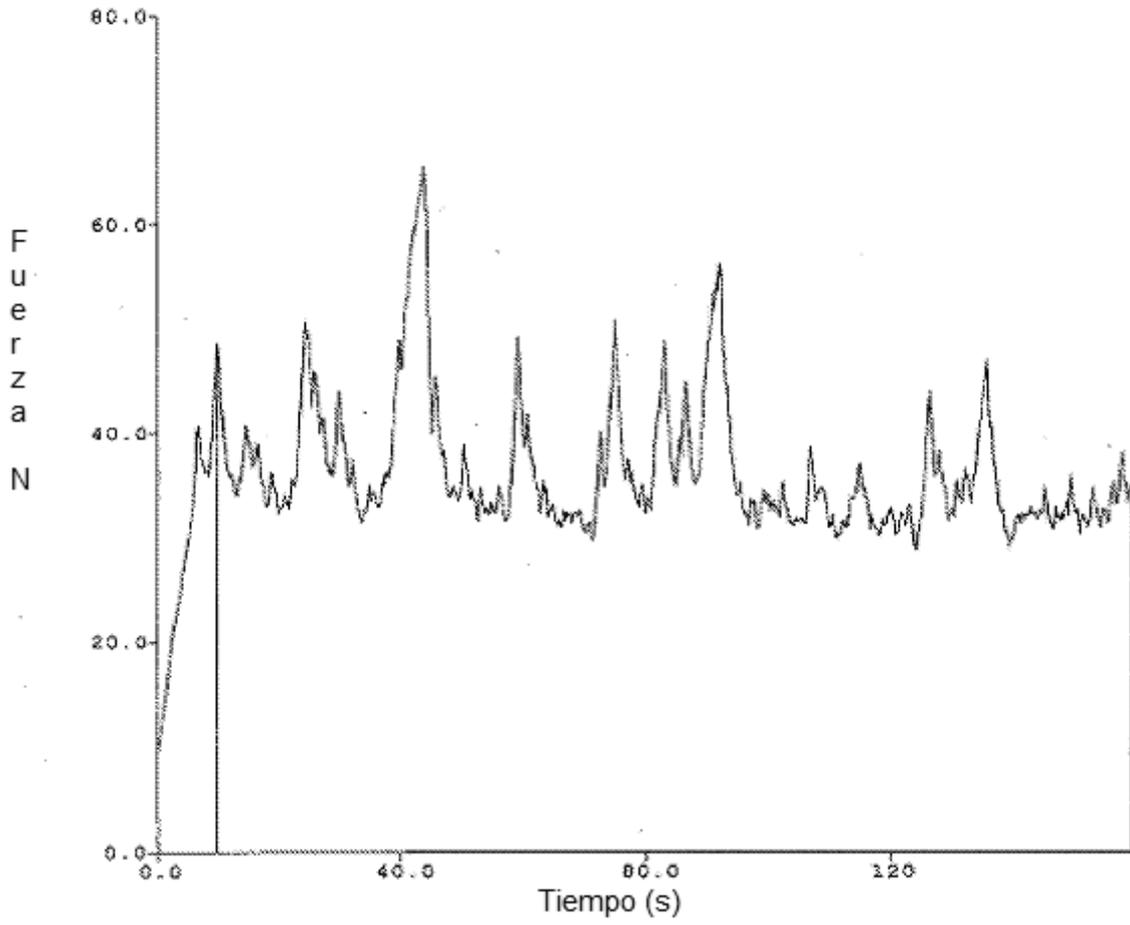


Figura 7

