

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 689**

51 Int. Cl.:

A61K 8/73 (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/24 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2013** **PCT/EP2013/069874**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014** **WO14056722**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2013** **E 13766322 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 2903589**

54 Título: **Formulación acuosa estéril inyectable a base de ácido hialurónico reticulado e hidroxiapatita para uso estético**

30 Prioridad:

08.10.2012 FR 1259577

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

21.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GAVARD MOLLIARD, SAMUEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 668 689 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

Formulación acuosa estéril inyectable a base de ácido hialurónico reticulado e hidroxiapatita para uso estético

Campo de la invención

La presente invención tiene por objeto una formulación acuosa estéril inyectable, lista para el uso, reabsorbible, utilizada con fines estéticos en forma de gel viscoelástico cohesivo en partículas que comprende i) ácido hialurónico reticulado o una de sus sales, a una concentración comprendida entre 1% a 4% (masa/volumen); en donde la reticulación llevada a cabo permite la obtención de un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, e ii) hidroxiapatita a una concentración comprendida entre 5% a 60% (masa/volumen), en donde dicha hidroxiapatita está en forma de partículas de tamaño promedio inferior o igual a 200 μm ; poseyendo dicha formulación acuosa estéril inyectable propiedades viscoelásticas tales que $\tan \delta$ a una frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60.

Antecedentes de la invención

El envejecimiento es un fenómeno natural al que se enfrenta todo el mundo. Viene acompañado inevitablemente de una reducción de la actividad celular del cuerpo humano. Los signos más visibles de la edad aparecen en el rostro, la piel se relaja y aparecen las primeras arrugas. Se han desarrollado muchas soluciones para tratar de retrasar la aparición de estos signos de la edad o para reparar los signos ya establecidos.

Entre estas soluciones, se puede mencionar una técnica que consiste en inyectar en o debajo de la piel sustancias denominadas de relleno, estas sustancias pueden ser reabsorbibles o no reabsorbibles *in vivo*. El papel de estas sustancias es rellenar las partes flácidas creando un volumen en o debajo de la piel, para tratar diferentes partes del cuerpo, especialmente el rostro. Por medio de este efecto mecánico, la piel se vuelve a tensar y se alisan las arrugas, dando lugar a un aspecto más joven de la zona tratada.

Entre las sustancias de relleno denominadas reabsorbibles, se puede citar el ácido hialurónico (AH) reticulado (también denominado "AH estabilizado") utilizado en dermoestética. Se inyecta en o debajo de la dermis para rellenar las arrugas o restaurar el volumen en diferentes zonas del cuerpo durante un período de varios meses. Tiene la ventaja de presentar muy pocos efectos secundarios después de la inyección y las complicaciones son extremadamente raras a largo plazo. Por otro lado, en caso de una inyección incorrecta, el médico tiene la capacidad de corregir su tratamiento mediante la inyección de una solución de hialuronidasas (enzimas específicas del AH) solución que degradará el producto a base de AH reticulado previamente inyectado. Las inyecciones de AH reticulado, debido a su desaparición progresiva (reabsorción del polímero en los tejidos con el paso del tiempo), se deben repetir a intervalos regulares, por lo general de 6 a 12 meses, con el fin de mantener la eficacia del tratamiento. El ácido hialurónico no reticulado tiene un tiempo de residencia corto a nivel de la piel (semivida inferior a una semana), se degrada *in vivo* por diferentes factores como la degradación radical, enzimática, térmica y mecánica. Es la reticulación la que permite aumentar significativamente su semivida, ralentizando las cinéticas de degradación del ácido hialurónico de acuerdo con los factores descritos anteriormente, permitiendo de este modo que la eficacia del tratamiento estético alcance hasta aproximadamente 12 meses.

Se ha llevado a cabo una investigación científica intensiva a escala mundial para poner a punto tratamientos a base de ácido hialurónico que tengan un rendimiento mejorado con el paso del tiempo. El objetivo es particularmente tener productos capaces de una degradación más lenta con el fin de mantener un efecto estético óptimo durante un período lo más largo posible, manteniendo al mismo tiempo un alto nivel de seguridad de los productos inyectados.

Otras sustancias de relleno reabsorbibles existen en el mercado de la dermoestética. Se pueden citar por ejemplo los productos que contienen partículas de hidroxiapatita de calcio. Estas partículas están suspendidas en una fase acuosa que puede contener un polímero tal como carboximetil celulosa, un derivado de la celulosa. Los productos de esta familia se inyectan en o debajo de la dermis para rellenar las arrugas o restaurar el volumen de diferentes zonas del cuerpo, y especialmente en el rostro. Tienen un alto nivel de biocompatibilidad, lo que justifica la ausencia de una prueba de alergia antes de la inyección. Para estos productos, se han descrito pocos efectos secundarios o complicaciones y se observa una duración de la eficacia del orden de 12 meses o más. Desde el punto de vista de la reabsorción, la fase acuosa se elimina rápidamente de la zona tratada y los macrófagos degradan y metabolizan las partículas de hidroxiapatita con el paso del tiempo.

Una estimulación de la producción endógena de colágeno con las partículas de hidroxiapatita también se describe para estos productos inyectados en los tejidos de la piel.

Estos productos tienen desgraciadamente una tendencia a migrar, como se describe en diversas publicaciones científicas. Esta migración plantea un problema debido a que induce una pérdida prematura del efecto estético (menos biomaterial en el área corregida) y potencialmente puede inducir efectos secundarios (las partículas se pueden concentrar especialmente en ciertas partes más o menos alejadas de la zona que se va a tratar (debido a las tensiones mecánicas a las que se somete al biomaterial) e inducir localmente las denominadas zonas duras.

En este contexto, es importante poner a disposición de los profesionales, formulaciones que posean propiedades

mecánicas notables, adaptadas a las inyecciones con fines cosméticos y/o estéticos que tengan un aumento de la longevidad en los tejidos, listas para el uso y que no presenten los inconvenientes descritos anteriormente.

Compendio de la invención

La invención se refiere a una formulación acuosa estéril inyectable y biorreabsorbible, utilizada para fines estéticos, en forma de gel viscoelástico cohesivo en partículas que comprende i) ácido hialurónico reticulado o una de sus sales, a una concentración comprendida entre 1% a 4% (masa/volumen); en donde la masa molecular del ácido hialurónico, o de una de sus sales, se encuentra entre $2,5 \times 10^5$ Da y 4×10^6 Da, en donde la reticulación efectuada permite obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, e ii) hidroxiapatita a una concentración comprendida entre 5% a 60% (masa/volumen), en donde dicha hidroxiapatita está en forma de partículas de tamaño promedio inferior o igual a 200 μm ; poseyendo dicha formulación acuosa estéril inyectable propiedades viscoelásticas tales que $\text{Tan } \delta$ a una frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60.

De acuerdo con otro objeto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una formulación acuosa estéril inyectable que comprende las etapas que consisten en: a) preparar una primera mezcla que comprende al menos 1% a 4% en peso de ácido hialurónico reticulado o una de sus sales, mediante la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de dicho biopolímero con ayuda de moléculas bifuncionales o polifuncionales, en donde la reticulación efectuada permite obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, b) purificar dicha primera mezcla, c) a continuación, añadir hidroxiapatita a una concentración comprendida entre 5% a 60% (masa/volumen) mediante una dispersión de manera homogénea en el gel a base de ácido hialurónico reticulado, d) poner el gel obtenido de este modo en una forma lista para el uso, e) esterilizar el producto con calor húmedo.

También de acuerdo con otro objeto, la presente invención se refiere a un kit que se presenta preferiblemente en forma de una jeringa que contiene la formulación tal como se ha descrito anteriormente.

Breve descripción de la figura

La Figura 1 representa las fotos de la comparación de los geles B', X y de la formulación a base de CMC y de hidroxiapatita, según la prueba descrita en el Ejemplo 2.

Descripción detallada de la invención

La invención que se describe a continuación tiene por objeto proporcionar una nueva formulación acuosa estéril inyectable biorreabsorbible, utilizada con fines cosméticos y estéticos, y que presenta propiedades específicas de viscoelasticidad, de relleno y de rendimiento a largo plazo. Esta formulación se caracteriza porque está en forma de gel viscoelástico cohesivo en partículas que comprende

i) ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, a una concentración comprendida entre 1% a 4% (masa/volumen); en donde la reticulación llevada a cabo permite la obtención de un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, e

ii) hidroxiapatita a una concentración comprendida entre 5% a 60% (masa/volumen), en donde dicha hidroxiapatita está en forma de partículas de tamaño promedio inferior o igual a 200 μm ;

poseyendo dicha formulación acuosa estéril inyectable propiedades viscoelásticas tales que $\text{Tan } \delta$ a una frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60.

De manera totalmente sorprendente, se ha constatado que esta formulación posee una capacidad notable para crear volumen en los tejidos a largo plazo, esto gracias a una sinergia entre el ácido hialurónico reticulado y las partículas de hidroxiapatita, de acuerdo con las condiciones de la invención.

Desde un punto de vista mecánico, las partículas de hidroxiapatita (de comportamiento sólido: fuerte elasticidad y viscosidad despreciable) mejoran en gran medida la elasticidad del gel y por lo tanto su capacidad para crear volumen mediante la inducción de una fuerza/presión importante sobre los tejidos para corregir la zona defectuosa que se va a tratar.

El ácido hialurónico reticulado aporta las propiedades de viscoelasticidad, es decir, de elasticidad, pero también de viscosidad que permiten que tenga una consistencia de gel que se aproxima a la de los tejidos y, por lo tanto, contrarrestar la elasticidad muy alta y la falta de viscosidad proporcionada por las partículas de hidroxiapatita. Esto permite tener un producto que se integra en los tejidos de forma mucho más homogénea (el paciente siente menos el producto con una palpación), menos traumática para los tejidos (fuerte limitación de la inflamación después de la inyección) y menos dolorosa en la inyección.

Por otra parte, el ácido hialurónico reticulado, en las condiciones de la invención, va a permitir reducir en gran medida la migración de las partículas de hidroxiapatita, partículas que son retenidas dentro del gel, debido a la fuerte capacidad de cohesión proporcionada por el ácido hialurónico reticulado de naturaleza cohesiva (ácido hialurónico

reticulado que tiene una cinética de reabsorción baja). Esta fuerte limitación de la migración permite tener un gel con una capacidad mejorada para dar volumen a largo plazo y reducir los efectos secundarios, tales como la aparición de las zonas denominadas duras, sentidas por el paciente.

5 El ácido hialurónico es un polisacárido compuesto por la repetición de unidades de disacárido de glucuronato y de N-acetil glucosamina. Se distribuye ampliamente entre el tejido conectivo, epitelial y nervioso tanto en los seres humanos como en los animales. Constituye uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Contribuye de forma significativa a la proliferación y la migración de las células. Se encuentra sobre todo a una concentración importante en el humor acuoso, el fluido sinovial, la piel y el cordón umbilical.

10 Entre las sales de ácido hialurónico preferidas de acuerdo con la invención, se pueden mencionar las sales de ácido hialurónico, con un catión, por ejemplo una sal monovalente o divalente tal como las sales de sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso. Las sales de sodio son particularmente preferidas.

15 De acuerdo con la invención, el ácido hialurónico o una de sus sales, está en forma reticulada. Esta reticulación se consigue mediante la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de dicho biopolímero con ayuda de moléculas bifuncionales o polifuncionales, en donde la reticulación llevada a cabo permite obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, también conocida como monofásico.

20 La naturaleza cohesiva del gel a base de ácido hialurónico reticulado es una especificidad mayor y necesaria de la invención. El gel no se debe desintegrar rápidamente cuando se introduce en agua, como lo hace un gel de naturaleza no cohesiva, también denominado gel bifásico (tipo de gel a base de ácido hialurónico reticulado que no es capaz de mantener las partículas de hidroxiapatita y por ello de evitar la migración). El ejemplo 2 pone de relieve esta diferencia entre un gel cohesivo y un gel no cohesivo.

25 La presente invención comprende en general una concentración de ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, comprendida entre 1% a 4% (masa/volumen), preferiblemente entre 1% y 3% (masa/volumen). De acuerdo con una variante particularmente preferida, la concentración de ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, está comprendida entre 1,5% a 2,5% (masa/volumen). Alternativamente, la concentración de ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, puede estar comprendida entre 1,5% a 3% (masa/volumen) o 1% a 2,5% (masa/volumen).

Ventajosamente, la formulación acuosa de acuerdo con la invención comprende ácido hialurónico o una de sus sales, en donde la masa molecular está comprendida preferiblemente entre $2,5 \times 10^5$ Da y 4×10^6 Da. De acuerdo con una variante particularmente preferida, esta masa molecular está comprendida entre 1×10^6 Da y 3×10^6 Da. Alternativamente, la masa molecular está comprendida entre 1×10^6 Da y $2,5 \times 10^6$ o $2,5 \times 10^5$ Da y 3×10^6 Da.

30 La hidroxiapatita es una especie mineral de la familia de los fosfatos de fórmula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, generalmente escrita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para poner de relieve el hecho de que la malla de la estructura cristalina comprende 2 moléculas. La hidroxiapatita forma parte de la familia cristalográfica de las apatitas, compuestos isomorfos que poseen la misma estructura hexagonal. Este compuesto se ha utilizado como biomaterial durante muchos años en diversas especialidades médicas.

35 La presente invención comprende en general una concentración de partículas de hidroxiapatita comprendida entre 5 a 60% (masa/volumen), preferiblemente entre 10 a 50% (masa/volumen), preferiblemente entre 20 a 40% (masa/volumen) y el tamaño promedio de las partículas de hidroxiapatita es inferior o igual a 200 μm , preferiblemente inferior a 50 μm , preferiblemente superior a 10 μm .

40 Se ha observado que las propiedades de viscosidad y elasticidad de la formulación de acuerdo con la invención son óptimas cuando el parámetro Tan delta o Tan δ , correspondiente a la relación [módulo viscoso G'' /módulo elástico G'] a una frecuencia de 1 Hz, es inferior o igual a 0,60, preferiblemente inferior o igual a 0,58. De hecho, se ha mostrado que el carácter elástico de la formulación de acuerdo con la invención, con respecto a su viscosidad, debe ser suficientemente importante para poder evitar la sedimentación de las partículas hidroxiapatita. Por lo tanto, se ha observado que por encima de 0,60, las partículas de hidroxiapatita tienen tendencia a sedimentarse con el curso del tiempo. Esta sedimentación implica la obtención de una formulación a base de partículas de hidroxiapatita no homogénea, lo que no es satisfactorio por una parte para el acto de inyección de la formulación a través de la aguja (obstrucción de la aguja) y por otra parte para la seguridad y el rendimiento de la formulación a nivel de la zona de inyección (por ejemplo, creación de las zonas denominadas duras en los tejidos de la piel).

45 En general, la medición de la elasticidad (G') y la relación entre la viscosidad y la elasticidad (Tan delta = G''/G') se lleva a cabo mediante la realización de un barrido a una frecuencia de 0,01 a 100 Hz con ayuda de un reómetro con una geometría plana de 40 mm, una separación de 1000 micrómetros y una temperatura de análisis de 25°C.

Como se muestra en el ejemplo 2, la capacidad de cohesión de la formulación de acuerdo con la invención es un elemento importante, pero también es necesario que el carácter viscoelástico de este sea apropiado con el fin de:

- evitar la sedimentación con el curso del tiempo de las partículas de hidroxiapatita dentro de su envase, y
- 55 — evitar tener un producto que se va a separar en dos fases (partículas de hidroxiapatita y gel de ácido hialu-

rónico reticulado) durante la inyección y/o a nivel de la zona de inyección, creando de este modo heterogeneidades a nivel de la zona tratada.

- La invención también tiene como objetivo proporcionar una mayor duración con el curso del tiempo en comparación con las formulaciones de la técnica anterior. Esta mejora de la duración del efecto estético se consigue gracias a la capacidad del ácido hialurónico reticulado para mantener a largo plazo las partículas de hidroxiapatita en la zona de la inyección, y de las partículas de hidroxiapatita para conferir propiedades mecánicas/reológicas notables a largo plazo. Por lo tanto, la necesidad de renovar las inyecciones con la formulación de acuerdo con la invención será menos frecuente, siendo la ganancia en duración clínica probablemente de varios meses.
- También es importante precisar que la presencia de las partículas de hidroxiapatita, radiopacas, brinda un beneficio al gel ya que el médico lo puede localizar fácilmente a través de una radiografía durante y/o después de la inyección.
- Por otro lado, la capacidad de las partículas de hidroxiapatita para estimular la producción endógena de colágeno es un elemento importante de la invención. La reabsorción lenta del producto en los tejidos estará acompañada por una producción de colágeno (creación de volumen y de elasticidad), que permitirá participar en el rendimiento del tratamiento a largo plazo.
- La posibilidad que se ofrece al profesional de inyectar una solución de hialuronidasas para efectuar correcciones de su inyección y degradar el ácido hialurónico reticulado que compone el producto, confiere también una ventaja a la invención. Esta inyección, sin embargo, no permite acelerar la reabsorción de las partículas de hidroxiapatita: por lo tanto, no hay una degradación completa del producto dentro de los tejidos.
- La presente invención, por lo tanto, consiste en una formulación tal como se ha descrito anteriormente, que se utiliza para el relleno y/o la restauración de volúmenes y/o la sustitución de tejidos biológicos, en particular i) la restauración de los volúmenes del rostro (mejillas, mentón, pómulos, sienes,...), ii) la restauración de los volúmenes del cuerpo (nalgas, senos, manos...), iii) la restauración de los volúmenes del rostro en pacientes con VIH que padecen lipodistrofia facial.
- La formulación de acuerdo con la invención se utiliza generalmente tal como se presenta, pero no se excluye que se le añada al menos otro aditivo (además de los mencionados anteriormente) y/o al menos un principio activo.
- De forma ventajosa, la formulación de acuerdo con la invención es una "formulación lista para usar", ya que el profesional no tiene que mezclar él mismo el ácido hialurónico reticulado y una solución de hidroxiapatita, justo antes su inyección.
- Por lo tanto, la formulación puede comprender además uno o varios materiales cerámicos. Estos materiales se seleccionan generalmente entre el grupo que comprende fosfato tricálcico, carbonato de calcio y sulfato de calcio, o una combinación de varios de sus materiales cerámicos.
- La formulación de acuerdo con la invención también puede comprender además uno o varios anestésicos, seleccionados a partir del grupo que comprende lidocaína sola o en combinación con adrenalina, procaína, etidocaína sola o en combinación con adrenalina, articaína sola o en combinación con adrenalina, mepivacaína, pramocaína, quinisoocaína, o una o varias sales de estos anestésicos. De acuerdo con una variante particularmente preferida, el anestésico seleccionado es clorhidrato de lidocaína. La presencia de un anestésico en la formulación de acuerdo con la invención presenta un gran interés para mejorar el bienestar del paciente durante y después de la inyección.
- De acuerdo con otro modo particular de la invención, la formulación de acuerdo con la invención puede comprender también, además, uno o varios antioxidantes como los antioxidantes de la familia de los polioles. El antioxidante se podrá seleccionar entre el grupo de los polioles que comprenden sorbitol, glicerol, manitol o propilenglicol.
- De acuerdo con otro objeto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una formulación acuosa estéril inyectable que comprende las etapas que consisten en: a) preparar una primera mezcla que comprende al menos 1% a 4% en peso de ácido hialurónico reticulado o una de sus sales, mediante la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de dicho biopolímero con ayuda de moléculas bifuncionales o polifuncionales, en donde la reticulación llevada a cabo permite obtener un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva, b) purificar dicha primera mezcla, c) a continuación, añadir hidroxiapatita a una concentración comprendida entre 5% a 60% (masa/volumen) mediante la dispersión de manera homogénea en el gel a base de ácido hialurónico reticulado, d) adecuar el gel obtenido de este modo a una forma lista para usar, e) esterilizar el producto con calor húmedo.
- La esterilización de la formulación de acuerdo con la etapa e) se lleva a cabo con calor húmedo. El experto en la técnica sabrá seleccionar un ciclo de esterilización con calor (temperatura y duración del ciclo de esterilización) adecuado para la esterilización de su producto. Por ejemplo, se pueden utilizar los siguientes ciclos de esterilización con calor húmedo: 131°C, 1 min / 130°C, 3 min / 125°C, 3 min / 121°C, 7 min / 121°C, 20 min.
- De acuerdo con otro objeto, la presente invención se refiere a un kit, que se presenta preferiblemente en forma de una jeringa que contiene la formulación tal como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también se refiere igualmente a un kit en forma de un envase diferente de una jeringa, tal como una ampolla o un frasco que contiene la formulación tal como se ha descrito anteriormente.

El inventor ha mostrado en los siguientes ejemplos que la formulación de acuerdo con la invención a base de AH reticulado debe poseer propiedades específicas, en particular, capacidad de cohesión. Si este no es el caso (véanse los ejemplos con el AH no reticulado o con un AH reticulado que no tiene la estructura reivindicada), las partículas de hidroxiapatita no se mantienen correctamente dentro de la matriz y por lo tanto pueden difundir de forma relativamente fácil fuera del gel, lo que implica una pérdida de volumen en la zona tratada (es decir, una pérdida de eficacia) y posibles complicaciones debido a que esta migración causa problemas de seguridad.

La invención se ilustra ahora de una manera no limitativa, con los siguientes ejemplos 1 a 4:

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de un gel a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada cohesiva

Etapas 1: 3,5 g de hialuronato sódico de peso molecular 2,6 MDa se añadieron a hidróxido de sodio al 1% (30,5 g). La mezcla se homogeneiza durante 1 h 30 minutos. Se añaden 420 mg de éter butanodiol-diglicidílico (BDDE) a la mezcla que se homogeneiza, se cierra y después se coloca en un baño de agua a 50°C durante 2 h. Después, la mezcla se neutraliza mediante la adición de 7,5 g de HCl 1 N.

El gel se purifica mediante diálisis durante 24 horas con una solución fisiológica isosmolar y que posee un pH neutro (celulosa regenerada, límite de separación: masa molecular = 60 kDa) con el fin de obtener una concentración de ácido hialurónico de 25 mg/ml (2,5%). A continuación se homogeneiza en un mezclador convencional de paletas durante 1 h 30 minutos (= gel A1 / 124 g).

El gel se puede desgasificar finalmente, se coloca en jeringas de vidrio de 2 ml y se esteriliza en un autoclave de vapor a 130°C durante 3 minutos (= gel A / gel viscoelástico de estructura denominada cohesiva o monofásica).

Etapas 2: preparación del gel de acuerdo con la invención. En 100 g de gel A1 se añaden 42,9 g de hidroxiapatita fosfocálica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, cuyas partículas tienen una granulometría promedio comprendida entre 30 y 50 micrómetros y luego se homogeneiza el gel en un mezclador convencional de paletas durante 1 h 30 minutos (= gel B1 / 142,9 g).

El gel se puede desgasificar finalmente, se coloca en jeringas de vidrio de 2 ml y se esteriliza en un autoclave de vapor a 130°C durante 3 minutos (= gel B).

El gel es viscoelástico cohesivo en partículas. De hecho, este se presenta en forma de un gel viscoelástico (tiene propiedades de elasticidad G' y de viscosidad G'' / véase más abajo), y posee una gran capacidad de cohesión (véase el Ejemplo 2) y contiene partículas de hidroxiapatita. La concentración de ácido hialurónico del gel es de 17,5 mg/ml (1,75%) (prueba con carbazol, método de la Farmacopea Europea). Por otro lado, el pH (7,15) y la osmolaridad (315 mOsm/kg) del gel son fisiológicos.

El gel es fácilmente inyectable a través de una aguja: se requiere una fuerza de 26,3 N para empujar el gel a través de una aguja de 21G 1 1/2, considerando una velocidad de empuje de 12,5 mm/minuto.

Los geles A y B se caracterizan desde el punto de vista mecánico/reológico: el reómetro utilizado para llevar a cabo esas caracterizaciones es un AR2000 (TA Instruments) con una geometría plana de 40 mm, una separación de 1000 micrómetros y una temperatura análisis de 25°C.

Una medida de la elasticidad (G') y de la relación entre la viscosidad y la elasticidad ($\text{Tan delta} = G''/G'$) se lleva a cabo mediante la realización de un barrido a una frecuencia de 0,01 a 100 Hz. Una comparación de los parámetros se realiza a 1 Hz.

Gel	G' (1 Hz) en Pa	Tan delta (1 Hz)
A	184	0,25
B	381	0,29

Se constata que el producto B posee una elasticidad significativamente mayor que el producto A. La Tan delta de los 2 productos A y B, por su parte, es relativamente cercana: el gel B conserva un carácter viscoso importante, a pesar de la presencia de partículas de hidroxiapatita (que tienen una gran elasticidad y una viscosidad despreciable). Esta mayor elasticidad, en combinación con la fuerte capacidad de cohesión del producto de acuerdo con la invención, proporciona al producto una capacidad mejorada para crear volumen en los tejidos.

Una medición de la fuerza normal inducida por el gel que se va a someter a ensayo se lleva a cabo mediante una compresión de la muestra entre el plano de Peltier y la geometría para un espacio de 1500 micrómetros y una cantidad de gel de 1,4 g.

Gel	Fuerza normal (N)
A	0,86
B	1,47

- 5 Se constata que el producto B posee una elasticidad y una fuerza normal inducida significativamente mayor que el producto A.

Esta mayor elasticidad, en combinación con la gran capacidad de cohesión del gel de acuerdo con la invención, proporciona una mejor capacidad del producto para crear volumen en los tejidos.

Ejemplo 2

10 *Importancia de la estructura denominada cohesiva del gel a base de AH reticulado - Comparativo*

El gel A1 (de estructura denominada cohesiva o monofásica) descrito en el ejemplo 1, se dializa frente a una solución fisiológica isosmolar y que posee un pH neutro (celulosa regenerada, límite de separación: masa molecular = 60 kDa) con el fin de obtener una concentración de ácido hialurónico de 20 mg/ml (2%).

- 15 A continuación se añade hidroxiapatita de calcio en el gel con el fin de obtener una concentración de 200 mg/ml (20%) y después se realiza una mezcla con espátula (2 minutos para 5 g de gel).

El gel así obtenido se esteriliza a continuación en un autoclave a 121°C durante 20 minutos (= gel B' de acuerdo con la invención).

- 20 El gel comercial Restylane® Perlane® (lote 11363-1) a base de ácido hialurónico reticulado de estructura denominada no cohesiva o bifásica, cuya concentración de ácido hialurónico es de 20 mg/ml (2%) se dopa con 200 mg/ml (20%) de hidroxiapatita de calcio mediante mezclado con una espátula (2 minutos para 5 g de gel).

El gel así obtenido se esteriliza a continuación en un autoclave a 121°C durante 20 minutos (= gel X).

El gel A1 y el gel Restylane® Perlane® se comparan de acuerdo con el siguiente ensayo:

- 25 En frascos de plástico de 30 ml que contienen 5 ml de agua purificada, se introduce 1 ml de gel A1 en el frasco 1 y 1 ml de gel Restylane® Perlane® en el frasco 2. Después de cerrar los frascos, se mezclan manualmente los 2 frascos durante 5 segundos.

Después de 10 segundos, se observa que el gel Restylane® Perlane® se ha disgregado/dispersado completamente en forma de una multitud de partículas en la solución acuosa. Por lo tanto, el gel Restylane® Perlane® tiene una estructura denominada no cohesiva o bifásica (el gel se dispersa rápidamente en la solución acuosa).

- 30 El gel A1, todavía está en forma de una "bola de gel" en la solución acuosa. Por lo tanto, tiene una estructura denominada cohesiva o monofásica (el gel no se dispersa rápidamente en la solución acuosa, tiene una alta capacidad de cohesión, a diferencia del gel Restylane® Perlane®).

- 35 El gel B' de acuerdo con la invención y el gel X se comparan mediante el ensayo siguiente (véase la figura 1): en frascos de plástico de 30 ml que contienen 5 ml de agua purificada, se introduce 1 ml de gel B' en el frasco 1 y 1 ml de gel X en el frasco 2. Después de cerrar los frascos, se mezclan manualmente los dos frascos durante 5 segundos. Después de 10 segundos, se observa que el gel X se ha disgregado/dispersado completamente en forma de una multitud de partículas en la solución acuosa. El gel X tiene una estructura viscoelástica no cohesiva en partículas. No se corresponde con las características del gel de acuerdo con la invención. En la práctica médica para uso en estética, este se difundirá/migrará a nivel de la zona de inyección.

- 40 El gel B', por su parte, está todavía en forma de una 'bola de gel' en la solución acuosa. Por lo tanto, posee o bien una estructura cohesiva en partículas que permitirá, en el contexto de la práctica médica, un uso en estética, que no se difunda/migre a nivel de la zona de inyección y de este modo evitar las complicaciones ligadas a la migración de partículas de hidroxiapatita en los tejidos, pero también que tenga un mejor rendimiento a largo plazo del producto, porque el gel inyectado va a poder ser capaz de mantener su capacidad para crear volumen en los tejidos durante un largo período de tiempo, debido a la ausencia de migración del biomaterial de la zona tratada.

45 Ejemplo 3

Importancia de la viscoelasticidad del gel de acuerdo con la invención - Comparativo

C es un gel preparado según el mismo protocolo (etapas 1 y 2) que el descrito en el ejemplo 1 mediante la introducción de 200 mg de BDDE en lugar de 420 mg.

D es un gel preparado según el mismo protocolo (etapas 1 y 2) que el descrito en el ejemplo 1 mediante la introducción de 290 mg de BDDE en lugar de 420 mg.

- 5 El gel C se caracteriza desde un punto de vista mecánico/reológico.

El reómetro utilizado para realizar las caracterizaciones reológicas es un AR2000 (TA Instruments) con una geometría plana de 40 mm, una separación de 1000 micrómetros y una temperatura de análisis de 25°C.

Una medida de la relación entre la viscosidad y la elasticidad ($\tan \delta = G''/G'$) se lleva a cabo mediante la realización de un barrido a una frecuencia de 0,01 a 100 Hz.

- 10 Una comparación de los parámetros se lleva a cabo a 1 Hz.

Gel	$\tan \delta = G''/G'$ (1 Hz)
A	0,84
B	0,58

Se constata que las partículas de hidroxiapatita tienden a sedimentarse con el paso del tiempo (fenómeno bien observado mediante el paso de una muestra por la centrifuga) en el gel C, lo que no se observa en el gel D.

- 15 Esta sedimentación implica la obtención de productos a base de partículas de hidroxiapatita no homogénea, lo que no es satisfactorio para el acto de inyectar el gel a través de la aguja (obstrucción de la aguja), pero también para la seguridad y el rendimiento del producto a nivel de la zona de inyección (riesgos importantes de complicaciones tales como la creación de las zonas denominadas duras en los tejidos de la piel).

Como se muestra en el ejemplo 2, la capacidad de cohesión del gel de acuerdo con la invención es importante, pero también es necesario que el carácter viscoelástico del mismo sea apropiado con el fin de:

- 20
- evitar la sedimentación en el curso del tiempo de partículas de hidroxiapatita en el seno de su envase
 - evitar tener un producto que se va a separar en 2 fases (partículas de hidroxiapatita y gel de ácido hialurónico reticulado) durante la inyección y/o a nivel de la zona de inyección, creando de este modo heterogeneidades a nivel de la zona tratada.

- 25 El carácter elástico del gel (con respecto a su viscosidad) debe ser suficientemente importante para poder evitar la sedimentación de las partículas.

Ejemplo 4

Comparación de un gel de acuerdo con la invención con las soluciones de la técnica anterior

a) Formulación a base de AH no reticulado e hidroxiapatita

- 30 Como se ha descrito en las publicaciones, *in vivo*, el ácido hialurónico no reticulado tiene una semivida inferior a una semana.

Por lo tanto, una solución de AH no reticulado con hidroxiapatita no es interesante debido a que el ácido hialurónico no reticulado será reabsorbido muy rápidamente y no permitirá evitar la migración de las partículas de hidroxiapatita a largo plazo.

b) Formulación acuosa de hidroxiapatita

- 35 Se preparó una solución acuosa de hidroxiapatita (S1) (30% de hidroxiapatita fosfocálcica que tiene una granulometría comprendida entre 30 y 50 micrómetros en una solución fisiológica isosmolar y que tiene un pH neutro).

En un frasco de plástico de 30 ml que contiene 5 ml de agua purificada, se introduce 1 ml de la solución S1. Se observa una dispersión inmediata de las partículas de hidroxiapatita en el frasco.

- 40 A diferencia de la formulación de acuerdo con la invención, la solución S1 no es capaz de mantener las partículas de hidroxiapatita a nivel de la zona de inyección a largo plazo.

c) Formulación a base de CMC e hidroxiapatita (véase la Figura 1).

Una formulación acuosa de carboximetilcelulosa (CMC) e hidroxiapatita (S3) se prepara (30% de hidroxiapatita fos-

focálica que tiene una granulometría entre 30 y 50 micrómetros, y 2% de CMC a 250 000 Da en solución fisiológica isosmolar y que tiene un pH neutro).

En un frasco de plástico de 30 ml que contiene 5 ml de agua purificada, se introduce 1 ml de la solución S3. Después de cerrar el frasco, este se mezcla manualmente durante 5 segundos.

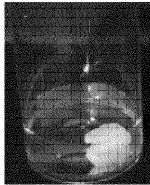
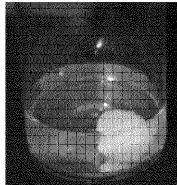
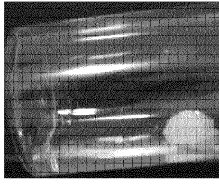
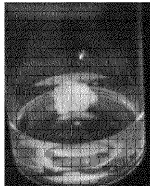
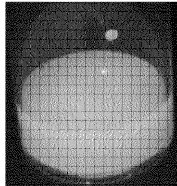
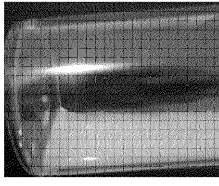
- 5 Después de 10 segundos, se observa que la formulación S3 se ha disgregado/dispersado completamente en forma de una multitud de partículas en la solución acuosa.

A diferencia de la formulación de acuerdo con la invención, la solución S3 no es capaz de mantener las partículas de hidroxiapatita a nivel de la zona de inyección a largo plazo.

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n acuosa est3ril inyectable utilizada para fines est3ticos, en forma de gel viscoel3stico cohesivo en part3culas que comprende
 - i) 3cido hialur3nico reticulado o una de sus sales, a una concentraci3n comprendida entre 1% a 4% (masa/volumen); en donde la reticulaci3n llevada a cabo permite la obtenci3n de un gel a base de 3cido hialur3nico reticulado de estructura denominada cohesiva, e
 - ii) hidroxiapatita a una concentraci3n comprendida entre 5% a 60% (masa/volumen), en donde dicha hidroxiapatita est3 en forma de part3culas de tama1o promedio inferior o igual a 200 μm ;
 poseyendo dicha formulaci3n acuosa est3ril inyectable propiedades viscoel3sticas tales que $\text{Tan } \delta$ a una frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60.
2. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque la masa molecular del 3cido hialur3nico o de una de sus sales, est3 comprendida entre $2,5 \times 10^5$ Da y 4×10^6 Da.
3. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque la formulaci3n se ha esterilizado con calor h3medo.
4. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la concentraci3n de 3cido hialur3nico reticulado, o de una de sus sales, est3 comprendida entre 1% a 3% (masa/volumen), preferiblemente entre 1,5% a 2,5% (masa/volumen).
5. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la concentraci3n de hidroxiapatita est3 comprendida entre 10 a 50% (masa/volumen), preferiblemente entre 20% a 40% (masa/volumen).
6. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque el tama1o promedio de las part3culas de hidroxiapatita es inferior o igual a 50 μm y superior o igual a 10 μm .
7. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la formulaci3n comprende adem3s uno o varios materiales cer3micos.
8. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la formulaci3n comprende adem3s uno o varios anest3sicos, preferiblemente seleccionados a partir del grupo que comprende lidoca3na sola o en combinaci3n con adrenalina, proca3na, etidoca3na sola o en combinaci3n con adrenalina, artica3na sola o en combinaci3n con adrenalina, mepivaca3na, pramoca3na, quinisoca3na, o una o varias de las sales de estos anest3sicos.
9. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 8, caracterizada porque el anest3sico es clorhidrato de lidoca3na.
10. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la formulaci3n comprende adem3s uno o varios antioxidantes.
11. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n la reivindicaci3n 10, caracterizada porque uno o varios antioxidantes se seleccionan entre la familia de los polioles y preferiblemente se seleccionan entre el grupo que comprende sorbitol, glicerol, manitol o propilenglicol.
12. La formulaci3n acuosa est3ril inyectable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, utilizada para el relleno y/o la restauraci3n de vol3menes y/o la sustituci3n de tejidos biol3gicos.
13. Kit que contiene la formulaci3n acuosa est3ril inyectable, seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Kit seg3n la reivindicaci3n 13, que se presenta en forma de jeringa, ampolla o frasco.
15. Procedimiento para la preparaci3n de una formulaci3n acuosa est3ril inyectable que comprende las etapas que consisten en: a) preparar una primera mezcla que comprende al menos 1% a 4% en peso de 3cido hialur3nico reticulado o una de sus sales, mediante la formaci3n de enlaces covalentes entre las cadenas de dicho biopol3mero con ayuda de mol3culas bifuncionales o polifuncionales, en donde la reticulaci3n efectuada permite obtener un gel a base de 3cido hialur3nico reticulado de estructura denominada cohesiva, b) purificar dicha primera mezcla, c) a continuaci3n, a1adir hidroxiapatita a una concentraci3n comprendida entre 5% a 60% (masa/volumen) en la dispersi3n de manera homog3nea en el gel a base de 3cido hialur3nico reticulado, d) adecuar el gel obtenido de este modo en una forma lista para el uso, e) esterilizar el producto con calor h3medo, en donde dicha formulaci3n acuosa est3ril inyectable posee propiedades viscoel3sticas tales que $\text{Tan } \delta$ a una frecuencia de 1 Hz es inferior o igual a 0,60.

Fig. 1

Producto analizado	Observación antes de agitar	Observación inmediatamente después de agitar	Observación después de los 10 segundos siguientes a la agitación
Gel B' De acuerdo con la invención (ejemplo 2)			
Gel X (ejemplo 2)			
Formulación a base de CMC e hidroxiapatita (ejemplo 4)		