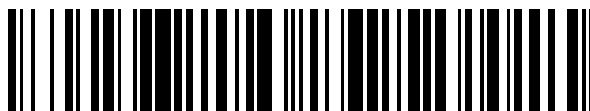


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 064**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2009 E 09004561 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2236523**

54 Título: **Método para producir ácido hialurónico reticulado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2018

73 Titular/es:
**SCIVISION BIOTECH INC. (100.0%)
No. 9, S. 6th Road Kaohsiung Export Processing
Zone
Qianzhen D Kaohsiung, TW**

72 Inventor/es:
**CHEN, TOR-CHERN y
CHEN, LI-SU**

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 662 064 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).

Método para producir ácido hialurónico reticulado**Descripción****5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a un método para producir ácido hialurónico reticulado, especialmente la producción de reticulación de ácido hialurónico con disminución del contenido de agente reticulante.

10 [0002] El ácido hialurónico es un tipo de polisacáridos, se compone de disacáridos y 400 D de peso molecular. El disacárido está compuesto de ácido β -1,4-glucurónico y β -1,3-N-acetilglucosamina unidos por enlace glicosídico β -1,4. Además, el disacárido enlaza otros disacáridos por enlaces glicosídicos β -1,3 para formar polisacárido lineal. En la actualidad, el ácido hialurónico se sintetiza por bacterias como el *streptococo* y se obtiene por extracción de tejido animal como la cresta de gallo.

15 [0003] Dado que el ácido hialurónico, hialuronato y derivados del mismo tienen buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y viscoelasticidad, por lo que se pueden utilizar en cosméticos, la biomedicina, productos médicos y la industria farmacéutica.

20 [0004] Dado que el ácido hialurónico lineal en los organismos es fácilmente degradado por enzimas, tales como la hialuronidasa y radicales libres, se acorta el tiempo de residencia de ácidos hialurónicos lineales en los organismos. Además, el ácido hialurónico lineal tiene baja resistencia mecánica, por lo que el ácido hialurónico lineal tiene aplicaciones limitadas. Por lo tanto, el ácido hialurónico reticulado se usa más preferiblemente.

25 [0005] En el método de funcionamiento práctico, el ácido hialurónico reticulado tiene un diferente tipo al objetivo diferente, como un tipo de solución, un tipo de hidrogel, una sustancia entre un tipo de solución y el tipo de hidrogel o una mezcla que consiste en un tipo de solución y un tipo de hidrogel. Un método de fabricación para producir ácido hialurónico reticulado comprende los pasos de: mezclar un agente de reticulación y ácido hialurónico para proceder a una reacción de reticulación y obtener ácido hialurónico reticulado; y purificar el ácido hialurónico reticulado para eliminar el exceso de agente de reticulación. El paso de purificar el ácido hialurónico reticulado puede ser por diálisis o lavado con agua o una solución de tampón. Sin embargo, la diálisis o el lavado mencionados anteriormente no pueden eliminar todo el agente de reticulación residual, que tiene un extremo de estado de unión y un extremo de estado libre especialmente. Además, el extremo de estado libre del agente de reticulación todavía tiene actividad y efectos secundarios indeseados cuando se aplica en animales, como se muestra en el documento US 5.808.050.

35 [0006] Además, el método de fabricación para la purificación de ácido hialurónico reticulado por diálisis o lavado también sufre de las siguientes dificultades:

1. La refinación no se escala fácilmente en la industria.
- 40 2. El ácido hialurónico reticulado requiere condiciones estériles, de lo contrario los contaminantes se integran fácilmente en un producto final. Sin embargo, el método de fabricación para purificar ácido hialurónico reticulado mediante diálisis o lavado está bajo condiciones neutras o casi neutras, por lo que las condiciones estériles son difíciles de controlar.
- 45 3. Cuando el ácido hialurónico reticulado es hidrogel, el ácido hialurónico reticulado con bajo grado de reticulación se hincha de manera significativa, por lo que el ácido hialurónico reticulado es difícil de lavar y el ácido hialurónico reticulado se puede perder fácilmente durante el lavado. De forma similar, cuando el ácido hialurónico reticulado, el ácido hialurónico reticulado con alto grado de reticulación se hincha de manera insignificante, el agente de reticulación es difícil de eliminar.
- 50 4. Además, el ácido hialurónico reticulado con bajo grado de reticulación se elimina fácilmente al lavar el ácido hialurónico reticulado, por lo que el ácido hialurónico reticulado residual tiene una lubricación reducida. Por lo tanto, cuando el ácido hialurónico reticulado se usa para inyección, se debe agregar una solución de ácido hialurónico de cadena recta o reticulada en el ácido hialurónico reticulado residual para aumentar la lubricación.

55 [0007] Ejemplos de métodos convencionales para producir ácido hialurónico reticulado se describen en los siguientes documentos:

1. Jinghua et al. ("Characteristics of hyaluronic acid derivative films cross-linked by polyethylene-glycol of low water content" Journal of Medical Colleges of PLA, Shanghai, CN, Vol. 23, No. 1, 1 Febrero 2008, p. 15-19).
- 60 2. Tomihata K et al. ("Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content" Biomaterials, Elsevier Science Publishers BV., Barking, GB, Vol. 18, No. 3, 1 de febrero de 1997, páginas 189-195).
3. US 2002/049281 A1.

65 [0008] US 4.716.154 da a conocer un método de fabricación para un gel de ácido hialurónico reticulado para su uso como un sustituto de humor vítreo. Comprende los pasos de: tinción cruzada de un hialuronato y reticulante multifuncional a 50°C durante dos horas en condiciones alcalinas y colocación durante la noche a temperatura ambiente para obtener un gel; para eliminar el agente de reticulación no reaccionado, cortar el gel en trozos

pequeños y lavarlo a fondo durante 24 horas con agua destilada y lavarlo adicionalmente durante 8 horas con agua salina hervida para obtener gel con 0,23% -1,2% de contenido sólido. Sin embargo, el método anterior tiene las siguientes deficiencias:

- 5 (1) se requiere un paso de purificación complejo;
- (2) el gel puede hincharse y el contenido de gel es bajo para eliminar el agente de reticulación con agua salina hervida y gel de obtención. Por lo tanto, el proceso tiene un paso adicional para mejorar el contenido de gel; y
- (3) el ácido hialurónico reticulado tiene que hincharse de nuevo en la solución de tampón para ajustar la presión osmótica y el valor de pH de modo que el método no sea adecuado para la industria.

10 **[0009]** El documento US 2006/094758A1 describe la reticulación de ácido hialurónico de bajo y alto peso molecular para obtener hidrogeles monofásicos. Los hidrogeles monofásicos tienen buena resistencia mecánica con propiedades mejoradas para inyección. Sin embargo, los hidrogeles monofásicos tienen un agente reticulante residual de más de 300 ppm después de la reacción de reticulación a 50°C. Entonces, el agente de reticulación residual se pretende eliminar por diálisis, pero el agente de reticulación no se puede eliminar completamente. Por lo tanto, ni el agente de reticulación no reaccionado con dos extremos de estado libre ni el agente de reticulación reaccionado con un extremo de estado libre y un extremo de estado de unión en los hidrogeles no pueden eliminarse mediante diálisis o lavado.

20 **[0010]** El documento US 2005/0281880A1 describe métodos para fabricar hidrogeles de polímeros inyectables, que comprende las etapas de: (a) reticular uno o más polímeros para formar un gel; (b) lavar el gel; (c) purificar el gel; y (d) homogeneizar el gel para producir el hidrogel. El método usa un reticulante difuncional o multifuncional con alta concentración para fabricar hidrogel. Por lo tanto, el hidrogel mencionado anteriormente contiene agentes de reticulación residuales. Además, el hidrogel necesita de 2 a 3 días para lavar y purificar el gel. Sin embargo, el hidrogel se encuentra en condiciones casi neutras y puede estar contaminado por microorganismos.

30 **[0011]** El documento US 2007/0026070A1 divulga un método para fabricar una composición de polisacárido reticulado que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un polisacárido mezclado en un medio alcalino con un epóxido bifuncional o polifuncional para proporcionar un polisacárido esencialmente reticulado epoxídico, en donde el epóxido está unido sustancialmente al polisacárido por enlaces de éter; (b) secar el polisacárido epoxídico reticulado sin eliminar sustancialmente el epóxido del medio alcalino para formar una matriz de polisacárido reticulado; (c) lavar opcionalmente la matriz de polisacárido reticulado con un disolvente miscible en agua; y (d) neutralizar la matriz de polisacárido reticulado con un medio ácido para formar un gel de polisacárido reticulado. Por lo tanto, el método forma un producto que tiene agentes de reticulación residuales.

35 **[0012]** US 4.716.224 da a conocer un método de fabricación de ácido hialurónico reticulado usando precipitación para eliminar el agente de reticulación. Sin embargo, el método forma un producto que todavía tiene agentes de reticulación residuales.

40 **[0013]** Cuando la reticulación de polímeros para formar un gel en un medio alcalino, la reacción de reticulación compite con una reacción de hidrólisis como se muestra por Y. Tokita y A. Okamoto, "Hydrolytic Degradation of Hyaluronic Acid", Polymer Reabsorción y Estabilidad, vol. 48, pp. 269 - 273 (1995). En el período de reacción inicial, la concentración del agente de reticulación es alta, por lo que la reacción de reticulación es la reacción principal. Pero, a medida que se consume una cantidad específica del reticulante, la reacción de hidrólisis se convierte en la reacción principal y destruye el gel que causa la degradación del gel. Por lo tanto, la reacción de reticulación en un medio alcalino tiene que terminarse antes de que se produzcan tales reacciones secundarias, a pesar de que el gel permanece como agente de reticulación residual. El método de fabricación comprende la etapa de: reticular un reticulante hialuronato y multifuncional o funcional en 25 a 60°C durante entre 10 minutos y 24 horas en condiciones básicas para obtener un gel; y purificando el gel para eliminar los agentes de reticulación. Sin embargo, el agente de reticulación no se puede eliminar completamente. Un tiempo de reacción real se relaciona con la temperatura y las condiciones básicas. No importa que el gel obtenido en el método anterior prosiga la purificación o no, todavía quedaba una cierta cantidad o una cantidad significativa de agentes de reticulación en el ácido hialurónico reticulado.

55 **[0014]** Para superar las deficiencias, la presente invención proporciona un método para producir ácido hialurónico reticulado para mitigar u obviar los problemas mencionados anteriormente.

RESUMEN DE LA INVENCION

60 **[0015]** El principal objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método para producir ácido hialurónico reticulado con una disminución de agente de reticulación.

65 **[0016]** Un método para producir ácido hialurónico reticulado de acuerdo con la presente invención comprende a) reticulación de un polímero a alta temperatura de 35 a 60°C, y b) reticulación del polímero a una temperatura baja, entre 10 a 30°C, durante un tiempo de reacción superior a 48 horas con un reticulante para formar un ácido hialurónico reticulado en condiciones básicas preparado por una base inorgánica con una concentración de 0,2 N a

1,5 N, en el que el paso a) se lleva a cabo antes de la etapa b), y en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, hialuronato y una mezcla de los mismos. El método está ausente de una etapa de purificación del ácido hialurónico reticulado ya que el método de la invención reduce la concentración de agentes de reticulación con el grupo funcional de estado libre en un producto, por lo que reduce la necesidad de purificación.

[0017] Otros objetivos, ventajas y características novedosas de la invención resultarán más evidentes de la siguiente descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

[0018] Al describir y reivindicar la presente invención, la siguiente terminología será utilizada de acuerdo con las siguientes definiciones.

[0019] El "hialuronato" es un ácido hialurónico compuesto por un ion metálico.

[0020] El peso molecular del ácido hialurónico, hialuronato, sus derivados y una mezcla de los mismos no está limitado en la invención, y puede referirse a bajo peso molecular, alto peso molecular o una mezcla que tiene bajo y alto peso molecular de ácido hialurónico, hialuronato, derivados de los mismos, tales como por debajo de 100.000 D; de 100.000 a 500.000 D; de 500.000 a 1.000.000 D; de 1.000.000 a 1.500.000 D; de 1.500.000 a 2.000.000 D. de 2.500.000 a 3.000.000 D o similar.

[0021] El "ácido hialurónico reticulado" es un polímero de red estructurada después de ácido hialurónico, hialuronato o una mezcla de los mismos parcialmente reticulado o completamente reticulado por el agente de reticulación. El ácido hialurónico reticulado puede ser sólido, líquido (cuando el ácido hialurónico reticulado se disuelve en agua o solución de tampón), hidrogel (cuando el ácido hialurónico reticulado se hincha en agua o solución de tampón), una mezcla entre líquido y hidrogel o sólido insoluble en agua. Los tipos del ácido hialurónico reticulado dependen del contenido del agente reticulado y del método utilizado para fabricar el ácido hialurónico reticulado. En la presente invención, el ácido hialurónico reticulado puede ser un sólido, un líquido, un hidrogel o una mezcla sólida y líquida. El ácido hialurónico reticulado sólido puede ser de partículas, esponjoso, en tiras, esférico, elíptico o similar.

[0022] En la reacción de reticulación, dos de ácido hialurónico, hialuronato o una mezcla de los mismos forma el enlace químico tal como enlace de éter en la presente invención entre dos cadenas lineales sin producir subproducto por lo que una reacción de reticulación es teóricamente procedida completamente. El "reticulante con un grupo funcional de estado libre" indica que el reticulante al menos un grupo funcional no reacciona con ácido hialurónico, hialuronato, derivados de los mismos o una mezcla de los mismos.

[0023] El método de la invención puede ser producido en condiciones específicas (por ejemplo, condiciones estériles), o condiciones comunes. Debido a que el método utiliza condiciones básicas, la bacteria no crece, por lo tanto, se evitan los riesgos de contaminación causados por el lavado de hidrogel.

[0024] Un método para producir ácido hialurónico reticulado de acuerdo con la presente invención comprende a) reticulación de un polímero a alta temperatura de 35 a 60°C, y b) reticulación del polímero a baja temperatura de 10 a 30°C durante un tiempo de reacción superior a 48 horas con un reticulante para formar un ácido hialurónico reticulado en condiciones básicas preparado por una base inorgánica con una concentración de 0,2 N a 1,5 N, en el que el paso a) se realiza antes la etapa b), en donde la etapa a) se realiza antes de la etapa b), y en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, hialuronato y una mezcla de los mismos. El método está ausente de un paso de purificación del ácido hialurónico reticulado. El método para producir ácido hialurónico reticulado comprende una reacción de reticulación a alta temperatura desde 35 hasta 60°C antes de la etapa de reticulación a baja temperatura. Más preferiblemente, la alta temperatura es de 35 a 50°C. Más preferiblemente, la alta temperatura es de 35 a 40°C. Esto permite la reticulación parcial del polímero antes de que comience el deterioro.

[0025] Preferiblemente, cuando la alta temperatura es de 35°C, la reacción de reticulación se procedió durante menos de 72 horas; más preferiblemente de 4 a 48 horas; lo más preferiblemente de 6 a 12 horas.

[0026] Preferiblemente, cuando la alta temperatura es 40°C, la reacción de reticulación se procedió durante menos de 48 horas; más preferiblemente de 2 a 24 horas; lo más preferiblemente de 3 a 6 horas.

[0027] Preferiblemente, cuando la alta temperatura es 50°C, la reacción de reticulación se procedió durante menos de 8 horas; más preferiblemente de 0,1 a 2 horas; más preferiblemente, procede de 0,2 a 1 hora.

[0028] Preferiblemente, cuando la alta temperatura es 60°C, la reacción de reticulación se procedió durante menos de 2 horas; más preferiblemente de 0,1 a 0,5 hora; lo más preferiblemente de 0,2 a 0,3 horas.

[0029] Preferiblemente, el método para producir ácido hialurónico reticulado comprende además la dilución de la etapa de ácido hialurónico reticulado después de la etapa de reticulación a baja temperatura. Diluir el ácido

hialurónico reticulado para ajustar el ácido hialurónico reticulado a una concentración deseada y una presión osmótica aceptable y un valor de pH en la fisiología animal, y puede comprender una dilución usando agua, solución neutra, solución de tampón, solución salina o una mezcla de las mismas.

- 5 **[0030]** Por ejemplo, una concentración preferible del ácido hialurónico reticulado es de 5 mg/mL a 60 mg/ml, más preferiblemente de 10 mg/mL a 40 mg/mL, lo más preferiblemente de 20 mg/mL a 30 mg/mL, y una presión osmótica preferible es de 280 a 340 mOsm/kg.
- 10 **[0031]** Preferiblemente, el método para producir ácido hialurónico reticulado comprende además una etapa de entorno de entorno de reacción reticulada neutralizante después de la etapa de reticulación a baja temperatura para neutralizar ambiente de reacción no neutral original a un entorno de reacción neutral con valor de pH preferiblemente entre 6,5 y 7,5 para ser utilizado con animales. La etapa de neutralización del entorno de reacción de reticulación y la dilución del paso de ácido hialurónico reticulado se pueden llevar a cabo simultáneamente.
- 15 **[0032]** Preferiblemente, el método para producir el ácido hialurónico reticulado tiene además una etapa de homogeneización del paso de ácido hialurónico reticulado después de la etapa de reticulación a baja temperatura para formar una partícula dispersante.
- 20 **[0033]** Preferiblemente, el hialuronato se selecciona del grupo que consiste en hialuronato de sodio, hialuronato de potasio y hialuronato de zinc.
- [0034]** Preferiblemente, el ácido inorgánico se selecciona del grupo que consiste de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y una mezcla de los mismos.
- 25 **[0035]** Preferiblemente, la condición básica está en una concentración de 0,2 N a 0,5 N. Más preferiblemente, la concentración es de 0,25 N a 0,5 N.
- [0036]** Preferiblemente, el agente de reticulación es un agente de reticulación multifuncional.
- 30 **[0037]** Más preferiblemente, el agente de reticulación es un reticulante difuncional.
- [0038]** Preferiblemente, el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en éter de diglicidilo 1,4-butanodiol éter, éter de diglicidilo de etilenglicol, éter de diglicidilo 1,6-hexanodiol, éter de diglicidilo de polipropilenglicol, éter de diglicidilo de politetrametilenglicol, éter de diglicidilo de neopentilglicol, éster de poliglicidilo de poliglicerol, éter de poliglicidilo de diglicerol, éter de poliglicidilo de glicerol, éter de poliglicidilo de trimetilolpropano, éter de poliglicidilo de pentaeritritol, éter de poliglicidilo de sorbitol, 1,2,7,8-diepoxioctano, diepóxido 1,3-butadieno y una mezcla de los mismos.
- 35 **[0039]** Preferiblemente, una concentración del agente de reticulación es de 0,05 a 2% p/v. Más preferiblemente, una concentración del agente de reticulación es de 0,1 a 1,5% p/v. Más preferiblemente, una concentración del agente de reticulación es de 0,1 a 1,0% p/v. Más preferiblemente, una concentración del agente de reticulación es de 0,6 a 1,0% p/v.
- 40 **[0040]** Preferiblemente, la temperatura baja es de 15 a 30°C. Más preferiblemente, la baja temperatura es de 20 a 30°C. Dado que la hidrólisis del ácido hialurónico reticulado no se produce en condiciones básicas a baja temperatura, el ácido hialurónico reticulado no sufrirá un deterioro rápido y la reacción de reticulación terminará cuando el agente de reticulación se consuma a una concentración razonable.
- 45 **[0041]** Dicho deterioro en el ácido hialurónico reticulado puede provocar que el ácido hialurónico reticulado se convierta en color amarillo profundo o color marrón oscuro después de reacción de reticulación debido a la hidrólisis del ácido hialurónico reticulado en condiciones básicas o causa que un producto final se degrade obviamente. En la presente invención, el deterioro no está limitado en amarillo claro o marrón claro debido a que el ácido hialurónico reticulado es de color amarillo claro o marrón claro.
- 50 **[0042]** El consumo de reticulante dentro de una concentración razonable indica que la concentración del reticulante en el producto reticulado puede usarse en los siguientes pasos, tales como por debajo de 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm o 20 ppm. Sin embargo, la concentración de consumo del agente de reticulación no pretende limitar el alcance de la presente invención. El agente de reticulación se consume como resultado no solo de la reacción de reticulación sino también de la reacción de hidrólisis. El agente de reticulación no reaccionado se puede controlar por debajo de 1 ppm, 2 ppm, 2 a 5 ppm, 10 ppm, 10 a 15 ppm o 15 a 20 ppm.
- 55 **[0043]** Preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 28 días. Más preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 11 días. Más preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 7 días. El tiempo de reacción se refiere a una concentración del agente de reticulación y la base y la temperatura de reacción.
- 60 **[0043]** Preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 28 días. Más preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 11 días. Más preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 7 días. El tiempo de reacción se refiere a una concentración del agente de reticulación y la base y la temperatura de reacción.
- 65 **[0043]** Preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 28 días. Más preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 11 días. Más preferiblemente, el tiempo de reacción es de 3 a 7 días. El tiempo de reacción se refiere a una concentración del agente de reticulación y la base y la temperatura de reacción.

[0044] Preferiblemente, una concentración inicial de reactivo de polímero es de 2 a 40% p/v. Más preferiblemente, una concentración de polímero es de 10 a 30% p/v. Más preferiblemente, una concentración de polímero es de 15 a 20% p/v.

5 [0045] Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención pero no deben interpretarse como limitantes de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas a la misma.

[0046] EJEMPLO 1: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v, concentración de base de 0,5 N, baja temperatura de reacción de 30°C y concentración de agente de reticulación (1,2,7,8-diepoxioctano) de 1 v/v%.

10 [0047] Se añadió 8,9 mL de agua desionizada en 1 mL de solución de hidróxido de sodio de 5N, 0,1 mL de 1,2,7,8-diepoxioctano y 2 g de hialuronato sódico (peso seco) de ácido hialurónico de alto peso molecular, (HHA, peso molecular medio de 1.350.000) bajo agitación constante mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y colocada en un recipiente termostático mantenido a 30°C durante varios tiempos de reacción como se muestra en la tabla 1.

15 [0048] El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,2 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón de 0,073 M de fosfato y 0,8 mL de solución de cloruro de hidrógeno de 6N para regular el valor de pH y la presión osmótica ajustada a la fisiología adecuada para los animales, a continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.

20 [0049] Un método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado comprende una etapa de hidrólisis con hialuronidasa y el método utilizado por Nelis y Sinsheimer (A sensitive Fluorimetric for the Determination of Aliphatic Epoxides under Physiological Conditions, Anal. Biochem., Vol. 115, págs. 151 - 157, 1981). Una calibración del método mencionado anteriormente proporciona un buen modelo lineal cuando el contenido de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre está entre 1 y 300 ppm en ácido hialurónico reticulado.

25 [0050] Se añadió 0,1 g de ácido hialurónico reticulado a un matraz volumétrico certificado 50 mL y 3 mL de solución de ácido sulfúrico de 6 N añadido para disolver el ácido hialurónico reticulado. Después de disolver el ácido hialurónico reticulado, se añadió agua desionizada mediante una báscula del matraz aforado certificado. A continuación, utilizando el método de European Pharmacopoeia 4.0 (2002), se determinó el contenido de ácido glucurónico para calcular el contenido de ácido hialurónico reticulado. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre en el producto se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 1.

30 [0051] EJEMPLO 2: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v, concentración de base de 0,5 N, baja temperatura de reacción de 30°C y concentración de agente de reticulación (diepóxido de 1,3-butadieno) de 1 v/v %.

35 [0052] El método del ejemplo 1 fue seguido excepto que el agente de reticulación era diepóxido de 1,3-butadieno. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 1.

40 [0053] EJEMPLO 3: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v, concentración de la base de 0,25 N, baja temperatura de reacción de 10°C y el agente de reticulación (éter de diglicidilo de 1,4-butanodiol) concentración de 1% v/v.

45 [0054] Se añadió 9,4 mL de agua desionizada a 0,5 ml de solución de hidróxido de sodio 5 N, 0,1 mL de éter de diglicidilo 1,4-butanedion y 2 g (peso seco) de hialuronato de sodio de ácido hialurónico de alto peso molecular (peso molecular HHA, promedio 1.350.000) bajo agitación constante mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y colocada en un recipiente termostático mantenido a 10°C durante los tiempos de reacción que se muestran en la tabla 1. El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,6 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón de fosfato 0,1 M y 0,4 mL de solución de cloruro de hidrógeno 6 N para regular el valor de pH y ajustar la presión osmótica a la fisiología adecuada para animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.

50 [0055] Se utilizó el método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado en el ejemplo 1. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 1.

55 [0056] EJEMPLO 4: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v, concentración de la base de 0,25 N, baja temperatura de reacción de 20°C y concentración de agente de reticulación (éter de diglicidilo 1,4-butanodiol) de 1% v/v.

60 [0057] Se utilizó el método del Ejemplo 3, excepto que se varió la baja temperatura de reacción. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre

se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 1.

[0058] EJEMPLO 5: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v, concentración de la base de 0,25 N, baja temperatura de reacción de 30°C y concentración de agente de reticulación (éter de diglicidilo 1,4-butanodiol) de 1% v/v.

[0059] Se utilizó el método del Ejemplo 3, excepto que se varió la baja temperatura de reacción. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 1.

[0060] EJEMPLO 6: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v, concentración de base de 0,2 N, baja temperatura de reacción de 30°C y concentración de agente de reticulación (éter de diglicidilo 1,4-butanodiol) de 1 v/v%.

[0061] Se añadió 9,5 ml de agua desionizada a 0,4 mL de solución de hidróxido de sodio 5 N, 0,1 mL de éter de diglicidilo de 1,4-butanedion y 2 g (peso seco) de ácido hialurónico de alto peso molecular (peso molecular HHA, promedio 1,350,000) bajo agitación constante mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y se colocaron en un recipiente termostático mantenido a 30°C durante los tiempos de reacción que se muestran en la tabla 1. El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,68 mL de pH. 7,0±0,2 de solución de tampón de fosfato 0,1 M y 0,32 mL de solución de cloruro de hidrógeno 6 N para regular el valor del pH y ajustar la presión osmótica a la fisiología adecuada para los animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.

[0062] El método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado era el mismo que el ejemplo 1. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente residual de reticulación con grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 1.

[0063] La Tabla 1 muestra que, como el tiempo de reacción de la reacción de reticulación durante 2 días, el ácido hialurónico reticulado se puede usar para animales.

Tabla 1

Ejemplo	Temperatura de reacción (° C)	Tiempo de reacción (día)	Contenido de ácido hialurónico reticulado (p/v%) en producto	agente de reticulación con grupo funcional de estado libre (ppm) en el producto
1	30	1	1,85	64,64
		2	1,91	5,68
		3	1,89	3,15
		4	1,86	<1 *
2	30	1	1,94	15,95
		2	1,89	4,25
		3	1,96	<1 *

(continuación)

Ejemplo	Temperatura de reacción (°C)	Tiempo de reacción (día)	Contenido de ácido hialurónico reticulado (p/v%) en producto	agente de reticulación con grupo funcional de estado libre (ppm) en el producto
3	10	14	2,09	42,67
		21	2,06	12,16
		28	1,95	<1*
4	20	1	2,02	441,08
		3	1,95	157,04
		5	2,05	47,32
		7	1,98	9,26
		9	1,98	1,71
		11	1,98	<1*
5	30	1	1,91	167,91
		2	1,97	30,25
		3	1,94	9,87
		4	1,83	1,89
		5	1,95	<1*
6	30	1	1,95	247,69
		2	2,00	79,92
		3	2,03	24,38
		4	1,82	9,05
		5	1,95	4,57
		6	1,90	2,51
		7	1,98	<1*

Nota: * representa que no está en el rango de calibración (entre 1 y 300 ppm).

[0064] EJEMPLO 7: concentración de sodio hialuronato de 10% p/v, concentración de la base de 0,05 N, alta temperatura de reacción de 50°C, baja temperatura de reacción de 30°C y concentración de agente de reticulación (éter diglicídico de 1,4-butanodiol) de 1% v/v.

[0065] Se añadió 9,8 mL de agua desionizada a 0,1 mL de solución de hidróxido de sodio 5 N, 0,1 mL de éter de diglicidilo de 1,4-butanodion y 1 g (peso en seco) de hialuronato de sodio de ácido hialurónico de alto peso molecular, (peso molecular medio HHA 1.350.000) bajo agitación continua mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y se colocaron en un recipiente termostático mantenido a 50°C durante 7 horas y luego a 30°C durante un tiempo de reacción específico que se muestra en la tabla 2.

[0066] El ácido hialurónico reticulado se añadió a 9,87 mL de agua desionizada, 20 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón 0,15 M de fosfato y 0,13 mL de solución de cloruro de hidrógeno de 6N para regular el valor de pH y la presión osmótica se ajustó a fisiología adecuada para animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.

[0067] El método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado era el mismo que el ejemplo 1. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente residual reticulado con grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2.

[0068] EJEMPLO 8: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v, concentración de base de 0,5 N, alta temperatura de reacción de 40°C, baja temperatura de reacción de 25°C y concentración de agente de reticulación (éter diglicídico de 1,4-butanodiol) de 1% v/v.

[0069] Se añadieron 8,9 mL de agua desionizada a 1 mL de solución de hidróxido de sodio 5 N, 0,1 mL de éter de diglicidilo 1,4-butanodiol y 2,0 g (peso en seco) de hialuronato de sodio de ácido hialurónico de alto peso molecular, HHA (peso molecular medio 1.350.000) bajo agitación continua mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y se colocaron en un recipiente termostático mantenido a 40°C durante 3 horas y a 25°C durante un tiempo de reacción específico que se muestra en la tabla 2.

[0070] El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,2 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón de fosfato 0,073 M y

0,8 mL de solución de cloruro de 6 N de hidrógeno para regular el valor de pH y la presión osmótica ajustada a la fisiología adecuada para los animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.

5 **[0071]** Se usó el método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado de la misma manera que en el ejemplo 1. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2.

10 **[0072]** EJEMPLO 9: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v, concentración de base de 0,5 N, alta temperatura de reacción de 40°C, baja temperatura de reacción de 25°C y concentración de agente de reticulación (1,2,7,8-diepoxioctano) de 1% v/v.

15 **[0073]** Se utilizó el método del Ejemplo 8, excepto que el agente de reticulación era 1,2,7,8-diepoxioctano. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2.

20 **[0074]** EJEMPLO 10: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v (10 p/v HHA% y 10 p/v LHA%), concentración de la base de 0,25 N, alta temperatura de reacción de 40°C, baja temperatura de reacción de 10°C y concentración de reticulante (éter de diglicidilo 1,4-butanodiol) de 0,6 v/v%.

25 **[0075]** Se añadió 9,44 mL de agua desionizada a 0,5 mL de solución de hidróxido de sodio de 5 N, 0,06 mL de éter de diglicidilo 1,4-butanodiol, 1 g (peso seco) de hialuronato sódico de alto peso molecular, HHA (peso molecular medio 1.350.000) y 1 g (peso seco) de hialuronato de sodio de bajo peso molecular, LHA (peso molecular promedio 440,000) bajo agitación continua mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y se coloca en un recipiente termostático mantenido a 40°C durante 4 horas y luego a 10°C durante un tiempo de reacción específico que se muestra en la tabla 2.

30 **[0076]** El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,6 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón de fosfato 0,1 M y 0,4 ml de solución de cloruro de 6 N de hidrógeno para regular el valor de pH y la presión osmótica ajustada a la fisiología adecuada para los animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.

35 **[0077]** Se usó el método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado en el ejemplo 1. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2.

40 **[0078]** EJEMPLO 11: Concentración de hialuronato de sodio de 30% p/v (15% p/v HHA y 15% p/v LHA), concentración de la base de 0,25 N, alta temperatura de reacción de 40°C, baja temperatura de reacción de 25°C y concentración de reticulante (éter de diglicidilo 1,4-butanodionil) de 0,6% v/v.

45 **[0079]** Se agregaron 9,44 mL de agua desionizada a 0.5 mL de solución de hidróxido de sodio 5N, 0,06 mL de éter diglicidílico 1,4-butanodiol, 1,5 g (peso seco) de hialuronato de sodio de alto peso molecular, HHA (peso molecular promedio 1.350,000) y 1.5 g (peso seco) de hialuronato de sodio de bajo peso molecular, LHA (peso molecular promedio 440,000) bajo agitación continua mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y se coloca en un recipiente termostático mantenido a 40°C durante 4 horas y luego a 25°C para un tiempo de reacción específico como se muestra en la tabla 2.

50 **[0080]** El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,6 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón de fosfato 0,10 M y 0,4 mL de solución de cloruro de 6 N de hidrógeno para regular el valor de pH y la presión osmótica ajustada a la fisiología adecuada para los animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.

55 **[0081]** Se usó el método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado del ejemplo 1. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2.

60 **[0082]** EJEMPLO 12: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v LHA, la concentración de base de 0,25 N, alta temperatura de reacción de 40°C, baja temperatura de reacción de 25°C y concentración de agente de reticulación (éter de diglicidilo 1,4-butanodiol) de 0,6% v/v.

[0083] Se utilizó el método del ejemplo 11, excepto 2 g (peso seco) de hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2.

65 **[0084]** EJEMPLO 13: Concentración de hialuronato de sodio de 20% p/v (10% p/v HHA y 10% p/v LHA), concentración de la base de 0,25 N, alta temperatura de reacción de 40°C, baja temperatura de reacción de 25°C y

concentración de reticulante (éter de diglicidilo 1,4-butanodiol) de 0,1% v/v.

- 5 **[0085]** Se añadió 9,49 mL de agua desionizada a 0,5 mL de solución de hidróxido de sodio 5N, 0,01 mL de éter de diglicidilo 1,4-butanodiol, 1,0 g de hialuronato de sodio de peso molecular alto, HHA (peso molecular medio 1.350.000) y 1,0 g de hialuronato de sodio de bajo peso molecular, LHA (peso molecular promedio 440.000) bajo agitación continua mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y colocado en un recipiente termostático mantenido a 40°C durante 4 horas y luego a 25°C durante un tiempo de reacción específico que se muestra en la tabla 2.
- 10 **[0086]** El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,6 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón de fosfato 0,10 M y 0,4 mL de solución de cloruro de 6 N de hidrógeno para regular el valor de pH y la presión osmótica ajustada a la fisiología adecuada para los animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.
- 15 **[0087]** Se utilizó el método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado del ejemplo 1. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con grupo funcional de estado libre se registraron a diferentes tiempos de reacción como se muestra en la Tabla 2.
- 20 **[0088]** EJEMPLO 14: Concentración de hialuronato sódico de 20% p/v LHA, concentración de base de 0,2 N, alta temperatura de reacción de 40°C, baja temperatura de reacción de 30°C y concentración de reticulante (éter de diglicidilo 1,4-butanodiol) de 1% v/v.
- 25 **[0089]** Se añadió 9,5 mL de agua desionizada a 0,4 mL de solución de hidróxido de sodio de 5 N, 0,1 ml de éter de diglicidilo 1,4-butanodiol, 2,0 g (peso seco) de hialuronato de sodio de bajo peso molecular, LHA (peso molecular medio 440.000) bajo agitación continua mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y se coloca en un recipiente termostático mantenido a 40°C durante 4 horas y luego a 30°C durante un tiempo de reacción específico que se muestra en la tabla 2.
- 30 **[0090]** El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,68 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón de fosfato 0,10 M y 0,32 mL de solución de cloruro de 6 N de hidrógeno para regular el valor de pH y la presión osmótica ajustada a la fisiología adecuada para los animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.
- 35 **[0091]** Se utilizó el método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado del ejemplo 1. El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2.
- 40 **[0092]** Ejemplo 15: Concentración de hialuronato de sodio de 10% p/v HHA, carboximetilcelulosa (sal de sodio) de 10% p/v, concentración de base de 0,3 N, alta temperatura de reacción de 40°C, la baja temperatura de reacción de 20°C y concentración de reticulante (éter de diglicidilo 1,4-butanodiol) de 0,6% v/v.
- 45 **[0093]** Se añadieron 9,34 mL de agua desionizada a 0,6 mL de solución de hidróxido de sodio 5 N, 0,4 g de cloruro de sodio, 0,06 mL de éter diglicidílico de 1,4-butanodiol, 1,0 g (peso seco) de hialuronato de sodio de alto peso molecular, HHA y 1,0 g (peso seco) de carboximetilcelulosa (sal de sodio) bajo agitación continua mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 minutos y se coloca en un recipiente termostático mantenido a 40°C durante 4 horas y luego a 20°C para un tiempo de reacción específico que se muestra en la tabla 2.
- 50 **[0094]** El ácido hialurónico reticulado se añadió a 79,50 mL de pH 7,0±0,2 de solución de tampón de fosfato 0,01 M y 0,5 mL de solución de cloruro de 6 N de hidrógeno para regular el valor de pH y la presión osmótica ajustada a la fisiología adecuada para los animales. A continuación, el ácido hialurónico reticulado se homogeneizó.
- 55 **[0095]** Se utilizó el método para determinar la cantidad de agente de reticulación con el grupo funcional de estado libre en ácido hialurónico reticulado del ejemplo 1, excepto que la enzima de hidrólisis era la mezcla de hialuronidasa y celulasa (carcinoma de celulosa 1,5 L, Novo Nordisk Ferment Ltd.). El contenido de ácido hialurónico reticulado y el contenido de agente de reticulación residual con el grupo funcional de estado libre se registraron en diferentes tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2.
- 60 **[0096]** Cuando el tiempo de reacción de la reacción de reticulación es más de 2 días, el ácido hialurónico reticulado se puede utilizar para animal.

65

Tabla 2

Ejemplo	Alta temperatura		Baja temperatura		Contenido de ácido hialurónico reticulado (p/v%) en producto	Agente de reticulación con grupo funcional de estado libre (ppm) en el producto
	°C	Tiempo (horas)	°C	Tiempo (días)		
7	50	7	30	1	2,11	425,01*
				3	2,23	346,10*
				5	2,25	189,35
				9	1,82	145,49
				11	2,15	64,34
				13	2,10	54,45
				15	2,07	27,14
				17	2,09	16,41
8	40	3	25	0	1,82	313,53*
				1	1,92	24,54
				2	1,83	4,38
				3	1,96	<1*
				0	1,86	365,13*
				1	1,81	111,77
				2	1,88	23,37
				3	2,04	5,90
9	40	3	25	4	1,91	<1*
				0	1,82	297,81
				14	1,87	7,67
				18	2,01	2,97
10	40	4	10	23	1,89	<1
				0	2,04	218,05
				1	2,05	95,08
				2	1,79	37,50
11	40	4	25	3	2,07	15,96
				4	1,93	8,66
				5	1,90	<1
				0	1,98	331,94*
				1	1,86	123,51
12	40	4	25	2	1,99	54,89
				3	1,81	21,44
				4	1,77	10,58
				5	1,87	<1*
				0	1,91	46,27
				1	1,91	19,62
13	40	4	25	2	1,94	5,37
				3	1,79	<1
				1	1,86	162,98
				2	1,87	50,66
14	40	4	30	3	1,97	16,09
				4	1,81	5,42
				5	1,80	1,32
				6	1,78	<1*

(continuación)

Ejemplo	Alta temperatura		Baja temperatura		Contenido de ácido hialurónico reticulado (p/v%) en producto	Agente de reticulación con grupo funcional de estado libre (ppm) en el producto
	°C	Tiempo (horas)	°C	Tiempo (días)		
15	40	4	20	1	2	162,21
				2	2	73,14
				3	2	29,35
				4	2	11,13
15				5	2	3,04
				6	2	1,02
				7	2	<1*

Nota: * representa que no está en el rango de calibración (entre 1 a 300 ppm)

El ácido hialurónico reticulado en el ejemplo 15 es una concentración de hialuronato de sodio de 1% p/v de HHA y carboximetilcelulosa de 1% p/v.

[0097] Aunque se han expuesto numerosas características y ventajas de la presente invención en la descripción anterior, junto con detalles de la estructura y función de la invención, la descripción es solo ilustrativa.

Reivindicaciones

1. Un método para producir ácido hialurónico reticulado que comprende:
 - 5 (a) reticulación de un polímero a alta temperatura de 35 a 60°C; y
(b) reticulación del polímero a baja temperatura, entre 10 y 30°C, durante un tiempo de reacción de más de 48 horas con un agente de entrecruzamiento para formar un ácido hialurónico reticulado en condiciones básicas preparadas por una base inorgánica con una concentración de 0,2 N a 1,5 N, en donde el paso (a) se lleva a cabo antes del paso (b);
 - 10 el polímero se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico, hialuronato y una mezcla de los mismos, y en el que el método está ausente de una etapa de purificación del ácido hialurónico reticulado.
2. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, en el que el hialuronato se selecciona del grupo que consiste en hialuronato de sodio, hialuronato de potasio e hialuronato de cinc.
3. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, en el que la base inorgánica tiene una concentración de 0,2 N a 0,5 N.
4. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, en el que la base inorgánica se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y una mezcla de los mismos.
5. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, en el que el agente de reticulación es un agente de reticulación multifuncional.
6. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 5, en el que el agente de reticulación es un agente de entrecruzamiento difuncional.
7. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 6, en el que el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en éter de diglicidilo 1,4-butanodiol, éter de diglicidilo de etilenglicol, éter de diglicidilo 1,6-hexanodiol, polipropilenglicol diglicidiléter, politetrametilenglicoldiglicidiléter, neopentilglicol diglicidiléter, poliglicerolpoliglicidiléster, diglicerolpoliglicidiléter, glicerolpoliglicidiléter, trimetilopropanopoliglicidiléter, pentaeritritolpoliglicidiléter, sorbitolpoliglicidiléter, 1,2,7,8-diepoxi octano, diepóxido 1,3-butadieno y una mezcla de los mismos.
8. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 5, en el que una concentración del agente de reticulación es de 0,05 a 2% p/v.
9. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, en el que la baja temperatura es de 15 a 30°C.
10. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 9, en el que la baja temperatura es de 20 a 30°C.
11. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el tiempo de reacción es de entre 3 y 28 días.
12. El método para la producción de ácido hialurónico reticulado reivindicado, donde la concentración del polímero está entre 2 y 40% p/v.
13. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, que tiene una etapa de diluir el ácido hialurónico reticulado después de la etapa de reticulación a baja temperatura.
14. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, que además tiene una etapa de neutralización del paso del entorno de reacción de reticulación después de la etapa de reticulación a baja temperatura para neutralizar el entorno original de reacción no neutra.
15. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, que además tiene una etapa de homogeneizar el ácido hialurónico reticulado después de la etapa de reticulación a baja temperatura.
16. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, en el que el contenido del polímero está entre 5 mg/ml y 60 mg/ml.
17. El método para producir ácido hialurónico reticulado según la reivindicación 1, en el que:
 - 65 cuando la temperatura alta es de 35°C, el tiempo de reacción en el paso (a) es inferior a 72 horas;
 - cuando la temperatura alta es 40°C, un tiempo de reacción en el paso (a) es menos de 48 horas;

ES 2 662 064 T3

cuando la temperatura alta es de 50°C, el tiempo de reacción en el paso (a) es inferior a 8 horas; y cuando la temperatura alta es de 60°C, el tiempo de reacción en el paso (a) es inferior a 2 horas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65