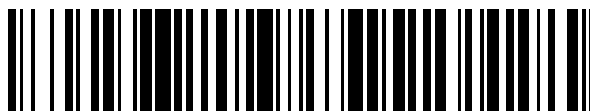


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 360**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/722** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2007.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61L 27/20** (2006.01)  
**A61L 27/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015** **E 16203835 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018** **EP 3156059**

54 Título: **Composición termogelificable esterilizada**

30 Prioridad:

**01.08.2014 FR 1457546**

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

**17.10.2018**

73 Titular/es:

**KIOMED PHARMA (100.0%)**  
**Rue Haute Claire 4**  
**4040 Herstal, BE**

72 Inventor/es:

**CHAUSSON, MICKAËL y**  
**LECLER, RENAUD**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 686 360 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

Composición termogelificable esterilizada.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a una composición termogelificable esterilizada. Más particularmente, la presente invención se refiere a dicha composición esterilizada con vapor, y a un procedimiento de esterilización para preparar dicha composición, y a sus usos, particularmente en el campo médico o para inyección en el cuerpo humano o animal.
- 10 **[0002]** Se recomienda esterilizar equipos, muestras y otros dispositivos que deban estar en contacto con el cuerpo humano o animal. Para lograr tal esterilización industrial, es ventajoso esterilizar con vapor.
- [0003]** Sin embargo, en varios casos específicos, la esterilización con vapor no es adecuada. Entre estos se incluyen casos donde los elementos a esterilizar no admiten un aumento de la temperatura, la presencia de vapor de  
15 agua, o casos donde el elemento esterilizado pueda modificarse por las condiciones de esterilización dejando de ser adecuado para su uso en la aplicación prevista.
- [0004]** Se conoce a partir de la patente EP 2 361 640 que las composiciones termogelificables basadas en quitosano no son esterilizables con vapor, en particular, porque dicha esterilización influye en la estructura y las  
20 propiedades funcionales del hidrogel y, por lo tanto, en la capacidad de la composición para gelificar o volver a su forma original y fluida. Por lo tanto, no es aconsejable llevar a cabo dicha esterilización con vapor para esterilizar un hidrogel de quitosano y sus derivados. Jarry *et al.* (Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. (Efectos de la esterilización con vapor en geles termogelificantes basados en quitosano) J Biomed Mater Res (Appl Biomater), 2011, 58, 127-135) enseñan a preesterilizar una solución de quitosano y luego añaden los otros  
25 compuestos del hidrogel, como beta-glicerol fosfato de sodio, también esterilizados por separado. Este procedimiento de esterilización no afecta al producto final y requiere la mezcla aséptica de las soluciones, lo que no es ventajoso desde el punto de vista industrial. Se desaconseja adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N.º 6.344.488 esterilizar con vapor una composición de quitosano termogelificable dado que el gel es sensible al calor. La solución de quitosano se esteriliza de este modo con vapor de agua antes de la adición del agente gelificante.  
30 Chengdong Ji *et al.* han descrito la esterilización de quitosano en presencia de fosfato de glicerol (hidrogeles de quitosano sin esterilización para la liberación controlada de fármacos, Materials Letters, 2012, 72, 110-112), pero no se ha estudiado ninguna propiedad mecánica. No es posible saber si los geles de quitosano así esterilizados pueden usarse de otra manera que no sea como un vector de drogas, especialmente cuando se buscan propiedades reológicas y/o mecánicas particulares. Jarry *et al.* (Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: effect on  
35 thermogelling chitosan- $\beta$ -glycerophosphate systems, (Tratamiento de soluciones de quitosano/poliol mediante irradiación o autoclave: efecto sobre los sistemas de quitosano- $\beta$ -glicerofosfato termogelificante), Chem Pharm Bull, 2002, 50 (10), 1335 -1340) también investigaron el efecto de la esterilización con vapor de geles de quitosano. Sugieren un poder beneficioso de algunos polioles. Los valores de pH de tales composiciones termogelificables son inferiores a 7,2. Finalmente, la Patente de Estados Unidos N.º 6.344.488 afirma que la transición sol-gel de tales  
40 composiciones termogelificantes ("termogeles") de quitosano es irreversible a un pH superior a 6,9. Estos termogeles, cuya transición de sol-gel es irreversible, tienen el inconveniente práctico de no poder esterilizarse aumentando la temperatura o el vapor para que las composiciones no se gelifiquen antes de su uso, lo cual supone una desventaja importante.
- 45 **[0005]** La invención tiene como objetivo resolver estos problemas técnicos.
- [0006]** En particular, existe la necesidad de proporcionar una composición estéril termogelificable, gelificada a temperatura fisiológica de un ser humano o animal, que tenga buenas propiedades físicoquímicas para aplicaciones  
50 terapéuticas o estéticas.
- [0007]** El objeto de la invención es, particularmente, proporcionar una composición estéril termogelificable que pueda inyectarse fácilmente mientras se gelifica a la temperatura fisiológica de un ser humano. Tal composición estéril debe tener buenas propiedades físico-químicas para aplicaciones terapéuticas o estéticas, especialmente a una temperatura fisiológica de 37 °C. Más particularmente, tal composición estéril debería tener propiedades  
55 viscoelásticas que puedan modularse según la aplicación prevista para aproximarse tanto como sea posible a las propiedades necesarias para el propósito terapéutico o estético deseado.
- [0008]** La invención también pretende proporcionar una composición estéril termogelificable cuyo pH sea aceptable para aplicaciones terapéuticas o estéticas. Más particularmente, tales composiciones estériles deberían

poder tener un pH modulable según la aplicación prevista, en particular para estar lo más cerca posible del pH fisiológico.

**[0009]** La presente invención también pretende proporcionar una composición estéril termogelificable cuya osmolaridad se aproxime a la fisiológica para la aplicación terapéutica o estética deseada, en particular, una osmolaridad de 100 a 700 mosm/kg, y en particular de 200 a 500 mseg/kg (también escrito "mosmol/kg").

**[0010]** El objeto de la presente invención es también, alternativamente, proporcionar una composición estéril cuya transición sol-gel sea reversible, en particular, para que las condiciones de almacenamiento y/o transporte no requieran un control drástico de la temperatura, y/o que la composición pueda someterse a esterilización con vapor, o incluso a varios ciclos de esterilización con vapor.

**[0011]** Otro objeto de la invención es proporcionar una composición que pueda usarse como un viscosuplemento y, en particular, que se pueda inyectar en o mezclar con un líquido sinovial. El objeto, en particular, de la invención es proporcionar un líquido sinovial reconstruido, es decir, una composición que restablezca las propiedades de una articulación, en particular, proporcionándole la capacidad de absorber los golpes durante un movimiento y de poder lubricarse al menos en reposo.

**[0012]** El objeto de la invención es también proporcionar una composición que tenga buenas propiedades mezclada con un líquido sinovial y, en particular, con un líquido sinovial de un ser humano. Ventajosamente, el objeto de la invención es proporcionar una composición que presente una buena resistencia a la degradación en un entorno inflamatorio, en particular, en términos de conservación del módulo de elasticidad  $G'$  y la viscosidad en reposo.

**[0013]** La presente invención sorprendentemente hace posible resolver uno o más de los problemas mencionados anteriormente.

**[0014]** Se ha descubierto sorprendentemente que tal composición podría prepararse cuando esta composición comprenda un quitosano que tenga unidades de N-acetil-glucosamina, unidades de glucosamina y unidades de glucosamina sustituida distintas de las unidades de N-acetil-glucosamina, presentando dicho quitosano sustituido, preferiblemente, un grado de sustitución de las unidades de glucosamina que vaya de 10 a 50 %, expresado como el número de moles del sustituyente con respecto al número de moles de unidades totales.

**[0015]** Según una realización particular, las unidades de glucosamina son unidades de D-glucosamina (unidades de D-glucosamina, unidades de D-glucosamina sustituidas, unidades de N-acetil-D-glucosamina y unidades de N-acetil-D-glucosamina opcionalmente sustituidas).

**[0016]** Alternativamente, el quitosano tiene unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina, y opcionalmente de las unidades de N-acetil-D-glucosamina sustituidas.

**[0017]** Por "unidades de D-glucosamina sustituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina" se entiende que las unidades de D-glucosamina sustituidas no forman unidades de N-acetil-D-glucosamina después de la sustitución.

**[0018]** Según una variante, un quitosano sustituido tiene una sustitución de unidades de D-glucosamina solamente.

**[0019]** Según otra variante, un quitosano sustituido exhibe una sustitución de las unidades D-glucosamina y "N-acetil-D-glucosamina simultáneamente, y donde el grupo de sustitución está unido covalentemente, según una variante, a los grupos amino solo de quitosano, o, según otra variante, a los grupos amina e hidroxilo de quitosano simultáneamente.

**[0020]** Según una realización, el grado de sustitución de las unidades de D-glucosamina expresado como el número de moles de unidades de D-glucosamina en relación con el número de moles de unidades totales (unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, sustituidas o no sustituidas) del quitosano sustituido va de 0,1 a 0,5 %.

**[0021]** Se ha encontrado, según una variante específica, que un grado de sustitución de unidades de glucosamina, expresado como el número de moles de unidades de glucosamina donde el grupo sustituyente está

unido por un enlace covalente, en relación con el número total de moles de unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina del quitosano sustituido, de 0,1 a 0,5, permitió ventajosamente que el quitosano sustituido se solubilizara, opcionalmente en presencia de un agente gelificante, por ejemplo una sal de poliol o de azúcar, y más particularmente una sal de fosfato de glicerol, a un pH y a una temperatura en un rango particularmente adaptado a las aplicaciones específicas. Puede ser más sencillo expresar el grado de sustitución por la relación molar o la relación de masa de los reactivos de partida con respecto al quitosano, como se explica a continuación.

**[0022]** Según una variante, el quitosano sustituido es soluble por su grado de sustitución en una solución acuosa tamponada a pH 7, por ejemplo con un tampón de fosfato salino (PBS), comprendiendo la solución una concentración de quitosano sustituido del 1 % en masa con relación a la masa de la solución total, midiéndose el pH a 8 °C.

**[0023]** Según una variante, especialmente cuando el quitosano sustituido tiene un carácter zwitteriónico, existe un intervalo de pH estrecho donde el quitosano sustituido es insoluble. Esta característica se elude según la técnica anterior mediante la adición de un agente gelificante, por ejemplo sal de poliol o azúcar, y más particularmente sal de fosfato de glicerol, para que el quitosano sustituido se solubilice al pH considerado de interés para la invención.

**[0024]** Al sustituir el quitosano, ha sido posible preparar una solución de un quitosano sustituido soluble en una solución acuosa cuyo pH varía en un amplio intervalo, mientras que el quitosano no sustituido solo es soluble a un pH inferior a un intervalo que va de 5,5 a 6,5. La solución acuosa de quitosano sustituido generalmente puede tener un pH que vaya de 6,5 a 8,5. Esta solución según la invención puede gelificarse. Por lo tanto, la gelificación o la transición sol-gel pueden llevarse a cabo a pH neutro o a pH fisiológico, por ejemplo a un pH de entre 7 y 8,5, mientras que el quitosano no es soluble a pH 7, el pKa de los grupos amino es aproximadamente 5,5 (y por lo tanto no se carga a pH 7 al que los grupos amino no están protonados). El quitosano sustituido tiene así la capacidad de solubilizarse a diferentes niveles de pH en virtud de la presencia de grupos sustituyentes que modifican su perfil de solubilización. Sorprendentemente, ha sido posible preparar composiciones termogelificables con un quitosano sustituido y, en particular, a una baja concentración de quitosano, en particular, con un quitosano de masa molecular muy baja, baja o media, presentando una transición de sol-gel reversible o en la cual las propiedades del gel resultante se adecúan a las aplicaciones previstas, en particular, como viscosuplemento de un líquido sinovial. Dicha composición, que comprende un quitosano sustituido, presenta una transición sol-gel a medida que aumenta la temperatura. Por lo tanto, muy ventajosamente, la transición sol-gel, es decir la transición de la solución al estado fluido al estado gel, se puede modular según el grado de sustitución para que esta transición sol-gel se produzca en particular en las condiciones de pH, osmolalidad y temperatura deseadas. De este modo, la invención permite ventajosamente, según una variante, preparar una composición fluida termogelificable a una temperatura inferior a la del uso, típicamente a una temperatura por debajo de la temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, pero que esté en forma de gel a la temperatura de uso, típicamente a temperatura fisiológica, por ejemplo, 37 °C, a pH neutro (pH 7) o a pH fisiológico, y por ejemplo de 7 a 8,5, con una osmolalidad adecuada para el uso previsto. Esto es, por ejemplo, una osmolalidad fisiológica.

**[0025]** Según otra variante, la invención se refiere a una composición termogelificable, en forma de gel antes del uso, típicamente a temperatura ambiente, y por ejemplo a temperatura de almacenamiento (por ejemplo de 4 a 8 °C), y a una temperatura de uso, típicamente a temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, a pH neutro (pH 7) o a un pH fisiológico, y por ejemplo de 7 a 8,5, con una osmolalidad adecuada para el uso previsto. Esto es, por ejemplo, una osmolalidad fisiológica.

**[0026]** El término "composición termogelificable" o "termogel" significa un fluido y, especialmente, una solución que tiene la propiedad de experimentar una transición de sol-gel por modificación de la temperatura, preferiblemente al aumentar la temperatura, y más preferiblemente al aumentar la temperatura hasta la temperatura fisiológica del cuerpo humano o animal, y así aparecer en forma de gel a temperatura fisiológica después de la inyección o implantación. La composición termogelificable de la invención puede presentarse en forma de hidrogel, es decir, de gel acuoso.

**[0027]** Según la presente invención, el término "gel" significa una composición que no fluye por su propio peso y, más específicamente, que no muestra ningún flujo en ausencia de estímulos externos invirtiendo un recipiente que contenga la composición, por ejemplo durante 30 segundos, y caracterizada por un módulo de elasticidad  $G'$  superior al módulo de pérdida  $G''$ , midiéndose los módulos por reología usando un reómetro de geometría "Couette" o usando un reómetro con una geometría plana y un barrido en modo oscilatorio de baja amplitud (por ejemplo, el reómetro "Discovery Hybrid DHR-2" (TA Instrument)). La diferencia entre los módulos de

gel G' y G'' es característica de la cohesión del gel.

**[0028]** Según la presente invención, el término "fluido" significa una composición que fluye por su propio peso invirtiendo un recipiente que contenga la composición, por ejemplo, durante 30 segundos y caracterizada por un módulo de elasticidad G' inferior al módulo de pérdida G'', midiéndose los módulos por reología usando un reómetro de rotación de cizalla Couette (cizallamiento del fluido entre dos cilindros coaxiales).

**[0029]** Ventajosamente, se ha descubierto que el grado de sustitución de las unidades de D-glucosamina hace posible modular la transición sol-gel. En particular, se ha descubierto que el grado de sustitución de las unidades de D-glucosamina hace posible formar una composición termogelificable sin un agente gelificante, por ejemplo una sal de glicerol. Por lo tanto, la invención permite ventajosamente proporcionar una composición termogelificable donde se elige el grado mínimo de sustitución del quitosano de modo que el quitosano sustituido sea soluble en la composición termogelificable. También se puede verificar la solubilidad en diferentes tampones. Por "soluble en agua" se entiende que el quitosano sustituido no presenta un trastorno visible a simple vista. Más específicamente, la ausencia de turbidez se puede confirmar mediante una densidad óptica de menos de 0,5 y, preferiblemente, de menos de 0,2, medida por espectrometría UV-visible a una longitud de onda de 600 nm de una muestra que comprende agua opcionalmente tamponada con un tampón al pH correspondiente, por ejemplo, acetato de sodio 0,5 M, con referencia a un tanque de referencia que comprende solo el disolvente acuoso utilizado para la muestra medida, pero en ausencia del quitosano sustituido. Cuando el quitosano no está suficientemente sustituido, la composición no es soluble en un intervalo de pH satisfactorio, por ejemplo, que varía de pH=7 a pH=8,5, a temperatura ambiente, y por lo tanto no termogelificable al aumentar la temperatura.

**[0030]** La invención hace posible proporcionar una composición termogelificable donde se elige el grado máximo de sustitución del quitosano de modo que tenga lugar una transición sol-gel a una temperatura inferior a la temperatura de uso, preferiblemente por debajo de la temperatura fisiológica, por ejemplo a la temperatura de 37 °C. La transición sol-gel puede constatare por el crecimiento de los módulos G' y G'' según el método definido en la invención.

**[0031]** Ventajosamente, el grado de sustitución se determina por espectrometría de resonancia magnética (RMN) del protón en solución en un medio acuoso, usando un espectrómetro de resonancia magnética, por ejemplo un espectrómetro Bruker de frecuencia 400 MHz. Las muestras se preparan de la siguiente manera: se disuelven de 5 a 6 mg de quitosano sustituido en 1 ml de agua deuterada. Se añaden 2 µl de ácido clorhídrico deuterado de concentración 12M a la solución del quitosano sustituido para alcanzar un intervalo de pH adecuado para el análisis. El rango de pH apropiado depende de la naturaleza del sustituyente. El espectro se registra a una temperatura de 70 °C, con una cantidad de escaneos que van de 64 a 256 y un tiempo de relajación que varía de 1 a 8 segundos. El espectro obtenido se desconvoluciona para determinar el valor de la integral de las áreas de las señales de interés para calcular el grado de sustitución del quitosano sustituido.

**[0032]** El procedimiento de preparación de la muestra, las condiciones de registro del espectro de RMN y la fórmula utilizada para calcular el grado de sustitución deben adaptarse a cada tipo de quitosano sustituido, ya que dependen de la naturaleza y la posición del sustituyente.

**[0033]** Un ejemplo de cálculo del grado de sustitución (DS) se da a continuación para el caso del quitosano sustituido con un grupo succinilo unido al grupo amino de unidades de D-glucosamina (quitosano succinamida, Fórmula 1). Las abreviaturas son las siguientes:  $I_{H2}$  es igual a la integral del área de señal de protón de las unidades de D-glucosamina en la posición 2;  $I_{CH2\text{ succi}/2}$  es igual a la integral del área de señal de protón de los dos grupos -CH2 de los sustituyentes succinilo unidos a las unidades de D-glucosamina (en los átomos de carbono alfa y beta de la función amida);  $I_{CH3\text{ acetilo}}$  es igual a la integral del área de la señal de protones de los grupos acetilo de las unidades de N-acetil-D-glucosamina.

Un ejemplo de espectro de RMN del quitosano succinamida y la fórmula estructural del quitosano succinamida se ilustran en la FIG.

$$\%DS = \frac{I_{CH2\text{ succi}/2}}{I_{H2} + I_{CH2\text{ succi}/2} + I_{CH3\text{ acetilo}/3}}$$

**Formule 1-** Cálculo del grado de sustitución del quitosano sustituido con succinilo por RMN de protón

- [0034]** Si otro procedimiento de RMN es más adecuado para estimar el grado de sustitución de manera fiable, se debe usar dicho procedimiento. La fórmula anterior debe ser adaptada por los expertos en la técnica con respecto a la preparación de la muestra y las señales a integrar, en particular como una función de la resolución, la robustez y la posición de los protones de las señales a usar para el cálculo del grado de sustitución.
- [0035]** Ventajosamente, la composición tiene una transición de sol-gel termorreversible.
- [0036]** Ventajosamente, la presente invención hace posible proporcionar una composición con una baja concentración de quitosano sustituido.
- [0037]** Ventajosamente, la concentración de quitosano es inferior al 4 %, por ejemplo, inferior al 3 %, o incluso inferior al 2 % en masa con relación a la masa total de la composición (m/m).
- [0038]** Según una variante específica, la concentración de quitosano sustituido es inferior a 1,9 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final. Ventajosamente, la concentración de quitosano sustituido está entre 0,5 y 1,5 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final. Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente 1,2 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0039]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente 2,5 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0040]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente 2,0 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0041]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente 1,5 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0042]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente 1,3 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0043]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente 1,1 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0044]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente 1,0 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0045]** Según una variante particular, la concentración de quitosano sustituido es aproximadamente 0,9 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0046]** Además, el grado de sustitución de las unidades de D-glucosamina permite ventajosamente no utilizar una solución con un pH ácido (típicamente de 5,0 a 5,5) para solubilizar el quitosano y luego necesariamente tener que añadir una sal de azúcar o de poliol, como el fosfato de glicerol, para aumentar el pH hasta aproximadamente 7. Por el contrario, la presente invención permite ventajosamente preparar directamente una solución a pH neutro o a pH fisiológico, por ejemplo de 6,2 a 8,5, donde el quitosano sustituido es soluble y, por lo tanto, también tiene la ventaja, por ejemplo, de no precisar la adición de una solución ácida para solubilizar el quitosano. Esto tiene la ventaja de proporcionar una libertad mucho mayor en el intervalo de pH que se puede usar para la composición termogelificable, para preparar así composiciones termogelificables a pH neutro o fisiológico. Por ejemplo, un agente tampón puede ser un ácido o una base para ajustar el pH. Por ejemplo, es posible usar un tampón básico y luego ajustar con un ácido débil el pH de la composición termogelificable.
- [0047]** Según una variante ventajosa, la composición termogelificable no comprende un agente gelificante. Según esta variante, la composición termogelificable tiene la propiedad de gelificar por la mera presencia del quitosano sustituido. En particular, según esta variante, la composición no comprende un agente gelificante tal y como se define en la invención. En particular, según una variante preferida, la composición termogelificable de la invención no comprende una sal de glicerol y, en particular, ninguna sal de fosfato de glicerol (también escrita como

"glicerofosfato"). Esta variante permite evitar la presencia de fosfato de glicerol o de otro agente gelificante equivalente cuyo efecto técnico es únicamente mecánico sobre el gel. Según esta variante, se prefiere evitar compuestos tales como agentes gelificantes que no tienen beneficio terapéutico o interacción de naturaleza biológica/química con el cuerpo del sujeto tratado.

5

**[0048]** Según una variante, la composición comprende un agente gelificante, preferiblemente un agente gelificante que induce una transición sol-gel de la composición, por ejemplo una sal de fosfato de glicerol, por ejemplo en forma de sodio o calcio, por ejemplo en su forma pentahidratada, estando presente dicho agente gelificante preferiblemente en la composición a una concentración de entre 1 y 20 %, preferiblemente de entre 3 y 9

10 % en masa con relación a la masa total de la composición final (m/m).

**[0049]** El agente gelificante es ventajosamente al menos una sal de poliol o de azúcar, que incluye cualquiera de sus mezclas.

15 **[0050]** Entre las sales de poliol o de azúcar, se pueden mencionar especialmente las sales de fosfato y, más particularmente, las sales dibásicas de monohidrógeno de poliol o de azúcar. También pueden mencionarse sales de sulfato, por ejemplo, monoalfato de poliol o de azúcar. Entre las sales de fosfato que se pueden mencionar se incluyen monofosfatos dibásicos de glicerol, incluyendo glicerol-2-fosfato, sn-glicerol-3-fosfato y 1-glicerol-3-fosfato. Según una variante, es beta-glicerol fosfato. Entre los polioles y azúcares para dichas sales, se pueden citar los

20 polioles de azúcar siguientes: histidinol, acetol, dietilestilbestrol, indoleglicerol, sorbitol, ribitol, xilitol, arabinitol, eritritol, inositol, manitol, glucitol, palmitoil-glicerol, linoleoil-glicerol, oleoil-glicerol, araquidonol-glicerol, fructosa, galactosa, ribosa, glucosa, xilosa, ramnulosa, sorbosa, eritrolulosa, desoxi-ribosa, cetosa, manosa, arabinosa, fuculosa, fructopiranososa, cetoglucosa, sedoheptulosa, trehalosa, tagatosa, sacarosa, alosa, treosa, xilulosa, hexosa, metiltio-ribosa o metiltio-desoxi-ribulosa, o cualquiera de sus mezclas.

25

**[0051]** Según una variante específica, la concentración de sal de poliol o de azúcar y, preferiblemente, de glicerol está entre 1 y 10 %. Ventajosamente, la concentración de sal de poliol o de azúcar y, preferiblemente, glicerol está entre 1 y 7 %. Ventajosamente, la concentración de sal de poliol o de azúcar es de 2 % a 5 %. Los valores se expresan en masa con relación a la masa total de la composición.

30

**[0052]** Según una variante, la sal de glicerol es un fosfato de glicerol y, más específicamente, una sal de sodio, por ejemplo, fosfato de glicerol disódico.

35 **[0053]** El poliol o la sal de azúcar, y preferiblemente el fosfato de glicerol, se usan para llevar el pH a un pH básico; luego el pH de la composición se ajusta mediante la adición de un ácido, que tiene la ventaja de proporcionar una composición termogelificable cuyo pH es modulable de manera muy fácil y precisa.

**[0054]** Cuando la composición termogelificable no comprende un agente gelificante, el pH puede ajustarse mediante un ácido y, por ejemplo, un ácido orgánico débil o un ácido mineral fuerte (ácido clorhídrico). Un ácido

40 orgánico débil, por ejemplo, usado para ajustar el pH de la composición es el ácido acético o el ácido glutámico.

**[0055]** Por lo tanto, la composición según la invención tiene un pH mayor que o igual a 7, por ejemplo, mayor que o igual a 7,1 y, por ejemplo, un pH de 7,2 a 8,5.

45 **[0056]** El pH se mide en la composición termoformable final en forma de una solución, es decir, antes de la transición sol-gel. El pH se determina siguiendo el procedimiento descrito en la Farmacopea Europea (EP 2.2.3). El medidor de pH utilizado es un medidor de pH de la gama Sartorius con un electrodo de vidrio combinado (PY-P11). Las mediciones de PH se realizan entre 20 y 25 °C.

50 **[0057]** Ventajosamente, el pH es ajustable en el amplio rango de 6,5 a 8,0.

**[0058]** Según una variante, el pH es superior a 7,40.

**[0059]** Según una variante específica, el pH es 7,50 +/- 0,05.

55

**[0060]** Según otra variante específica, el pH es 7,20 +/- 0,05.

**[0061]** Según otra variante específica, el pH es 7,00 +/- 0,05.

**[0062]** Según una variante preferida, la composición de la invención tiene una transición de sol-gel a una temperatura superior a 30 °C, preferiblemente a una temperatura de entre 30 y 50 °C, y preferiblemente de entre 32 y 45 °C, y más preferiblemente de entre 35 y 40 °C.

5 **[0063]** Ventajosamente, la composición termogelificable de la invención se encuentra en forma fluida a temperatura ambiente, es decir, entre 20 y 25 °C.

**[0064]** Según una variante preferida, la composición de la invención es fluida a una temperatura inferior a 37 °C, preferiblemente a una temperatura inferior a 35 °C, y más preferiblemente a una temperatura de entre 2 °C y 20 °C. Según una variante, la composición de la invención es fluida a la temperatura de almacenamiento, por ejemplo de 2 a 8 °C, o a temperatura ambiente extendida, por ejemplo entre 15 y 30 °C.

15 **[0065]** Según una variante, la composición termogelificable de la invención es fluida a una temperatura superior a 0 °C y presenta forma de gel a una temperatura superior o igual a 10 °C. Según otra variante, la composición de la invención es fluida a una temperatura superior a 0 °C y presenta forma de gel a una temperatura superior o igual a 5 °C.

20 **[0066]** Según una realización, la composición tiene una osmolalidad de 100 a 700 mosm/kg, preferiblemente de 200 a 650 mosm/kg, por ejemplo de 200 a 600 mosm/kg, o por ejemplo de 200 a 550 mosm/kg, preferiblemente de 200 a 500 mosm/kg. La osmolalidad se puede expresar en mosm/L, pero se llama osmolaridad. Cuando es una composición acuosa, la densidad se aproxima a 1, la osmolalidad es sustancialmente igual a la osmolaridad, como para las composiciones de la invención.

25 **[0067]** Según una variante, la composición termogelificable según la invención es isoosmolar.

**[0068]** Según una variante, cuando se pretende inyectar la composición de la invención en el plasma de un ser humano, es preferible que la osmolalidad esté entre 250 y 400 y, más específicamente, entre 280 y 350 mosm/kg.

30 **[0069]** Según otra variante, cuando la composición de la invención está destinada a ser inyectada en el líquido sinovial de un ser humano, es preferible que la osmolalidad esté entre 300 y 490 y, preferiblemente, entre 360 y 470 mseg/kg.

35 **[0070]** La determinación de la osmolalidad de las soluciones se lleva a cabo con un microosmómetro automático (Osmometer Type 15M de Löser Messtechnik). El equipo está calibrado de antemano con una solución de 300 m<sup>3</sup>/kg. La muestra se coloca en un recipiente provisto para este fin y se coloca a la temperatura estándar de la medición.

40 **[0071]** Ventajosamente, la composición termogelificable de la invención tiene en su estado fluido una viscosidad dinámica aparente de entre 20 y 800 mPa.s, por ejemplo de 40 a 500 mPa.s.

45 **[0072]** La viscosidad aparente dinámica se mide utilizando un viscosímetro móvil giratorio, por ejemplo un viscosímetro móvil rotatorio de la marca Brookfield, por ejemplo, equipado con un husillo tipo S18 a una velocidad de 5 mm. giro/min. y a una temperatura de 8 °C.

50 **[0073]** Según una variante, la composición de la invención tiene una viscosidad aparente que permite una fácil inyección en un dispositivo de inyección tal como, por ejemplo, una jeringa, durante su llenado. Según una variante, la composición de la invención tiene una viscosidad aparente que permite una inyección fácil a través de una aguja fina, por ejemplo una jeringa de calibre 22, a temperatura ambiente. Inyección "fácil", significa preferiblemente que la fuerza que se ejerce sobre una jeringa de este tipo es de menos de 50 Newton para hacer fluir la composición termogelificable a través de una aguja de calibre 22, preferiblemente una fuerza de menos de 20 Newton.

55 **[0074]** La composición termogelificable según la invención puede diluirse, por ejemplo en agua, opcionalmente tamponada. Por ejemplo, la composición de la invención se puede diluir en un tampón que hace posible ajustar el pH a un pH fisiológico. Más particularmente, por ejemplo, la composición de la invención se puede diluir en un tampón de acetato (por ejemplo, un tampón trihidrato de acetato sódico 10 mM) para ajustar el pH a aproximadamente 7,5.

**[0075]** Para un gel, el módulo  $G'$  es mayor que  $G''$ . Para una solución, el módulo  $G'$  es menor que  $G''$ . La transición sol-gel se caracteriza por el cruce de los módulos  $G'$  y  $G''$ .

**[0076]** Cuando la solución tiene un carácter "termogelificable", el módulo  $G'$  se vuelve mayor que el módulo  $G''$  más allá de una cierta temperatura y, en particular, a una temperatura por debajo de la temperatura fisiológica (es decir, la temperatura a la que se inyecta o implanta el producto) o después de un cierto tiempo después de la implantación o inyección en el cuerpo a temperatura fisiológica.

**[0077]** El módulo  $G'$  y el módulo  $G''$  se cruzan cuando la temperatura aumenta.

**[0078]** Los módulos  $G'$  y  $G''$  se miden, por ejemplo, usando un reómetro de rotación de cizalla Couette que aplica un cizallamiento del fluido entre dos cilindros coaxiales, por ejemplo, un reómetro ARES de marca Rheometrics, por ejemplo con una frecuencia de 1 Hz y una deformación del 5 %. Es posible medir los módulos  $G'$  y  $G''$  a una determinada temperatura. La medida de los módulos proporcionada aquí se realiza a partir del producto a una cierta temperatura, por ejemplo, la temperatura de almacenamiento del producto 4 °C. Se deja que el producto alcance una cierta temperatura de forma natural, por ejemplo, la temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, sin controlar la velocidad a la que aumenta la temperatura.

**[0079]** Ventajosamente, el módulo de almacenamiento  $G'$  está entre 0,001 y 1000, el módulo de pérdida  $G''$  está entre 0,001 y 1000,  $G'$  es mayor que  $G''$  a temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, después de la gelificación.

**[0080]** Según una variante, ventajosamente, el módulo de almacenamiento  $G'$  está entre 0,001 y 1000, el módulo de pérdida  $G''$  está entre 0,001 y 1000,  $G'$  es menor que  $G''$  a temperatura de almacenamiento y/o a temperatura ambiente, y  $G'$  es mayor que  $G''$  a temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, después de la gelificación.

**[0081]** Ventajosamente, los módulos de almacenamiento  $G'$  y módulo de pérdida  $G''$  se cruzan entre sí cuando el producto pasa de una temperatura de almacenamiento en un refrigerador, por ejemplo 2 o 4 °C, o de una temperatura ambiente, por ejemplo de entre 18 °C a 25 °C, a una temperatura fisiológica, por ejemplo 37 °C, lo que refleja la transición sol-gel y la naturaleza termogelificable del sistema, con una duración de la transición sol-gel adecuada para la aplicación prevista.

**[0082]** La gelificación se puede lograr manteniendo la solución a una temperatura suficiente y durante un tiempo suficiente para gelificar la solución de quitosano. Esta gelificación se lleva a cabo, por ejemplo, en un horno que se mantenga, por ejemplo, a 40 °C. Según una variante, la composición termogelificable de la invención se presenta en forma de gel a una temperatura de 15 °C. Según la presente invención, la gelificación puede producirse in situ, es decir, por ejemplo, después de la inyección en el cuerpo humano o animal (sangre caliente). La gelificación permite que el gel se posicione de forma localizada.

**[0083]** Más particularmente, el tiempo requerido para la transición sol-gel es generalmente de entre 1 segundo y 48 horas después de pasar la temperatura de 2 a 4 °C (temperatura de almacenamiento) a 37 °C (temperatura fisiológica), es decir, por ejemplo, in situ después de inyectar la solución en un cuerpo humano o animal.

**[0084]** Según una variante, la transición sol-gel se completa después de una duración que va de 5 segundos a 24 horas, preferiblemente menos de 4 horas, más preferiblemente menos de 2 horas, después de pasar la temperatura de 2 o 4 °C a 37 °C.

**[0085]** Según otra variante, la gelificación ocurre instantáneamente (la gelificación ocurre tan pronto como la temperatura aumenta (y antes de la medición)).

**[0086]** Según una variante, la composición termogelificable está en forma gelificada. Por ejemplo, la composición de la invención se almacena en una jeringa en forma gelificada.

**[0087]** Según una variante, la composición no debe gelificarse en la jeringa de inyección sino in situ, en la ubicación deseada. Es posible llevar a cabo varios ciclos de transición sol-gel ya que la composición según la invención tiene ventajosamente una transición de sol-gel reversible. Esto permite ventajosamente esterilizar la composición según la invención elevando la temperatura, es decir, típicamente en autoclave. Esto permite ventajosamente proporcionar una composición termogelificable cuya posibilidad de obtener gelificación no se vea afectada por las variaciones de temperatura, en particular durante el almacenamiento, transporte o esterilización.

**[0088]** La composición según la presente invención está destinada en particular a ser inyectada, las propiedades de gelificación son adecuadas para su inyección a través de una jeringa con un tamaño de aguja variable en función de la aplicación prevista, por ejemplo de calibre 19 a 30, por ejemplo de calibre 22. Por lo general, la persona que pone la inyección debe presionar manualmente el émbolo de la jeringa. Por lo tanto, es necesario que la resistencia a la compresión del fluido no gelificado permita una inyección lo más fácil posible. Una vez inyectada, la composición debe gelificarse para exhibir las propiedades viscoelásticas requeridas.

**[0089]** Según una variante, la fuerza requerida para que fluya la composición fluida por el orificio de una aguja de calibre 22 es de entre 1 y 20 Newton. Preferiblemente, esta fuerza es de entre 2 y 15 Newton. Según una variante, esta fuerza es de entre 2 y 8 Newton.

**[0090]** Según una variante, la fuerza requerida para que fluya la composición fluida por el orificio de una aguja de calibre 25 es de entre 2 y 15 Newton. Según una variante, esta fuerza es de entre 2 y 10 Newton.

**[0091]** Según una variante, la fuerza requerida para que fluya la composición fluida por el orificio de una aguja de calibre 27 es de entre 1 y 20 Newton. Preferiblemente, esta fuerza es de entre 2 y 15 Newton. Según una variante, esta fuerza es de entre 2 y 10 Newton. La capacidad de inyección se mide utilizando un banco de pruebas para la medición de propiedades mecánicas, por ejemplo, de la marca Instron Bluehill, equipado con una célula de fuerza de 500N. El sistema de inyección está específicamente diseñado para medir la fuerza requerida para inyectar la solución empujando el émbolo de la jeringa, provisto de una aguja del diámetro deseado. El sistema tiene un cilindro de metal con una altura de 15 cm provisto de una ranura vertical de 4 cm de ancho. El cilindro está coronado por una placa de metal cuadrada de 10 cm de lado. Esta placa está provista de un agujero en el medio de un radio de 0,5 cm. La jeringa, equipada con una aguja de calibre 22, se lleva a una temperatura de 4 °C. Se aplica una tasa de descenso del émbolo de la jeringa constante de 1 mm por segundo.

**[0092]** Según una variante, la composición comprende un tampón, por ejemplo, un tampón de acetato o un tampón de fosfato.

**[0093]** Los agentes tamponantes son conocidos por los expertos en la técnica.

**[0094]** Preferiblemente, la composición comprende un azúcar reductor, por ejemplo manitol o sorbitol.

**[0095]** Según una variante, la presente invención se refiere a una composición termogelificable que comprende de 0,1 a 5 % en masa de quitosano sustituido, y preferiblemente de 1 a 7 % de sal de poliol o de azúcar, por ejemplo, fosfato de glicerol y, opcionalmente, de 0,1 a 10 % de azúcar reductor. Ventajosamente, la composición de la presente invención comprende de 0,1 a 1,9 % en masa de quitosano sustituido y de 2 a 6 % en masa de glicerol, preferiblemente fosfato de glicerol, y, opcionalmente de 0,1 a 2,5 % en masa de azúcar reductor, con relación a la masa total de la composición.

**[0096]** Según una variante, la presente invención se refiere a una composición termogelificable que comprende de 0,1 a 5 % y, preferiblemente, de 0,5 a 2,5 % en masa de quitosano sustituido, opcionalmente de 0,1 a 10 % de azúcar reductor, y opcionalmente de 0,1 a 5 %, y, preferiblemente, de 0,5 a 2,5 % de ácido hialurónico. Ventajosamente, la composición de la presente invención comprende de 0,1 a 2,5 % en masa de quitosano sustituido, opcionalmente de 0,1 a 2,5 % en masa de azúcar reductor y, opcionalmente, de 0,1 a 5 %, y preferiblemente de 0,5 a 2,5 %, de ácido hialurónico con respecto a la masa total de la composición, no presentando dicha composición, preferiblemente, glicerol ni sal glicerol.

**[0097]** Es ventajoso usar al menos un poliol en la composición de la invención (además de la sal de poliol, como el fosfato de glicerol, si está presente).

**[0098]** Dichos polioles pueden elegirse, por ejemplo, de entre el grupo formado por: isopropanol, sorbitol, manitol, alquilenol glicol tal como propilenglicol, poli(alquil glicol), por ejemplo, un poli(etilenglicol), fructosa, galactosa, ribosa, glucosa, xilosa, ramnulosa, sorbosa, eritrola, desoxi-ribosa, cetosa, manosa, arabinosa, fuculosa, fructopiranos, ketoglucose, sedoheptulosa, trehalosa, tagatosa, sacarosa, alosa, treosa, xilulosa, hexosa, metiltilio-ribosa, metiltilio-desoxi-ribulosa, y cualquiera de sus mezclas.

**[0099]** Según una variante específica, el reactivo que permite la sustitución es el anhídrido succínico. Según esta realización específica, el quitosano sustituido es succinamida quitosano, es decir quitosano con grupos

"succinilo" unidos covalentemente al átomo de nitrógeno de los grupos amino de las unidades de D-glucosamina.

**[0100]** El quitosano es modificado por sustitución en una reacción que implica un quitosano y un agente de sustitución donde el quitosano y el agente de sustitución se hacen reaccionar para obtener el quitosano sustituido en los grupos de D-glucosamina.

**[0101]** La invención también se refiere a un proceso para la preparación de quitosano sustituido.

**[0102]** Este proceso comprende en particular:

- una etapa de disolución del quitosano en una solución acuosa, preferiblemente agua, preferiblemente ajustando el pH a un pH ácido al que sea soluble el quitosano;
- una etapa de reacción de sustitución del quitosano con un agente de sustitución;
- una etapa de detención de la reacción de sustitución preferentemente a un grado de sustitución del quitosano del 10 al 50 %, expresado como el número de moles del sustituyente con respecto al número de moles de unidades totales, por ejemplo, cambiando el pH del medio reactivo, o por precipitación del quitosano en un "no disolvente" donde no sea soluble el quitosano sustituido;
- la purificación del quitosano sustituido.

**[0103]** El término "no disolvente" hace referencia a un disolvente en el cual no es soluble el quitosano, es decir que un trastorno es observable a simple vista. Dichos disolventes son, por ejemplo, los disolventes polares como, por ejemplo, etanol, metanol, acetona, etc.

**[0104]** La etapa de disolución del quitosano en una solución acuosa puede llevarse a cabo en agua añadiendo un ácido adecuado.

**[0105]** Durante la etapa de reacción, la cantidad de agente de sustitución puede adaptarse dependiendo del grado de sustitución deseado para el quitosano sustituido. En la etapa de reacción, el tiempo de reacción puede adaptarse dependiendo del grado de sustitución deseado para el quitosano sustituido. Ventajosamente, la reacción se detiene para terminar la reacción de sustitución del quitosano según el grado de sustitución deseado para el quitosano sustituido.

**[0106]** Se conocen diferentes reacciones para sustituir un quitosano. Se puede ver, por ejemplo, la solicitud WO 2010/142507, en particular en relación con la preparación de derivados de quitosano.

**[0107]** El quitosano sustituido puede comprender unidades de D-glucosamina y N-acetil-glucosamina, donde al menos algunas de las unidades estén injertadas (o acopladas) con uno o más grupos funcionales que pueden ser iguales o diferentes.

**[0108]** Según una variante, el quitosano sustituido comprende unidades de glucosamina y N-acetil-glucosamina que comprenden, a su vez, uno o más grupos funcionales. Las modificaciones químicas se realizan, por ejemplo, mediante el acoplamiento de una o más funciones de las unidades de N-acetil-glucosamina, es decir, las funciones hidroxilo y/o funciones amina, y/o unidades de glucosamina, es decir, funciones hidroxilo y/o funciones amina.

**[0109]** Según una realización particular, los grupos funcionales presentes en el quitosano sustituido se eligen de entre el grupo que incluye, sin límite, grupos funcionales hidrófobos y grupos funcionales hidrófilos, grupos funcionales iónicos, y cualquier combinación de los mismos. Según una variante particular, los grupos funcionales hidrófobos se eligen de entre el grupo formado por grupos alquilo, alquenilo, aralquilo y alcarilo, y cualquiera de sus combinaciones. Estos grupos generalmente comprenden entre 1 y 100 átomos de carbono, y más generalmente entre 1 y 50 átomos de carbono, por ejemplo entre 1 y 25, o entre 1 y 10 átomos de carbono, uno o más de los cuales pueden ser reemplazados por un heteroátomo y/o un átomo seleccionado de entre átomos de boro, nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio, germanio, un éster, amida, urea, uretano, y cualquiera de sus combinaciones, y donde uno o más átomos de hidrógeno pueden sustituirse por, por ejemplo, un heteroátomo y/o un átomo seleccionado de entre el grupo formado por átomos de halógeno, grupos alcoxi, amida y cualquier combinación de los mismos.

**[0110]** Según otra forma de realización, los grupos funcionales hidrófobos se seleccionan de entre el grupo formado por ácidos carboxílicos, ácidos organosulfónicos, poliéteres, poliéteres de amina, poliésteres, esteroides,

porfirinas y una combinación de los mismos.

**[0111]** Según otra variante, los grupos funcionales hidrófilos se seleccionan de entre el grupo formado por diaminas, poliaminas, dioles, polioles, diácidos, poliácidos, éteres corona, glimas, éteres de polialquenilo, 5 polialquenilaminas, polialquenil éter aminas, ácidos poliacrónicos, alcoholes de polivinilo y cualquiera de sus combinaciones.

**[0112]** Según otra realización particular, los grupos funcionales iónicos se seleccionan de entre el grupo formado por sales metálicas, sales de amonio, sales de fosfonio, sales de sulfato, sales de ácidos carboxílicos, sales 10 de fosfato, ácidos dicarboxílicos, ácidos policarboxílicos, utilizándose una función ácido carboxílico para formar un enlace covalente con quitosano, diaminas, poliaminas, utilizándose una función amina para formar un enlace covalente con quitosano, y cualquier combinación de los mismos.

**[0113]** Según una variante particular, el grupo funcional que sustituye al quitosano es un grupo aminoalquilo. 15 Por ejemplo, el grupo funcional que sustituye al quitosano es un grupo aminoetilo.

**[0114]** Según una variante, el quitosano sustituido es:

- un aminoalquiloquitosano, tal como, por ejemplo, un aminoetilquitosano, etc. y sus equivalentes;
- 20 - un quitosano o N-alquilo u O-alquilo hidrofobizado, como, por ejemplo, un etanoilo quitosano, propanoyol, butanoilo, pentanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonaoyl, decanoilo o dodecanoilo y similares;
- un quitosano cargado positivamente, tal como, por ejemplo, un trialkilamoniosquitosano (por ejemplo, trimetilquitosano o TMC) y sus equivalentes;
- un N- (2-hidroxi) propil-3-trimetilamonioquitosano y su contraión, como un cloruro, y sus equivalentes;
- 25 - un quitosano cargado negativamente, tal como un quitosano succinamida (quitosano succinilo), un quitosano N,O-carboxialquilo, un quitosano N,O-sulfoalquilo, y similares;
- un quitosano neutro tal como por ejemplo quitosano N,O-acetilo, quitosano N,O-alquilo, etanoilo, propanoilo, butanoilo, pentanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonaoyl, decanoilo, dodecanoilo, y similares;
- un quitosano zwitteriónico, tal como por ejemplo un quitosano que comprende polímeros hidrófobos, tales como por 30 ejemplo un poliéster alifático, tales como los homopolímeros y copolímeros de ácido láctico, ácido glicólico, epsilon-caprolactona, p-dioxanona poliésteres alifáticos y/o aromáticos; poliamidas alifáticas; polímeros etilénicos y sus copolímeros; polímeros y copolímeros de propileno; policarbonatos; poliácridatos, y sus equivalentes.

**[0115]** Según una realización particular, se pueden utilizar en el contexto de la presente invención otros 35 derivados que incluyen quitosanos O-sustituídos donde se realiza la sustitución en los grupos hidroxilo de las unidades de glucosamina y/o N-acetil-glucosamina.

**[0116]** Según otra variante, el quitosano presenta como sustituyente polímeros hidrófobos, seleccionados preferiblemente de entre el grupo formado por poliésteres alifáticos y poliamidas alifáticas, homopolímeros o 40 copolímeros de alqueno, tales como por ejemplo polímeros de etileno o propileno, policarbonatos, poliácridatos y cualquier combinación de los mismos.

**[0117]** Según una variante, el quitosano presenta como sustituyente un poliéster alifático y, en particular, una 45 polilactida.

**[0118]** Otro procedimiento para sustituir el quitosano es la reacción descrita en la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.838.643, y los quitosanos resultantes.

**[0119]** También se puede mencionar la Patente de Estados Unidos N. ° 3.953.608.

**[0120]** Según una variante, puede utilizarse como agente de sustitución, por ejemplo, un agente N-alquilante, o un anhídrido de alquilo, que comprende opcionalmente una o más insaturaciones, que comprende opcionalmente uno o más heteroátomos y/o funciones (como éter, tiéter, carboxi, éster, amida, etc.), que comprende opcionalmente uno o más sustituyentes (por ejemplo, alquilo, amina, hidroxilo, carboxilo, ácido carboxílico, etc.). 55

**[0121]** Según otra variante, se pueden citar los siguientes ejemplos: anhídrido succínico, anhídrido glutámico, anhídrido acetoxi succínico, anhídrido metilsuccínico, anhídrido diacetiltartárico, anhídrido diglicólico, anhídrido maleico, anhídrido itacónico, anhídrido citracónico y cualquiera de sus mezclas.

**[0122]** En teoría, sería adecuado cualquier agente de sustitución capaz de proporcionar quitosano soluble en la composición final a pH neutro o fisiológico.

**[0123]** Cuando la etapa de detención de la reacción se lleva a cabo mediante precipitación, la purificación puede consistir en la separación del quitosano sustituido insoluble y el no disolvente.

**[0124]** Después de la purificación, el proceso de la invención puede comprender una etapa de secado del quitosano sustituido, y opcionalmente de triturado del mismo para obtener un polvo.

**[0125]** Según una variante específica, el agente de sustitución es anhídrido succínico. El quitosano sustituido es un quitosano succinamida.

El quitosano succinamida se puede obtener de la siguiente manera:

- Disolución del quitosano en una solución acuosa a un pH inferior a 6,5;

**15** - La solución se mantiene a una temperatura de entre 0 °C y 100 °C, preferiblemente de entre 20 °C y 50 °C y más preferiblemente de entre 25 °C y 35 °C.

- Después de disolver el quitosano, se debe agregar el anhídrido succínico, por ejemplo en forma de polvo, a la solución de quitosano. La cantidad de anhídrido succínico y el número de adiciones de anhídrido succínico se adaptan según el grado de sustitución del quitosano sustituido deseado.

**20** - Después de un tiempo suficiente para alcanzar un grado mínimo de sustitución, por ejemplo después de un mínimo de 15 minutos, la reacción se detiene. La reacción se puede detener, por ejemplo, modificando el pH del medio reactivo o mediante una etapa de precipitación en un no disolvente tal como etanol, metanol, acetona, etc.

- El quitosano sustituido se purifica entonces ventajosamente, por ejemplo, mediante una técnica de diálisis, o mediante ciclos de precipitación/solubilización en un no disolvente, o mediante una técnica de filtración tangencial.

**25** - El producto purificado se seca a continuación preferiblemente. El producto puede secarse, por ejemplo, mediante secado por pulverización (atomización), o en un horno (bajo vacío o a presión atmosférica), o mediante liofilización.

**[0126]** El pH de la solución acuosa de quitosano puede ajustarse, por ejemplo, con una solución ácida débil, como ácido acético, ácido láctico, etc., para disolver el quitosano.

**30**

**[0127]** El grado de sustitución del quitosano puede variar ventajosamente de 10 a 30 %, preferiblemente de 15 a 30 %, y aún más preferiblemente de 15 a 25 %, expresado como el número de moles del sustituyente con relación al número de moles de unidades totales. En particular, la presente invención se refiere a una composición termogelificable que comprende un quitosano sustituido que tiene un grado de sustitución de 10 a 30 %, **35** preferiblemente de 15 a 30 % y más preferiblemente de 15 a 25 %, dicha composición no comprende fosfato de glicerol.

**[0128]** El grado de sustitución del quitosano succinamida se correlaciona con la relación de masa de los reactivos con respecto al quitosano al comienzo de la reacción. Según una variante, se prefiere usar una relación **40** másica de reactivos superior a 0,13 en el caso de un quitosano succinamida. Según una variante, se prefiere usar una relación másica de reactivos inferior a 0,2 en el caso de un quitosano succinamida.

**[0129]** Según una variante específica, el agente de sustitución es un agente alquilante para los grupos amino de las unidades de D-glucosamina. El quitosano sustituido es ventajosamente un quitosano alquilado en las **45** unidades de D-glucosamina. Como agentes de alquilación se incluyen los haloalquilos, tales como halometilo, como yoduro de metilo, bromuro de metilo, cloruro de acilo, como, por ejemplo, los que llevan uno o varios grupos carboximetilo, aminoetilo y/o trimetilo, etc.

**[0130]** Según esta variante, el quitosano sustituido es un quitosano N-alquilado. Según una variante **50** específica, el quitosano sustituido es un quitosano que lleva un grupo de sustitución trimetilo (N,N,N-trimetilquitosano, abreviado como "TMC").

**[0131]** Según una variante, el quitosano alquilado, preferiblemente TMC, se obtiene con una relación molar de los reactivos que va de 0,1 a 0,35, y preferiblemente de 0,15 a 0,30, expresado como número de moles de **55** agente alquilante con respecto al número de moles de grupos amino inicialmente presentes en el quitosano.

**[0132]** El quitosano se menciona, por ejemplo, con el número CAS 9012-76-4.

**[0133]** El quitosano utilizado para la invención es preferiblemente de origen fúngico, preferiblemente derivado

del micelio de un hongo de tipo Ascomycota y, en particular, de *Aspergillus Niger* y/o un hongo Basidiomycota, y, en particular, *Lentinula edodes* (shiitake) y/o *Agaricus bisporus* (seta de París). Preferiblemente, el quitosano se deriva de *Agaricus bisporus*. El quitosano es preferiblemente muy puro, es decir que contiene pocas impurezas derivadas de su origen fúngico, y una calidad microbiológica compatible con su uso como implante o composición farmacéutica. Un procedimiento para preparar quitosano es el descrito en el documento WO 03/068824 (documento EP 1483299, documento US 7.556.946).

**[0134]** El quitosano preparado puede tener diferentes masas moleculares, que generalmente van de 10 000 a 300 000.

**[0135]** Según una variante, la masa molecular promedio está entre 20 000 y 60 000.

**[0136]** Según otra variante, la masa molecular promedio está entre 60 000 y 100 000.

**[0137]** Según otra variante, la masa molecular promedio oscila entre 100 000 y 120 000.

**[0138]** Según otra variante, la masa molecular promedio oscila entre 120 000 y 150 000.

**[0139]** Según otra variante, la masa molecular promedio está entre 150 000 y 220 000.

**[0140]** Es posible hidrolizar el quitosano para reducir su masa molecular.

**[0141]** Preferiblemente, la masa molecular promedio es el masa molecular promedio en viscosidad (Mv), calculada a partir de la viscosidad intrínseca según la ecuación de Mark-Houwink. La viscosidad intrínseca se mide por viscosimetría capilar, con un viscosímetro capilar de Ubbelohde según el procedimiento de la monografía de la Farmacopea Europea EP2.2.9. Midiendo el tiempo que tarda en fluir la solución a través de un tubo capilar adaptado (Lauda, por ejemplo, tubo capilar Ubbelohde 510 01 de 0,53 mm de diámetro) usando un viscosímetro automático Lauda Visc, primero a la concentración inicial en quitosano, para varias diluciones, por ejemplo según las recomendaciones del procedimiento EP2.2.9. Se deduce la viscosidad intrínseca reducida para cada una de las concentraciones. La viscosidad reducida se representa en función de la temperatura, y el valor se extrapola a la concentración 0 para deducir la viscosidad intrínseca. Por ejemplo, se debe usar la viscosidad reducida (marcada en ml/g) de las diluciones como una función de la concentración C de las diluciones (g/ml) según la fórmula 5.

$$\text{Fórmula 2. } [\eta]_{\text{red}} = (t_1 - t_0) - (1 - C)$$

**[0142]** Para calcular la masa viscosimétrica promedio, se aplica la ecuación de Mark-Houwink con las constantes k y alfa recomendadas por Rinaudo *et al.* (Int. J. Biol. Macromol, 1993, 15, 281-285), según el DA del quitosano, según una de las tres siguientes fórmulas.

Fórmula 3.  $Mv = ([\eta]/0,082)^{(1/0,76)}$ , para un DA de 2 %;

Fórmula 4.  $Mv = ([\eta]/0,076)^{(1/0,76)}$  para un DA de 10 % (por ejemplo 11,5 %);

Fórmula 5.  $Mv = ([\eta]/0,074)^{(1/0,76)}$ , para un DA de 20 % (por ejemplo 21 %).

**[0143]** Para los valores de DA intermedios, se realiza una interpolación lineal para calcular la masa viscosimétrica promedio (Mv).

**[0144]** Preferiblemente, el quitosano utilizado tiene una masa molecular promedio de entre 120 000 y 150 000 o de entre 150 000 y 220 000.

**[0145]** Según una variante específica, el quitosano sustituido tiene, preferiblemente, una masa molecular promedio de entre 150 000 y 220 000 y un grado de sustitución de entre 10 y 50 %, la masa molecular se expresa preferiblemente antes de la sustitución.

**[0146]** Según otra realización específica, el quitosano sustituido tiene un masa molecular promedio de 120 000 a 150 000, y un grado de sustitución de entre 12 y 40 %, preferiblemente de entre 12 y 30 % o de entre 20 y 30 %, expresándose la masa molecular preferiblemente antes de la sustitución.

**[0147]** Ventajosamente, el quitosano tiene un grado de acetilación de entre 5 y 50 %. El grado de acetilación se expresa como el número de unidades de N-acetil-D-glucosamina en relación con el número total de unidades de

N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina presentes. Según una variante, el grado de acetilación es de entre 20 y 45 %.

- 5 **[0148]** Según una variante, el grado de acetilación es de entre 5 y 20 %.
- [0149]** Según una variante, el grado de acetilación es de entre 15 y 25 %.
- [0150]** Según una variante, el grado de acetilación es de entre 20 y 30 %.
- 10 **[0151]** Según una variante, el grado de acetilación es de entre 25 y 40 %.  
El grado de acetilación se determina mediante potenciometría. El quitosano se disuelve en una solución de ácido clorhídrico. El exceso de ácido clorhídrico sin reaccionar con las funciones amina del quitosano se determina mediante una solución estándar de hidróxido de sodio. Esto permite deducir la cantidad de moles de la unidad D-glucosamina presente en el quitosano restando, por lo tanto, el grado de acetilación.
- 15 **[0152]** El quitosano tiene preferiblemente un grado controlado de acetilación. Por el término "quitosano que tiene un grado controlado de acetilación" se entiende un producto para el cual el grado de acetilación, es decir, la proporción de unidades de N-acetil-glucosamina, se puede ajustar de una manera controlada.
- 20 **[0153]** Ventajosamente, la composición de la invención también puede comprender otro biopolímero distinto del quitosano sustituido. Según una variante ventajosa, el biopolímero es un polisacárido, por ejemplo, ácido hialurónico o hialuronato de sodio.
- [0154]** El ácido hialurónico puede tener una masa molecular de hasta 4MDa. La masa molecular del ácido  
25 hialurónico se puede reflejar por su viscosidad intrínseca. El ácido hialurónico puede tener una viscosidad intrínseca que va de 1 a 4 m<sup>3</sup>/kg y, por ejemplo, ser caracterizada como baja (por ejemplo, aproximadamente de 1 a 2 m<sup>3</sup>/kg) o alta (por ejemplo, aproximadamente de 2 a 4 m<sup>3</sup>/kg) de masa molecular.
- [0155]** Ventajosamente, la concentración de ácido hialurónico es inferior a 4 %, por ejemplo inferior al 3 %, o  
30 por ejemplo inferior al 2 % en masa en relación con la masa total de la composición (m/m).
- [0156]** Según una variante específica, la concentración de ácido hialurónico es inferior al 1,9 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final. Ventajosamente, la concentración de ácido hialurónico está entre 0,5 y 1,5 % (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final. Según  
35 una variante particular, la concentración de ácido hialurónico es de aproximadamente 0,9 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,5 % (m/m), expresada en masa con relación a la masa de la composición final.
- [0157]** La proporción entre el quitosano y el ácido hialurónico, por ejemplo, va de 5 a 95 %, por ejemplo de 10 a 90 %, y por ejemplo de 30 a 70 % de quitosano sustituido y de 5 a 95 %, por ejemplo de 10 a 90 %, e incluso por  
40 ejemplo de 30 a 70 %, respectivamente, de ácido hialurónico, los porcentajes se expresan con respecto a la masa seca de quitosano sustituido/masa seca de ácido hialurónico). Según una variante, esta relación entre el quitosano y el ácido hialurónico es 1/1 (es decir, 50 % de quitosano y 50 % de ácido hialurónico). Según otra variante, la relación entre el quitosano y el ácido hialurónico es de 1,5/0,5 (es decir, 75 % de quitosano y 25 % de ácido hialurónico).
- 45 **[0158]** Ventajosamente, la composición termogelificable a base de quitosano sustituido, en presencia de ácido hialurónico, forma un gel. Ventajosamente, según esta variante, las propiedades reológicas de la composición termogelificable pueden modularse con la concentración, la relación entre el quitosano y el ácido hialurónico, y la masa molecular del ácido hialurónico.
- 50 **[0159]** Ventajosamente, las propiedades del gel se conservan en presencia de ácido hialurónico.
- [0160]** El gel que comprende el quitosano sustituido, opcionalmente mezclado con ácido hialurónico permite ventajosamente presentar una buena cohesión y una buena capacidad de absorción de los choques por parte del gel a baja frecuencia de oscilación, por ejemplo a una frecuencia similar a la impuesta en el líquido sinovial de una  
55 rodilla durante la marcha (representado por el valor del módulo G' a 0,6 Hz) y una buena capacidad de lubricación de una articulación (representada por la viscosidad en reposo).
- [0161]** La invención también se refiere a un proceso para la preparación de una composición termogelificable según la invención.

**[0162]** Según una variante, el proceso típicamente comprende:

- la disolución de un quitosano sustituido en una solución acuosa, preferiblemente agua, opcionalmente tamponada, preferiblemente a un pH de entre 6,2 y 8,5 y preferiblemente de entre 6,5 y 7,5;
- el ajuste eventual del pH a un pH fisiológico, por ejemplo mediante la adición de un agente tamponante;
- el eventual ajuste de la osmolalidad de la composición;
- el eventual ajuste de la viscosidad de la composición.

10 **[0163]** Según una variante, el proceso típicamente comprende:

- la disolución de un quitosano sustituido en una solución acuosa, preferiblemente agua, opcionalmente tamponada, preferiblemente a un pH de entre 6,2 y 8,5 y preferiblemente de entre 6,5 y 7,5;
- el eventual ajuste del pH a un pH fisiológico;
- 15 - la mezcla con una solución de sal de azúcar o de poliol, tal como, por ejemplo, una solución de sal de fosfato de glicerol;
- el ajuste eventual del pH a un pH fisiológico, por ejemplo mediante la adición de un agente tamponante;
- el eventual ajuste de la osmolalidad de la composición;
- el eventual ajuste de la viscosidad de la composición.

20 **[0164]** El procedimiento puede incluir la adición de otros componentes de la composición, si se desea.

**[0165]** Según una variante, la disolución de quitosano se lleva a cabo en agua con un azúcar reductor, tal como, por ejemplo, manitol.

25 **[0166]** Según una variante, el agente tamponador es un tampón de acetato.

**[0167]** Según una variante, el agente tamponador es un tampón de fosfato.

30 **[0168]** Ventajosamente, el procedimiento también comprende una etapa posterior de llenado de un dispositivo de inyección, tal como por ejemplo una jeringa, con la composición según la invención. Ventajosamente, el dispositivo de inyección, tal como, por ejemplo, una jeringa, puede someterse luego a esterilización con vapor. Este dispositivo, por ejemplo, una jeringa, se puede envasar, preferiblemente de manera estéril.

35 **[0169]** Es ventajoso usar un quitosano que tenga un grado de pureza suficiente para la aplicación prevista.

**[0170]** La presente invención se refiere más particularmente a una composición inyectable que comprende o que consiste en una composición termogelificable según la invención.

40 **[0171]** Según una variante, la composición según la invención se usa como una composición farmacéutica inyectable o un dispositivo médico inyectable o implantable.

**[0172]** La presente invención se refiere más particularmente a una composición de la invención para uso en tratamiento terapéutico, por ejemplo incluyendo la inyección subcutánea, intradérmica, intraocular o intraarticular de dicha composición, por ejemplo para la reparación o el relleno de al menos un tejido corporal que requiera reparación o llenado.

50 **[0173]** Según otra variante, el tejido corporal se toma de tejidos de las cuerdas vocales, los músculos, los ligamentos, los tendones, los cartílagos, los órganos sexuales, los huesos, las articulaciones, los ojos, la dermis, la epidermis, una o más capas de la piel, el mesodermo, o cualquiera de sus combinaciones, y más particularmente de las articulaciones.

**[0174]** La presente invención se refiere más particularmente a una composición según la invención para el tratamiento de la artrosis, o la reparación de un defecto del cartílago, por ejemplo mediante inyección en el líquido sinovial o después de la mezcla con la sangre y la implantación en el cartílago.

**[0175]** La presente invención se refiere más particularmente a un dispositivo médico, por ejemplo un implante médico, caracterizado porque comprende o consiste en una composición según la invención.

**[0176]** La presente invención también puede incluir uno o más aditivos o excipientes para modular sus propiedades. Según una variante específica, la composición de la invención comprende una suspensión de partículas, por ejemplo partículas sólidas o de gel.

5 **[0177]** La presente invención también se refiere a una composición según la invención para uso en un procedimiento de tratamiento o cuidado estético mediante el llenado de la dermis ("relleno dérmico"). Esto implica, por ejemplo, inyectar una composición según la invención por vía subcutánea o intradérmica.

10 **[0178]** La presente invención también se refiere a una composición según la invención para uso en un procedimiento de tratamiento superficial de la piel mediante inyección múltiple por vía intradérmica. Tales composiciones se pueden usar típicamente en dermatología como tratamientos estéticos. Tal procedimiento, por ejemplo, tiene como objetivo inflar la piel para que pierda el aspecto arrugado (tratamiento de arrugas y/o líneas de expresión finas). Tal tratamiento puede dirigirse a un sujeto que desee darle un aspecto rejuvenecido a su piel.

15 **[0179]** La presente invención también se refiere a una composición según la invención para uso en un procedimiento de tratamiento o cuidado estético donde la composición es un agente viscosuplemento. Se trata, por ejemplo, de inyectar a nivel intraarticular la composición de la invención, en particular, para limitar la fricción de la membrana sinovial situada a cada lado de la articulación.

20 **[0180]** La presente invención también se refiere a una composición según la invención para uso como vector de célula, de uno o más tipos de células, y/o uno o más agentes activos. Puede tratarse de agentes activos desde el punto de vista farmacéutico o biológico. La composición de la invención puede de hecho ser compatible con la presencia de células, preferiblemente células vivas. Entre las células vivas de interés pueden citarse las siguientes: condrocitos (cartílago) fibrocondrocitos (menisco), fibroblastos de ligamento (ligamento), fibroblastos de la piel (piel),  
25 tenocitos (tendones), miofibroblastos (músculo), células madre mesenquimales, glóbulos rojos (sangre) y queratinocitos (piel). La composición de la invención también puede ser un vector terapéutico para la administración dirigida y/o la liberación controlada de al menos un agente terapéutico.

30 **[0181]** Según una variante, se añade la sangre o el plasma, o un lisado de plaquetas, o plasma rico en plaquetas, o cualquier fluido biológico con la composición de la invención, por ejemplo, para aumentar el rendimiento del producto.

**[0182]** Según una variante, la composición según la invención se formula en forma sólida (por ejemplo, una película o una espuma porosa), que se solubiliza una vez implantada.

35 **[0183]** Según una variante, la composición se formula en forma de una composición nebulizable (pulverización).

**[0184]** La presente invención también se refiere a una composición según la invención para uso en un  
40 procedimiento de tratamiento o tratamiento de belleza de uno o más tejidos u órganos afectados por el calor excesivo, como en el caso de una quemadura.

**[0185]** La presente invención también se refiere a una composición como un líquido sinovial artificial que comprende o consiste en la composición termogelificable según la invención.

45 **[0186]** La composición según la presente invención puede imitar un líquido sinovial sano o mejorar un líquido sinovial sano o defectuoso buscando mejorar sus propiedades de absorción de choques (identificable por el módulo de elasticidad  $G'$ ), siendo fácilmente inyectable para llenar una jeringa, por ejemplo, o pudiéndose inyectar en el cuerpo humano o animal. Como indicación, el módulo de elasticidad  $G'$  del líquido sinovial sano está entre 40 y 100  
50 Pa, y su módulo de pérdida  $G''$  está entre 1 y 10 Pa.

**[0187]** Según una variante, la composición termogelificable se inyecta en forma fluida y luego se gelifica in situ.

55 **[0188]** Según una variante, la composición termogelificable se inyecta en forma de gel. Ventajosamente, según esta variante, el gel es fácilmente inyectable a través de una aguja delgada.

**[0189]** En general, los rangos de osmolalidad y valores de pH buscados en aplicaciones biomédicas se aproximan a los siguientes valores:

-Osmolalidad:

**[0190]**

- Plasma Iso-osmolar: 285-295 mosm/kg;

• Iso-osmolar en el líquido sinovial: 404 +/- 57 mosm/kg, según " Clin Orthop Relat Res, 1988, 235, 289-95 " et " Biochem Biophys Res Comm, 2012, 422, 455-461 »;

-pH:

**[0191]** Un pH fisiológico generalmente es superior a 6,8, en particular, superior a 7,0, y en particular a 7,4 (como para el plasma o un líquido sinovial).

**[0192]** El pH del plasma es generalmente 7,4. El pH del líquido sinovial es generalmente de 7,768 +/- 0,044 según "J Bone Joint Surg Br, 1959, 41-B(2), 388-400"; o de 7,3 según "Acta Orthop Scand, 1969, 40, 634-641", o también según "Clin Rheumatol 2006, 25, 886-888".

**[0193]** El pH sinovial en la osteoartritis se considera generalmente más bajo que el del líquido sinovial sano.

**[0194]** De forma totalmente sorprendente, se descubrió que una composición termogelificable según la presente invención tiene muy buenas propiedades cuando se mezcla con el líquido sinovial, especialmente un líquido sinovial de la rodilla de un ser humano que padezca osteoartrosis.

**[0195]** Contrariamente al efecto que se observa con las composiciones de la técnica anterior a base de ácido hialurónico, las propiedades viscosuplemento caen cuando el ácido hialurónico se diluye con el líquido sinovial de un paciente con osteoartrosis, las composiciones termogelificables de la invención, mezcladas con un líquido sinovial, retienen sus propiedades de gel, incluso después de esta dilución en el líquido sinovial. Aún más sorprendentemente, las composiciones termogelificables según la invención exhiben propiedades reológicas mejoradas mediante la mezcla con un líquido sinovial, especialmente líquido sinovial de la rodilla de un ser humano que padezca osteoartrosis.

**[0196]** Se puede hablar de un efecto sinérgico entre la composición termogelificable de la invención y un líquido sinovial.

**[0197]** Así, la presente invención se refiere a una mezcla de un líquido sinovial con una composición termogelificable como se define por la presente invención, por ejemplo según una relación de volumen entre la composición termogelificable/el líquido sinovial que va de 20/80 a 80/20 (v/v) y, por ejemplo, de 50/50 (v/v).

**[0198]** Ventajosamente, la composición según la presente invención es estéril. Muy ventajosamente, la composición según la presente invención se esteriliza por aumento de temperatura, preferiblemente en autoclave.

**[0199]** Según una variante, las composiciones de la invención son transparentes o translúcidas.

**[0200]** Por "translúcido" se entiende que se puede distinguir un objeto cuando se coloca la composición entre el ojo del observador y el objeto. Por "transparente" se entiende que los caracteres alfanuméricos se pueden distinguir cuando la composición se coloca entre el ojo del observador y los caracteres observados. En general, esta evaluación se lleva a cabo con un grosor de aproximadamente 1 cm.

**[0201]** Según una variante, la composición de la invención es incolora, es decir, en particular, que un observador a simple vista no atribuye un color específico a la composición.

**[0202]** La invención se refiere en particular a artículos o envases, preferiblemente estériles, que comprenden uno o más dispositivos de inyección llenados previamente con una composición termogelificable según la invención. Estas son típicamente jeringas precargadas.

**[0203]** La composición de la invención puede esterilizarse ventajosamente. Alternativamente, la composición de la invención se esteriliza con vapor, por ejemplo por un aumento de la temperatura a una temperatura por encima

de 100 °C, y preferiblemente por encima de 120 °C, por ejemplo entre 121 y 138 °C en autoclave, durante un período suficiente de esterilización, por ejemplo, en general, de 15 a 20 minutos.

**[0204]** La invención cubre especialmente una composición termogelificable esterilizada que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina substituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina y opcionalmente de las unidades de N-acetil-D-glucosamina substituidas.

**[0205]** Ventajosamente, la composición termogelificable esterilizada tiene una transición reversible de sol-gel.

**[0206]** Según una variante, la composición se esteriliza con vapor.

**[0207]** Según una variante, la composición se esteriliza aumentando la temperatura, preferiblemente en autoclave.

**[0208]** Ventajosamente, según una variante, la composición termogelificable esterilizada no se gelifica después de la esterilización.

**[0209]** Ventajosamente, según una variante, la composición termogelificable esterilizada se gelifica a una temperatura superior a 10 o 15 °C, antes y después de la esterilización.

**[0210]** Según una variante, la solución consiste en o comprende una composición termogelificable según la invención.

**[0211]** Según una variante, la composición se esteriliza con vapor mediante un aumento de la temperatura a una temperatura superior a 100 °C, preferiblemente en un recinto cerrado. Ventajosamente, se esteriliza elevando la temperatura por encima de los 120 °C en autoclave.

**[0212]** Según otro aspecto, la invención se refiere a un proceso para esterilizar dicha composición.

**[0213]** Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento de esterilización de una composición termogelificable, caracterizado porque comprende al menos las siguientes etapas:

- la colocación en un autoclave de una composición termogelificable que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina substituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina;
- el aumento de la temperatura del autoclave y su mantenimiento a una temperatura de esterilización de modo que, durante el período de esterilización, la temperatura y la duración de la esterilización sean suficientes para esterilizar la composición termogelificable;
- la reducción de la temperatura del autoclave;
- la retirada de la composición termogelificable esterilizada del autoclave.

**[0214]** Según una variante, la temperatura del autoclave se mantiene a una temperatura superior a 60 °C, preferiblemente superior a 100 °C, preferiblemente superior a 120 °C.

**[0215]** Ventajosamente, el tiempo de esterilización es de al menos 3 minutos, preferiblemente de al menos 10 minutos, preferiblemente de al menos 15 minutos y más preferiblemente de al menos 20 minutos.

**[0216]** El tiempo de esterilización generalmente depende del volumen de muestra procesado.

**[0217]** Como indicación, según una variante, el tiempo de esterilización es de 15 o 20 minutos.

**[0218]** Más específicamente, generalmente se recomienda que la esterilización se realice mientras se mantiene a una temperatura de 121 °C a 138 °C durante un período de 3 a 30 minutos, según ISO17665.

**[0219]** Alternativamente, la temperatura de esterilización se mantiene de 121 a 138 °C durante aproximadamente 20 minutos.

**[0220]** La presión dentro del autoclave es igual a la presión del vapor en el recinto cerrado. Generalmente es

mayor o igual a 2 bares durante el período de esterilización. Más específicamente, se prefiere que la esterilización se lleve a cabo en autoclave a una presión de 100 kPa, superior a la atmosférica, durante un período de 15 minutos o equivalente (valor F0).

5 **[0221]** Más específicamente, la esterilización con vapor tiene por finalidad eliminar todos los gérmenes y/o contaminantes.

**[0222]** Ventajosamente, la etapa de enfriamiento comprende el enfriamiento a temperatura ambiente (20-25 °C). Ventajosamente, esta etapa también comprende la reducción de la presión a la presión atmosférica.

10

**[0223]** Según una variante, el proceso de esterilización comprende uno o más ciclos de esterilización con vapor.

**[0224]** Se puede usar cualquier tipo de autoclave adecuado para la esterilización de productos destinados a ser aplicados o inyectados en el cuerpo humano o animal. Tales autoclaves son conocidos por los expertos en la técnica.

**[0225]** Según una variante, el autoclave utilizado es un autoclave para la esterilización de productos biológicos y/o terapéuticos.

20

**[0226]** Ventajosamente, la composición de la invención se esteriliza en un recipiente, y más particularmente en un dispositivo para su inyección en el cuerpo humano o animal.

**[0227]** Ventajosamente, para llenar un dispositivo para una inyección, y más específicamente una jeringa, se puede aplicar una presión contra el extremo opuesto del orificio de llenado para garantizar el mantenimiento del gel en el dispositivo sin desbordamiento.

**[0228]** Según una variante, una jeringa que contenga la composición de la invención se coloca en un autoclave para su esterilización.

30

**[0229]** Así se obtiene una jeringa esterilizada precargada que contiene la composición esterilizada de la invención.

**[0230]** La presente invención se refiere en particular a composiciones termogelificables no esterilizables por filtración, en particular, porque la esterilización por filtración no es adecuada para su viscosidad (en filtro de 0,22 µm).

**[0231]** Según una variante, las composiciones termogelificables de la invención tienen una viscosidad superior a 200 mPa.s.

40

**[0232]** La invención también cubre una composición de la invención liofilizada. La liofilización puede tener lugar antes y/o después de la esterilización.

**[0233]** La invención también cubre una composición de la invención en forma seca, especialmente en una forma liofilizada.

45

**[0234]** En particular, esta composición liofilizada puede (re)dispersarse antes del uso.

**[0235]** La presente invención también cubre un procedimiento de tratamiento terapéutico que comprende la inyección de una composición según la invención.

50

**[0236]** La presente invención también cubre el uso de una composición según la invención para la preparación de una composición farmacéutica, en particular para un tratamiento terapéutico, por ejemplo, como se define más específicamente por la invención.

55

**[0237]** La presente invención también cubre un procedimiento de cuidado estético, en otras palabras, no terapéutico, que comprende el uso o la inyección de una composición según la invención. Esto implica, por ejemplo, el llenado de arrugas o el relleno de una o más áreas de tejido visibles dañadas, por ejemplo, después de un accidente o un procedimiento quirúrgico, con fines estéticos.

**[0238]** Un tejido es un conjunto de células similares del mismo origen, agrupadas en un todo funcional, es decir, que contribuyen a la misma función. Entre los tipos de tejido pueden citarse el tejido epitelial, el tejido conjuntivo, el tejido muscular y el tejido nervioso.

5

**[0239]** El término "composición de la invención" y otros términos equivalentes hacen referencia a una composición tal y como se define en la presente invención e incluida en cualquiera de sus variantes, realizaciones particulares o específicas o, de forma independiente, en cualquiera de sus combinaciones, incluso según las características preferidas.

10

**[0240]** Figuras:

La Figura 1 muestra un espectro de resonancia magnética nuclear del protón de un quitosano succinamida de la invención.

15 **[0241]** Otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica después de la lectura de la descripción explicativa que se refiere a ejemplos que se dan únicamente a modo ilustrativo y que no limitan en modo alguno el alcance de la invención.

20 **[0242]** Los ejemplos son una parte integral de la presente invención y cualquier característica que parezca novedosa con relación a un estado de la técnica anterior a partir de la descripción tomada como un todo, incluidos los ejemplos, forma parte integral de la invención en su función y su generalidad.

**[0243]** Por lo tanto, cada ejemplo tiene un alcance general.

25 **[0244]** Por otro lado, en los ejemplos, todos los porcentajes se dan en masa, a menos que se indique lo contrario, y la temperatura se expresa en grados Celsius, a menos que se indique lo contrario, y la presión es la presión atmosférica, a menos que se indique lo contrario.

## EJEMPLOS

30

**[0245]** Los quitosanos precursores de los quitosanos sustituidos según la invención tienen masas moleculares promedio en viscosidad (Mv, determinado por viscosimetría capilar) y los grados de acetilación (DA, proporción de unidad de N-acetil-glucosamina, determinada por valoración potenciométrica) incluidos en los rangos de la Tabla 1. La masa molecular de un quitosano también puede definirse por la viscosidad dinámica de una solución de concentración de quitosano al 1 % (m/m) en ácido acético de una concentración del 1 % (v/v), medida mediante viscosimetría móvil por rotación, por ejemplo, con un viscosímetro Brookfield, como se describió anteriormente.

35

| <b>Tabla 1.</b> Tabla 1. Características de los quitosanos precursores de los quitosanos sustituidos |                                   |                                           |                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------|
| <b>Rango de masa molecular del quitosano</b>                                                         | <b>Rango de Mv</b>                | <b>Rango de viscosidad al 1 % (mPa.s)</b> | <b>Rango de DA (mol %)</b> |
| ultrabajo                                                                                            | Ejemplos 20 000 - 60 000          | 5 - 20                                    | 5 - 20 %                   |
| bajo                                                                                                 | Aproximadamente 60 000 - 120 000  | 20 - 50                                   | 15 - 25 %                  |
| medio                                                                                                | Aproximadamente 120 000 - 150 000 | 50 - 80                                   | 20 - 30 %                  |
| alto                                                                                                 | Aproximadamente 150 000 - 220 000 | 80 - 120                                  | 25 - 40 %                  |

### 40 Ejemplo 1 - Preparación de un quitosano sustituido (quitosano succinamida, CSS)

**[0246]** Para obtener el quitosano succinamida de la referencia CSS5 de la Tabla 2, se disuelven 10 g de quitosano de masa molecular y DA conocidos en 266 ml de una solución acuosa al 1 % (v/v) de ácido acético. La solución se mantiene a una temperatura de 30 °C. Se añaden 6,75 g de anhídrido succínico (AS), lo cual  
 45 corresponde a una relación de masa de anhídrido succínico en el quitosano (AS/quitosano) de 0/675, y a una relación molar de anhídrido succínico en los grupos NH<sub>2</sub> del quitosano (AS/NH<sub>2</sub>) de 1/7. Después de 15 minutos, el

pH del medio reactivo se puede ajustar a 7,5 por adición de hidróxido de sodio al 30 %. La solución se precipita luego en 2,5 litros de etanol. El precipitado se recupera y se solubiliza nuevamente en agua. El quitosano sustituido se somete a estas etapas de precipitación en el etanol y solubilización en agua 3 veces. En la última precipitación, el precipitado se recupera, se prensa y se seca en un horno a 60 °C a presión atmosférica. Una vez que el quitosano succinamida está seco, se muele para obtener un polvo. El grado de sustitución del quitosano se determina por RMN del protón según el procedimiento descrito anteriormente. Un espectro de RMN se ilustra en la Figura 1.

**[0247]** Los lotes de quitosano succinamida usados en los ejemplos se prepararon de la misma manera, con los parámetros de la Tabla 2.

10

| <b>Tabla 2.</b> Parámetros y características de los lotes de quitosano succinamida |                    |                                     |                                         |                  |                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------|
| <b>N. ° CSS</b>                                                                    | <b>Rango de Mv</b> | <b>Relación másica AS/quitosano</b> | <b>Relación molar AS/NH<sub>2</sub></b> | <b>DS (%mol)</b> | <b>Intervalo de pH para insolubilidad en agua</b> |
| CSS1                                                                               | medio              | 0,119                               | 0,3                                     | 12               | 5,4 - 6,7                                         |
| CSS2                                                                               | medio              | 0,159                               | 0,4                                     | 18               | 6,3 - 7,3                                         |
| CSS3                                                                               | medio              | 0,199                               | 0,5                                     | 25               | 6,1 - 7,0                                         |
| CSS4                                                                               | medio              | 0,262                               | 0,6                                     | 42               |                                                   |
| CSS5                                                                               | medio              | 0,675                               | 1,7                                     | 52               | < 5,5                                             |
| CSS6                                                                               | medio              | 0,178                               | 0,45                                    | 21               | 5,8 - 6,9                                         |
| CSS7                                                                               | alto               | 0,19                                | 0,5                                     | 17               |                                                   |
| CSS8                                                                               | alto               | 0,258                               | 0,6                                     | 27               | 4,2 - 7,0                                         |
| CSS9                                                                               | alto               | 0,68                                | 1,7                                     | 58               | < 5,2                                             |
| CSS10                                                                              | medio              | 0,133                               | 0,3                                     | /                | 6,4 - 6,9                                         |
| CSS11                                                                              | medio              | 0,133                               | 0,3                                     | /                | 5,9 - 7,1                                         |
| CSS12                                                                              | medio              | 0,133                               | 0,3                                     | /                | 6,6 - 7,1                                         |
| CSS13                                                                              | medio              | 0,133                               | 0,3                                     | /                | 6,5 - 7,2                                         |
| CSS14                                                                              | medio              | 0,133                               | 0,23                                    | /                | 6,1 - 7,6                                         |
| CSS15                                                                              | medio              | 0,133                               | 0,23                                    | /                | 4,8 - 6,3                                         |
| CSS16                                                                              | medio              | 0,178                               | 0,4                                     | 15               | 5,8 - 6,9                                         |
| CSS17                                                                              | medio              | 0,222                               | 0,5                                     | /                |                                                   |
| CSS18                                                                              | medio              | 0,172                               | 0,4                                     | /                | 5,5 - 7                                           |
| CSS19                                                                              | alto               | 0,2                                 | 0,5                                     | /                | 5,2 - 6,3                                         |

Nota: La adición de fosfato de sodio beta-glicerol (65 %, Salfic-Alcan, abreviado como GP) permite hacer el CSS soluble más allá del límite de solubilidad en agua. El CSS tiene un carácter zwitteriónico. Esto no supone ningún problema porque se puede agregar una baja concentración de GP para encontrar el carácter soluble del CSS.

### Ejemplo 2 - Preparación de un quitosano sustituido (trimetilquitosano, TMC)

**[0248]** Se prepara una suspensión de 50 g de quitosano en un volumen de 800 ml de agua. La suspensión se calienta a 95 °C. Se añade un volumen de 26,27 ml del reactivo 3-cloro-2-hidroxipropil trimetil cloruro de amonio (abreviado como CHTAC) gota a gota al medio, con una relación másica y molar CHTAC/quitosano de 0,31 y 0,5, respectivamente. Después de 4 horas de reacción, el medio reactivo se diluye con 400 ml de agua y luego se precipita en 8,4 litros de etanol. El precipitado se recupera y se solubiliza nuevamente en agua. El quitosano sustituido experimenta esta etapa de solubilización/precipitación en etanol 3 veces. En la última precipitación, el precipitado se recupera, se prensa y se seca en un horno a 60 °C a presión atmosférica. Una vez que el quitosano trimetilado está seco, se muele para obtener un polvo.

**[0249]** Los lotes de quitosano trimetilado usados en los ejemplos se prepararon de la misma manera, con los parámetros de la Tabla 3.

25

| <b>Tabla 3.</b> Parámetros y características de los lotes de quitosano trimetilado |                                  |                                        |                                            |                  |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|------------------|
| <b>N. ° TMC</b>                                                                    | <b>Rango de Mv del quitosano</b> | <b>Relación másica CHTAC/quitosano</b> | <b>Relación molar CHTAC/NH<sub>2</sub></b> | <b>DS (%mol)</b> |
| TMC1                                                                               | medio                            | 0,37                                   | 0,5                                        | 16               |
| TMC2                                                                               | medio                            | 0,79                                   | 1,05                                       | 17               |

|                                                                                                              |       |      |     |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|-----|----|
| TMC3                                                                                                         | medio | 0,37 | 0,5 | 22 |
| TMC4                                                                                                         | medio | 0,37 | 0,5 | 26 |
| TMC5                                                                                                         | medio | 0,37 | 0,5 | 28 |
| TMC6                                                                                                         | medio | 0,61 | 0,8 | 36 |
| TMC7                                                                                                         | medio | 1,21 | 1,5 | 75 |
| Nota: Todos estos quitosanos trimetilados son perfectamente solubles en agua en el rango de DS de 16 a 75 %. |       |      |     |    |

### Ejemplo 3 - Ejemplo de preparación de una composición termogelificable

**[0250]** Un quitosano succinamida (CSS2) obtenido según el ejemplo 1 se solubiliza en agua en las siguientes proporciones: 0,195 g de quitosano succinamida CSS2 en 14,809 g de agua que contiene 0,5 % (m/m) de manitol. Se prepara una solución de fosfato sódico de beta-glicerol (65 %, Salfic-Alcan, abreviado como GP) a 39,7 % (m/m). Con agitación magnética o mecánica, se agregan 1,49 ml de la solución GP a la solución de quitosano succinamida. Se añaden 0,325 ml de tampón de acetato 0,5M (pH 3) a la solución de quitosano succinamida/GP hasta que se obtiene un pH dado, por ejemplo 7,5 en el caso de la solución N.º 2 de la Tabla 4. Se mide la osmolalidad de la solución final.

### Ejemplo 4 - Capacidad para gelificar soluciones de quitosano succinamida a una concentración final de 1,14 % (m/m)

**[0251]** Las soluciones de la Tabla 4 se preparan según el procedimiento descrito en el ejemplo 3.

| <b>Tabla 4.</b> Soluciones a base de CSS de Mv "medias" y "altas" a una concentración de 1,14 % (m/m), de GP a una concentración de 4,11 % (m/m), y de manitol a una concentración de 0,5 % (m/m); el pH se ajusta a 7,5 |                 |         |                              |                       |           |                        |                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------|------------------------------|-----------------------|-----------|------------------------|----------------------------|
| Rango de Mv                                                                                                                                                                                                              | N.º de solución | N.º CSS | Relación másica AS/quitosano | Relación molar AS/NH2 | DS (%mol) | Facilidad de inyección | Transición sol-gel a 37 °C |
| medio                                                                                                                                                                                                                    | 1               | CSS1    | 0,12                         | 0,3                   | 12        | Sí                     | No                         |
|                                                                                                                                                                                                                          | 2               | CSS2    | 0,16                         | 0,4                   | 18        | Sí                     | Sí                         |
|                                                                                                                                                                                                                          | 3               | CSS3    | 0,20                         | 0,5                   |           | Sí                     | Sí                         |
|                                                                                                                                                                                                                          | 4               | CSS4    | 0,26                         | 0,6                   | 42        | Sí                     | No                         |
|                                                                                                                                                                                                                          | 5               | CSS5    | 0,68                         | 1,7                   | 52        | Sí                     | No                         |
| alto                                                                                                                                                                                                                     | 6               | CSS6    | 0,18                         | 0,4                   |           | Sí                     | Sí                         |
|                                                                                                                                                                                                                          | 7               | CSS7    | 0,19                         | 0,5                   |           | Sí                     | Sí                         |
|                                                                                                                                                                                                                          | 8               | CSS8    | 0,26                         | 0,6                   |           | Sí                     | No                         |
|                                                                                                                                                                                                                          | 9               | CSS9    | 0,68                         | 1,7                   |           | Sí                     | No                         |

La capacidad de gelificar de la solución termogelificable depende, en particular, del grado de sustitución. El grado de sustitución está directamente relacionado con la relación molar entre las funciones amina presentes en el quitosano y la cantidad de anhídrido succínico utilizado durante la reacción de sustitución. Si el grado de sustitución es demasiado alto, la gelificación no tiene lugar (caso de la solución N.º 5). La gelificación no tiene lugar si el grado de sustitución es demasiado bajo (caso de la solución N.º 1).

**[0252]** La Tabla 4 muestra que para el quitosano succinamida, la relación óptima de masa de AS/quitosano que conduce al carácter termogelificable está entre 0,12 y 0,26, lo que se traduce en un intervalo de DS de 10 a 45 %.

**[0253]** Por otra parte, las soluciones termogelificables de la Tabla 5 se preparan a partir de diferentes lotes de quitosano succinamida, para demostrar la reproducibilidad de la preparación de hidrogeles con una relación de masa de 0,13, que puede dirigirse a un DS de entre 14 y 18 mol %. Se puede ver que la osmolalidad de la solución final está entre 363 y 447 mOsm/kg, y que todas las soluciones son fáciles de inyectar y termogelificables. La presencia de manitol (que es opcional para el efecto termogelificante) aumenta la osmolalidad.

| <b>Tabla 5.</b> Soluciones de quitosano succinamida de Mv "medio" a una concentración de 1,14 %, de GP a una concentración de 4,11 % y de manitol a una concentración de 0,5 % |                 |         |                       |                        |             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------|-----------------------|------------------------|-------------|
| Rango de Mv                                                                                                                                                                    | N.º de solución | N.º CSS | Osmolalidad (mosm/kg) | Facilidad de inyección | Gel a 37 °C |

|       |    |       |     |    |    |
|-------|----|-------|-----|----|----|
| medio | 10 | CSS10 | 363 | Sí | OK |
|       | 11 | CSS11 | 382 | Sí | OK |
|       | 12 | CSS12 | 447 | Sí | OK |
|       | 13 | CSS13 | 405 | Sí | OK |
|       | 14 | CSS14 |     | Sí | OK |
|       | 15 | CSS15 |     | Sí | OK |

**Ejemplo 5 - Capacidad de quitosano sustituido TMC para gelificarse a una concentración final de 0,9 % (m/m)**

**[0254]** En el caso del quitosano trimetilado de masa molecular "media", el grado óptimo de sustitución para la formulación de gel termogelificante, por ejemplo, a una concentración baja de 0,9 % (m/m), está entre 10 y 36 % (Tabla 6).

**Tabla 6.** Soluciones a base de TMC a una concentración de 0,9 % (m/m) y de GP a una concentración de 3,0 % (m/m) (sin manitol); el pH se ajusta a 7,5

| N. ° de solución TMC | N. ° TMC | DA (mol %) | DS (mol %) | Gel a 37 °C |
|----------------------|----------|------------|------------|-------------|
| 1                    | TMC1     | 16         | 16         | Sí          |
| 2                    | TMC2     | 16         | 17         | Sí          |
| 3                    | TMC3     | 15         | 22         | Sí          |
| 4                    | TMC4     | 18         | 26         | Sí          |
| 5                    | TMC5     | 18         | 28         | Sí          |
| 6                    | TMC6     | 17         | 36         | No          |
| 7                    | TMC7     | 19         | 75         | No          |

**Ejemplo 6 - Capacidad de las soluciones de quitosano succinamida para gelificar a baja concentración, valores de osmolalidad y pH fisiológico**

**[0255]** La comparación de la solubilidad, la inyección y la naturaleza termogelificable de las soluciones a base de quitosano no sustituido (CS) con las de las soluciones a base de quitosano sustituido (quitosano succinamida CSS), preparadas según el procedimiento del ejemplo 2 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Soluciones basadas en quitosano (CS) o quitosano succinamida (CSS)

| CS o CSS | Rango de Mv | CS o CSS (% m/m) | GP (% m/m) | pH final (ajustado) | Facilidad de inyección | Gel a 37 °C |
|----------|-------------|------------------|------------|---------------------|------------------------|-------------|
| CS       | alto        | 1,5 %            | 6 %        | 6,8-7,0             | Sí                     | No          |
| CS       | alto        | 1,5 %            | 6 %        | 6,7-7,0             | Sí                     | No          |
| CS       | alto        | 2 %              | 6 %        | 6,7-7,0             | Sí                     | Sí          |
| CS       | alto        | 2 %              | 4,1 %      | 6,7-7,0             | Sí                     | No          |
| CS       | medio       | 2 %              | 4,1 %      | 7,4                 | No (precipitado)       | No          |
| CS       | bajo        | 2 %              | 4,1 %      | 7,4                 | No (precipitado)       | No          |
| CS       | medio       | 1,5 %            | 4,1 %      | 7,4                 | No (precipitado)       | No          |
| CS       | bajo        | 1,5 %            | 4,1 %      | 7,4                 | No (precipitado)       | No          |
| CSS      | medio       | 1,5 %            | 4,1 %      | 7,4                 | Sí                     | Sí          |

**[0256]** Con el quitosano no sustituido de la técnica anterior, no se pueden cumplir al mismo tiempo las especificaciones de la osmolalidad, el pH, la solubilidad en agua, la inyectabilidad y la gelificación a 37 °C.

**[0257]** Con quitosano sustituido con un grupo succinilo se puede lograr la solubilidad, la inyectabilidad y el carácter de sol-gel incluso a una concentración de GP baja (a la misma concentración de polímero), ya que el polímero de partida es un quitosano sustituido soluble en agua, siendo la concentración de GP es modulable para obtener el carácter gelificable, la osmolalidad y el pH deseados.

**[0258]** **Ejemplo 7 - Capacidad de las soluciones de quitosano succinamida de concentración final 0,88 % para gelificarse en un amplio intervalo de pH**

**[0259]** En este ejemplo, el pH de las soluciones se ajustó agregando ácido acético concentrado (96 % m/v) para minimizar la dilución del hidrogel. Todas las soluciones son solubles y fácilmente inyectables.

| <b>Tabla 8.</b> Solución a base de CSS a una concentración de 0,88 % (m/m) y GP a una concentración de 4,16 % |                 |           |                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|--------------------|
| <b>Rango de Mv</b>                                                                                            | <b>N. ° CSS</b> | <b>pH</b> | <b>Gel a 37 °C</b> |
| medio                                                                                                         | CSS10           | 6,8       | No                 |
|                                                                                                               |                 | 7,0       | No                 |
|                                                                                                               |                 | 7,2       | Sí                 |
|                                                                                                               |                 | 7,5       | Sí                 |
|                                                                                                               |                 | 7,6       | Sí                 |
|                                                                                                               |                 | 8,0       | Sí                 |

**[0260]** Para un masa molecular y un grado de sustitución dado, es posible obtener el carácter gelificante en un amplio intervalo de pH, por ejemplo, de 7,2 a 8,0, por ejemplo, de entrada de un CSS de masa molecular "promedio" y una relación de masa de 0,133.

5

**Ejemplo 8 -** Capacidad para disminuir la concentración de quitosano sustituido (CSS) conservando la capacidad de gelificación de la solución

| <b>Tabla 9.</b> Soluciones a base de CSS de baja concentración |                 |                    |           |                                            |                            |                    |
|----------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------|-----------|--------------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| <b>Rango de Mv</b>                                             | <b>N. ° CSS</b> | <b>CSS (% m/m)</b> | <b>pH</b> | <b>Gama de concentración en GP (% m/m)</b> | <b>Gama de osmolaridad</b> | <b>Gel a 37 °C</b> |
| alto                                                           | CSS7            | 0,75 %             | 7,0       | 3,5 - 4,1                                  | 310 - 376                  | No                 |
|                                                                |                 |                    | 7,5       | 3,4 - 4,2                                  | 300 - 375                  | Sí                 |
|                                                                |                 | 0,88 %             | 7,0       | 3,4 - 4,4                                  | 300 - 373                  | No                 |
|                                                                |                 |                    | 7,5       | 3,4 - 4,4                                  | 300 - 380                  | Sí                 |
|                                                                |                 | 1,34 %             | 7,0       | 3 - 3,7                                    | 300 - 380                  | Sí                 |
|                                                                |                 |                    | 7,5       | 3,4 - 3,8                                  | 300 - 375                  | No                 |
| medio                                                          | CSS17           | 0,88 %             | 7,0       | 3,4 - 3,8                                  | 300 - 375                  | No                 |
|                                                                |                 |                    | 7,5       | 3,4 - 4,5                                  | 300 - 400                  | No                 |
|                                                                |                 | 1,35 %             | 7,0       | 2,4 - 2,7                                  | 300 - 360                  | No                 |
|                                                                |                 |                    | 7,5       | 2,4 - 2,7                                  | 300 - 340                  | Sí                 |
|                                                                |                 |                    | 7,0       |                                            |                            |                    |
|                                                                |                 |                    | 7,5       |                                            |                            |                    |

10 **[0261]** A veces es ventajoso formar las soluciones finales de baja concentración de quitosano sustituido en ciertas aplicaciones, por ejemplo, por debajo del 1 %, por ejemplo, 0,85 %, conservando la capacidad de producir un gel a temperatura fisiológica, por ejemplo 7,5.

15 **Ejemplo 9 -** Inyectabilidad de productos comerciales y soluciones de quitosano sustituido y GP a temperatura ambiente

20 **[0262]** Este ejemplo pretende verificar que el producto pueda inyectarse fácilmente a través de una jeringa equipada con una aguja de pequeño diámetro, como la utilizada para las inyecciones, por ejemplo, intradérmicas o intraarticulares. En particular, es importante poder inyectar fácilmente en articulaciones pequeñas como las de la mano.

25 **[0263]** Se evalúa la fuerza requerida para inyectar las soluciones a temperatura ambiente mientras se inyecta la solución con una aguja de calibre 22 según el protocolo descrito en el texto. Se mide la fuerza requerida para la inyección después de un desplazamiento del émbolo de la jeringa de aproximadamente 15 mm, lo cual permite comparar fácilmente los diferentes productos entre sí. Se probaron tres soluciones de ácido hialurónico comercialmente disponibles para inyección intraarticular, y se compararon con soluciones de quitosano succinamida de masa molecular "media" y concentración variable.

| <b>Tabla 10.</b> Fuerza requerida para la inyección después de un desplazamiento del pistón de aproximadamente 15 mm para una aguja de calibre 22 |                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>Producto</b>                                                                                                                                   | <b>Fuerza (N)</b> |
| Agua pura                                                                                                                                         | 0,5               |
| Solución comercial "A" (ácido hialurónico)                                                                                                        | 2 N               |
| Solución comercial "C" (ácido hialurónico)                                                                                                        | 6 - 8 N           |
| Solución a base de CSS18 a una concentración de 1,0 % a pH 7,5                                                                                    | 3 N               |

|                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------|-----|
| Solución a base de CSS19 a una concentración de 1,5 % a pH 7,5 | 3 N |
|----------------------------------------------------------------|-----|

[0264] Se ve que las soluciones de quitosano succinamida son tan fácilmente inyectables mediante una aguja de calibre 22 como una solución comercial de ácido hialurónico (A), y más fácilmente inyectables que una solución comercial de ácido hialurónico (C).

5

**Ejemplo 10 - Propiedades reológicas de los productos comerciales a base de ácido hialurónico y de soluciones termogelificables a base de quitosano succinamida**

[0265] Se miden los módulos  $G'$  y  $G''$  de los productos comerciales basados en ácido hialurónico a una temperatura que va de 4 °C a 37 °C, en función del tiempo, usando un reómetro ARES, según el procedimiento descrito anteriormente. A continuación se determina el valor de los módulos  $G'$  y  $G''$  a los 60 minutos (Tabla 11).

| Tabla 11. Módulos $G'$ y $G''$ a los 60 minutos                                          |                  |                   |                    |                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------------|
| Producto                                                                                 | Sol o gel a 4 °C | $G'$ a 37 °C (Pa) | $G''$ a 37 °C (Pa) | Sol o gel a 37 °C ( $G'$ versus $G''$ ) |
| Solución comercial (ácido hialurónico) "A"                                               | Suelo            | 0.1               | 1                  | Sol ( $G' < G''$ )                      |
| Solución comercial (ácido hialurónico) "B"                                               | Gel              | 40                | 38                 | Gel ( $G' > G''$ )                      |
| Solución comercial (ácido hialurónico) "D"                                               | Gel              | 640               | 120                | Gel ( $G' > G''$ )                      |
| Solución a base de CSS16 a una concentración de 1,2 % a pH 7,5 (solución del ejemplo 12) | Suelo            | 16                | 1                  | Gel ( $G' > G''$ )                      |

[0266] Para las composiciones de la invención, por ejemplo, para la composición a base de quitosano succinamida y de GP a pH=7,5, el módulo  $G'$  cruza el módulo  $G''$  después de unos segundos, y  $G'$  es mayor que  $G''$  más allá del momento en que se produce el cruce, caracterizando una transición rápida de sol-gel a medida que el producto pasa de 4 °C a 37 °C.

[0267] Las composiciones comerciales a base de ácido hialurónico probadas no son termogelificables.

20

**Ejemplo 11 - Efecto de la inyección intraarticular de una solución de quitosano succinamida en el conejo después de la sección transversal del ligamento anterior**

[0268] La solución de este ejemplo es una solución esterilizada que comprende 1,2 % (m/m) de quitosano succinamida de un grado de sustitución de 15 % y de masa molecular "media" (N. ° CSS16 de la Tabla 2), 3,5 % (m/m) de GP, 0,4 % (m/m) de D-manitol y 11 mmol/l de acetato de sodio trihidrato. La solución se esteriliza con vapor en autoclave, la concentración se ajusta por dilución en un factor de 1,33, luego la solución se envasa en una jeringa. Después de la esterilización y la dilución, el pH es 7,5, la osmolalidad es de 380 mosm/kg y la viscosidad dinámica aparente es de 126 mPa.s a 9 °C.

30

[0269] Una sección transversal del ligamento anterior, llamada "transección del ligamento cruzado anterior (TLCA)" en conejos da lugar de una manera coherente y bien documentada a cambios sintomáticos de la osteoartritis (OA), a saber, fisuras de cartílago, lesiones y la inflamación membrana sinovial significativa sin pérdida de cartílago en toda la altura de la articulación. Este modelo se utiliza en particular para estudiar los efectos de nuevas terapias como los viscosuplementos inyectados intraarticularmente en la estructura del cartílago, pudiendo ser las lesiones de partida de origen y naturaleza muy variables (en Laverty *et al.* Osteoarthr Cartil, 2010; Edouard *et al.* Phys Ther Sport, 2013; Mainil-Varlet *et al.* Cartilage, 2013; Oprenyeszk *et al.* Osteoarthr Cartil, 2013).

[0270] En este modelo, la erosión del cartílago aparece a las 4 semanas después de la intervención quirúrgica, consistiendo en la realización de una transección del ligamento anterior de la rodilla derecha. Se recomienda que el estudio se realice durante un período de hasta 8 semanas después de la operación, lo cual permite obtener una erosión del cartílago en al menos el 40 % de los cóndilos femorales. La inyección intraarticular del producto a analizar se realiza antes de la aparición de los primeros signos de osteoartritis, es decir, 1 semana después de la cirugía en la rodilla sometida a la transección. Se inyectaron en la rodilla derecha de los 10 animales del grupo de prueba 600 µl de la solución termogelificable de prueba. La rodilla derecha de los 9 animales del grupo de "control" recibió una inyección de 600 µl de solución salina al 0,9 %. Los productos se inyectan en la articulación de la rodilla de los conejos a través de una jeringa con una aguja de calibre 22.

45

**[0271]** La capacidad del producto se caracteriza por ralentizar o detener la progresión de la artrosis inducida por cirugía mediante el examen de varios indicadores macroscópicos, histológicos y radiológicos caracterizados según las puntuaciones recomendadas por el OARSI (en Lavery *et al.* Osteoarthritis Cartil 2010). Los resultados de la radiología conjunta se evalúan según la escala de Kellgren & Lawrence, en función de la presencia de osteofitos y del espacio interarticular.

**[0272]** El estudio es doble ciego, es decir, ni el cirujano que realiza la operación, ni la inyección de los productos de prueba, ni las personas que hacen las observaciones macroscópicas durante la vida de los animales y en el momento de su eutanasia, ni aquellos que analizan los resultados macroscópicos o histológicos y establecen los cálculos estadísticos conocen la correspondencia entre los números de los animales y los grupos por producto probado. Esta correspondencia solo se comunica una vez que los cálculos han sido completados y redactados por una persona independiente. Los resultados se informan en las tablas 11 a 13.

**[0273]** En comparación con la inyección de solución salina, la inyección de la solución termogelificable HG permite reducir estadísticamente significativamente todos los indicadores de la osteoartritis a 8 semanas, tal y como se demuestra por una reducción en el espacio interarticular y la presencia de osteofitos visibles mediante examen radiológico (Tabla 12, según la escala de Kellgren y Lawrence), la disminución de la gravedad y el tamaño de las lesiones del cartílago que aparecen en el lateral de las articulaciones (Tabla 13) y la disminución de los infiltrados inflamatorios de la membrana sinovial (Tabla 14). No se detectó ningún efecto secundario indeseable de la solución termogelificable en comparación con el grupo de control, lo cual refleja la buena tolerancia del producto en las condiciones del estudio.

**Tabla 12.** Puntuación radiológica según la escala de Kellgren y Lawrence (de 0 a 4) para evaluar el espacio interarticular y la presencia de osteofitos (p-valor calculado por el procedimiento no paramétrico de la Prueba U de Mann-Whitney)

| <b>Puntuación radiológica según K&amp;L (0-4)</b>         | <b>Solución salina</b> | <b>Solución termogelificable</b>                |
|-----------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------|
| Número de animales                                        | 9                      | 10                                              |
| N observación                                             | 9                      | 10                                              |
| Puntuación media                                          | 2,0                    | 0,0                                             |
| Puntuación mediana                                        | 1,8                    | 0,4                                             |
| Puntuación mínima                                         | 0,0                    | 0,0                                             |
| Puntuación máxima                                         | 3,0                    | 3,0                                             |
| Diferencia media                                          | 0,7                    | 0,6                                             |
| Diferencia entre los 2 grupos y el p-valor (probabilidad) | -                      | P-Valor estadísticamente significativo = 0,0079 |

**Tabla 13.** Puntuación macroscópica global para evaluar el tamaño y la gravedad de las lesiones de los compartimientos laterales del cartílago en las mesetas tibiales y los cóndilos femorales (p-valor calculado mediante el procedimiento no paramétrico de Prueba U de Mann-Whitney)

| <b>Puntuación macroscópica global (tamaño y gravedad de las lesiones)</b> | <b>Solución salina</b> | <b>Solución termogelificable</b>                |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------|
| Número de animales                                                        | 9                      | 10                                              |
| N observación                                                             | 18                     | 20                                              |
| Puntuación media                                                          | 32,0                   | 17,5                                            |
| Puntuación mediana                                                        | 32,8                   | 21,4                                            |
| Puntuación mínima                                                         | 3,0                    | 3,0                                             |
| Puntuación máxima                                                         | 68,0                   | 44,0                                            |
| Diferencia media                                                          | 13,4                   | 10,2                                            |
| Diferencia entre los 2 grupos y el p-valor (probabilidad)                 | -                      | P-Valor estadísticamente significativo < 0,0041 |

**Tabla 14-** Puntuación del infiltrado inflamatorio de la membrana sinovial evaluado por histología (p-valor calculado mediante el procedimiento no paramétrico de Prueba U de Mann-Whitney)

| <b>Puntuación del infiltrado inflamatorio (0-5)</b> | <b>Solución salina</b> | <b>Solución termogelificable</b> |
|-----------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Número de animales                                  | 9                      | 10                               |
| N observación                                       | 27                     | 28                               |
| Puntuación media                                    | 2,0                    | 1,4                              |

|                                                           |     |                                                 |
|-----------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------|
| Puntuación mediana                                        | 2,6 | 1,8                                             |
| Puntuación mínima                                         | 1   | 0,5                                             |
| Puntuación máxima                                         | 5   | 5,0                                             |
| Diferencia media                                          | 1,0 | 1,0                                             |
| Diferencia entre los 2 grupos y el p-valor (probabilidad) | -   | P-Valor estadísticamente significativo = 0,0011 |

## Ejemplos 12 - 24

**[0274]** En los ejemplos 12 a 24, se usaron los siguientes procedimientos y protocolos:

5

### Propiedades reológicas

**[0275]** Las propiedades reológicas se miden con un reómetro "Discovery Hybrid DHR-2" (TA Instrument; véase, por ejemplo, <http://www.tainstruments.com>), equipado con una placa Peltier (Peltier Plate) y una trampa de disolventes. La geometría utilizada es la placa de acero Peltier de 25 mm, y la distancia entre la placa y el Peltier es de 0,7 mm. Las mediciones se llevan a cabo a 37 °C, excepto para el experimento de barrido de temperatura descrito en el ejemplo 12. Las mediciones se llevan a cabo según los siguientes protocolos:

### Identificación de la región viscoelástica lineal por barrido de deformación

15

**[0276]** Primero se realiza una prueba de barrido de deformación para identificar la región lineal viscoelástica (LVER) de cada producto a 37 °C.

### Barrido de frecuencia en modo oscilatorio bajo

20

**[0277]** Se realiza un barrido de frecuencia entre 0,01rad/s y 100 rad/s en la región "LVER" de cada producto a una deformación de 0,9 %, con el modo oscilatorio de baja amplitud ("Small Amplitude Oscillatory Shear", SAOS) a 37 °C. Se miden las características siguientes en función de la frecuencia de barrido: módulo de elasticidad (G'), módulo de pérdida (G''), frecuencia de cruce de los módulos G' y G'' ("frecuencia de cruce") y viscosidad compleja ( $\eta^*$ ). En particular, se determina el valor del módulo de elasticidad G' a la frecuencia de 0,6 Hz, que corresponde a la frecuencia aplicada al líquido sinovial de la rodilla durante la marcha.

25

### Barrido de flujo

**[0278]** La viscosidad en reposo se determina mediante el barrido de flujo. El producto se equilibra durante 1 minuto a 37 °C. Se aplica una velocidad de cizallamiento de 0,001 s<sup>-1</sup> a 10 s<sup>-1</sup> para medir la viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento. A partir de la curva obtenida en este rango de velocidades de cizallamiento, la viscosidad en reposo se determina extrapolando el valor de la viscosidad de cizallamiento cero. En caso de que el coeficiente de correlación sea inferior a 0,98, se informa la viscosidad a la velocidad de cizallamiento más baja (0,001 s<sup>-1</sup>).

35

### Grado de sustitución (medición de RMN)

**[0279]** El grado de sustitución se determina en los siguientes ejemplos por espectrometría de resonancia magnética (RMN) del protón en solución acuosa, utilizando un espectrómetro de resonancia magnética, por ejemplo, un espectrómetro de 400 MHz Bruker. Las muestras se preparan de la siguiente manera: se disuelven de 5 a 6 mg de quitosano sustituido en 1 ml de agua deuterada. Se añaden 2 µl de ácido clorhídrico deuterado o de borato de sodio a la solución de quitosano sustituido para alcanzar un rango de pH adecuado para el análisis. El rango de pH apropiado depende de la naturaleza del sustituyente y puede ser de 8,5, por ejemplo, con borato de sodio y de entre 3 y 4 con HCl 12M. El espectro se registra a una temperatura de 70 °C, con una cantidad de escaneos que van de 64 a 256 y un tiempo de relajación que varía de 1 a 8 segundos. El espectro obtenido se desconvoluciona para determinar el valor de la integral de las áreas de las señales de interés para calcular el grado de sustitución del quitosano sustituido.

45

**[0280]** Los quitosanos sustituidos que se usaron en los ejemplos 12 a 24 se prepararon y caracterizaron según los procedimientos descritos anteriormente (Tabla 15). La masa molecular del quitosano se define por la viscosidad de una solución de concentración de quitosano al 1 % (m/m) en el ácido acético de concentración al 1 %

50

(v/v).

**Tabla 15** - Características de los quitosanos sustituidos y de los quitosanos precursores de los quitosanos sustituidos

| Quitosanos sustituidos |            | Quitosanos precursores |          |                          |
|------------------------|------------|------------------------|----------|--------------------------|
| Referencia             | DS (mol %) | Referencia             | Rango Mw | Viscosidad a 1 % (mPa.s) |
| Quitosano succinamida  |            |                        |          |                          |
| CSS20                  | 29**       | CS1                    | Medio    | 40                       |
| CSS21                  | 18*        | CS2                    |          | 60                       |
| CSS22                  | 19**       | CS3                    |          | 63                       |
| CSS23                  | 19**       |                        |          | 72                       |
| CSS24                  | 20**       | CS4                    |          | 78                       |
| CSS25                  | 20*        | CS5                    |          | 78                       |
| CSS26                  | 20*        |                        |          |                          |
| CSS27                  | 25*        |                        |          |                          |
| CSS28                  | 30*        |                        |          |                          |
| CSS29                  | 20**       |                        |          |                          |
| CSS30                  | 28**       | CS4                    |          | 72                       |
| Trimetilquitosano      |            |                        |          |                          |
| TMC8                   | 26**       | CS2                    | Medio    | 60                       |

\* Grado de sustitución estimado sobre la base del valor objetivo durante la reacción de sustitución; \*\* grado de sustitución medido por RMN del protón según el procedimiento descrito anteriormente.

\* Grado de sustitución estimado sobre la base del valor objetivo durante la reacción de sustitución; \*\* grado de sustitución medido por RMN del protón según el procedimiento descrito anteriormente.

5 **[0281]** En los siguientes ejemplos, las formulaciones de quitosano sustituido se preparan según el siguiente protocolo:

- Solubilizar el polvo de quitosano sustituido a la concentración deseada que contenga la concentración deseada de sorbitol o manitol;

10 - Agregar una solución madre de tampón de fosfato (100 mM) para obtener una osmolalidad de entre 280 y 400 mosm/kg;

- Agregar ácido acético glacial hasta que se alcance un pH de entre 7,2 y 8,5.

15 **[0282]** Todos los ejemplos siguientes se refieren a formulaciones esterilizadas en autoclave, excepto cuando se menciona "antes del autoclave", según el siguiente protocolo:

- Colocar la solución en un recipiente adecuado y esterilizarla en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

20 **[0283]** La Tabla 16 enumera las formulaciones de quitosano sustituido descritas en los ejemplos 12 a 22.

**Tabla 16** - Formulaciones de quitosano sustituido

| Formulación (referencia) | Quitosano sustituido |                       | Ácido hialurónico |                       | GP | Azúcar             |                       |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|----|--------------------|-----------------------|
|                          | Ref.                 | Concentración (% m/m) | Ref.              | Concentración (% m/m) |    | Manitol o sorbitol | Concentración (% m/m) |
| Quitosano succinamida    |                      |                       |                   |                       |    |                    |                       |
| 17-008                   | CSS29                | 2 %                   | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 16-27A                   |                      | 1,75 %                | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 16-27B                   |                      | 1,5 %                 | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 8-147D                   | CSS2                 | 2 %                   | /                 | /                     | /  | Manitol            | 0,5 %                 |
| 17-032-1                 | CSS26                | 2 %                   | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 17-032-2                 |                      | 1,25 %                | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 17-033C-1                | CSS27                | 2 %                   | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 17-033C-2                |                      | 1,25 %                | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 17-033B-1                | CSS28                | 2 %                   | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 17-033B-2                |                      | 1,25 %                | /                 | /                     | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |
| 8-145A                   | CSS25                | 2 %                   | /                 | /                     | /  | Manitol            | 0,5 %                 |
| 8-147B                   |                      | 2 %                   | /                 | /                     | /  | Manitol            | 0,5 %                 |
| 8-147C                   |                      | 2 %                   | /                 | /                     | /  | Manitol            | 0,5 %                 |
| 16-008A                  | CSS23                | 2 %                   |                   |                       | /  | Sorbitol           | 0,5 %                 |

|          |       |        |     |        |    |          |       |
|----------|-------|--------|-----|--------|----|----------|-------|
| 16-008B  |       | 2 %    | /   | /      | Sí | Sorbitol | 0,5 % |
| 14-084   | CSS29 | 1 %    | H34 | 1 %    | /  | /        | /     |
| 14-49A1  | CSS25 | 0,33 % | H34 | 1,67 % | /  | /        | /     |
| 14-49A3  |       | 0,5 %  |     | 1,5 %  | /  | /        | /     |
| 14-49A2  |       | 0,67 % |     | 1,33 % | /  | /        | /     |
| 14-49A4  |       | 1,0 %  |     | 1,0 %  | /  | /        | /     |
| 14-49A5  |       | 0,5 %  | H22 | 1,5 %  | /  | /        | /     |
| 14-49A6  |       | 1,0 %  |     | 1,0 %  | /  | /        | /     |
| 013-009  | CSS21 | 1 %    | /   | /      | Sí | /        | /     |
| 13-006E4 |       | 1,3 %  | /   | /      | Sí | /        | /     |
| 13-010   |       | 1,5 %  | /   | /      | Sí | /        | /     |

### Ejemplo 12 - Carácter termogelificante de las formulaciones a base de quitosano succinamida

[0284] Se lleva a cabo un barrido de temperatura para seguir la evolución de los módulos de elasticidad ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de diferentes formulaciones a base de quitosano succinamida en función de la temperatura (Tabla 17), usando el reómetro "Discovery Hybrid DHR-2" (TA Instrument) equipado con un Peltier y una geometría de tipo placa paralela de acero de 25 mm, con una distancia de 0,7 mm. El aumento de temperatura va precedido por un pre-cizallamiento para normalizar las diferencias entre muestras durante la introducción de la muestra en el reómetro. La deformación, la velocidad de aumento de la temperatura y la frecuencia se ajustan para cada muestra ensayada (Tabla 17).

**Tabla 17** - Módulo de elasticidad ( $G'$ ) y módulo de pérdida ( $G''$ ) de formulaciones a base de quitosano succinamida a diferentes temperaturas

| Referencia (formulación) | Precizallamiento (frecuencia, duración) | Deformación (%) | Frecuencia (rad/s) | Aumento de la temperatura (°C/min) | $G'$ ; $G''$ (Pa) |            |            |            |            |
|--------------------------|-----------------------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|
|                          |                                         |                 |                    |                                    | 5°C               | 10°C       | 20°C       | 25°C       | 37°C       |
| 17-008                   | 10 rad/s                                | 250 %           | 2,5                | 5                                  | $G' = 29$         | $G' = 34$  | $G' = 43$  | $G' = 47$  | $G' = 54$  |
|                          | 30s                                     |                 |                    |                                    | $G'' = 23$        | $G'' = 32$ | $G'' = 23$ | $G'' = 25$ | $G'' = 36$ |
| 16-27A                   | 25 rad/s                                | 160 %           | 3                  | 5                                  | $G' = 9$          | $G' = 10$  | $G' = 14$  | $G' = 16$  | $G' = 23$  |
|                          | 90s                                     |                 |                    |                                    | $G'' = 7$         | $G'' = 7$  | $G'' = 6$  | $G'' = 6$  | $G'' = 7$  |
| 16-27B                   | 25 rad/s                                | 160 %           | 3                  | 5                                  | $G' = 6$          | $G' = 8$   | $G' = 11$  | $G' = 13$  | $G' = 21$  |
|                          | 90s                                     |                 |                    |                                    | $G'' = 7$         | $G'' = 7$  | $G'' = 6$  | $G'' = 5$  | $G'' = 5$  |
| 14-084                   | 20 rad/s                                | 25 %            | 0,1                | 1,5                                | $G' = 46$         | $G' = 51$  | $G' = 52$  | $G' = 52$  | $G' = 62$  |
|                          | 120s                                    |                 |                    |                                    | $G'' = 51$        | $G'' = 50$ | $G'' = 48$ | $G'' = 47$ | $G'' = 42$ |

[0285] Se entiende a partir de este ejemplo que para todas las formulaciones a base de quitosano succinamida probadas, el módulo de elasticidad  $G'$  pasa a ser superior al módulo de elasticidad  $G''$  a partir de una cierta temperatura, lo cual muestra el carácter termogelificante de las formulaciones. La temperatura a la que  $G'$  cruza  $G''$  varía dependiendo de la composición de la formulación y las características moleculares del quitosano succinamida.

### Ejemplo 13 - Formulaciones de baja concentración de quitosano sustituido, para inyección a través de

**agujas muy finas (29G y 30G)**

**[0286]** Los módulos de elasticidad ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de las formulaciones que contienen quitosano sustituido (succinamida y trimetilo) se miden usando un reómetro ARES con una geometría Peltier "cono-placa" a una distancia de 50 micras y un ángulo de 0,04 radianes a una frecuencia de 10 Hz a 37 °C, con una deformación del 3 %, según el procedimiento descrito anteriormente. (Tabla 18a) La viscosidad dinámica se mide usando un viscosímetro móvil rotatorio (Brookfield) como se describe anteriormente. (Tabla 18a) la fuerza requerida para la inyección de las formulaciones a través de agujas de calibre 29 y 30 se mide como se ha descrito previamente.

10

**Tabla 18a - Propiedades reológicas y viscosidad**

| Formulación (referencia) | Tipo      | Gel ( $G' > G''$ ) | $G'$ a 900s (Pa) | Viscosidad dinámica (mPa.s) |
|--------------------------|-----------|--------------------|------------------|-----------------------------|
| 13-009                   | CSS 1 %   | Gel después de 40s | 100              | 439                         |
| 13-006E4                 | CSS 1,3 % | Gel                | 153              | 744                         |
| 13-010                   | CSS 1,5 % | Gel                | 95               | 1621                        |
| 13-008                   | TMC 1,1 % | Gel                | 70               | 241                         |
| 13-006F4                 | TMC 1,3 % | Gel                | 137              | 418                         |

**Tabla 18b - Inyectabilidad (fuerza precisa para la inyección) en Newton**

| Ref.     | Tamaño de la aguja |                     |
|----------|--------------------|---------------------|
|          | 29G                | 30G                 |
|          | De paredes finas   | De paredes normales |
| 13-009   | 3,6N               | 7,5N                |
| 13-006E4 | 6N                 | 11N                 |
| 13-010   | 5,75N              | 12,5N               |
| 13-008   | 2,7N               | 5,5N                |
| 13-006F4 | 4,1N               | 8,9N                |

**[0287]** Es evidente que se obtienen formulaciones fácilmente inyectable a través de agujas muy finas, adaptadas, por ejemplo, para inyección subcutánea, intradérmica o micro-inyecciones a nivel de la epidermis, en particular para el rejuvenecimiento de la piel, o inyecciones intracamerulares para oftalmología, manteniendo las propiedades de gel con buena elasticidad y viscosidad.

20

**Ejemplo 14 - Propiedades reológicas de viscosuplementos comerciales**

**[0288]** Se miden las propiedades reológicas de los productos comerciales a base de ácido hialurónico de tipo no reticulado (VS1 y VS2) o reticulado por enlaces covalentes (VS3) para la viscosuplementación, mediante un reómetro "Discovery Hybrid DHR-2" (TA Instrument) a 37 °C en modo oscilatorio, según el procedimiento descrito anteriormente. Se determina la frecuencia de cruce (del inglés "crossover") entre los módulos  $G'$  y  $G''$ , el valor de  $G'$  a una frecuencia de 0,6 Hz, que corresponde a la frecuencia de marcha. Se determina la viscosidad en reposo en modo de barrido de flujo, según el procedimiento descrito anteriormente

25

**Tabla 19 - Propiedades reológicas de viscosuplementos comerciales**

| Referencia | Tipo de reticulación   | Concentración HA | Frecuencia de cruce (Hz) | $G'$ a 0,6Hz (Pa) | Viscosidad en reposo (Pa.s) |
|------------|------------------------|------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------------|
| VS1        | Sin reticulación       | 2 %              | 5,2 Hz                   | 114               | 212                         |
| VS2        | Sin reticulación       | 1 %              | Sin cruce                | 0,05              | 7                           |
| VS3        | Reticulación covalente | 0,8 %            | Sin cruce                | 114               | 835                         |

30

**[0289]** Se entiende a partir de este ejemplo que el comportamiento reológico de los viscosuplementos a base de ácido hialurónico depende de su composición y las características moleculares del ácido hialurónico, especialmente, de la estructura reticulada por enlaces covalentes o no covalentes.

**Ejemplo 15 - Formulaciones de quitosano succinamida con diferentes concentraciones de glicerofosfato**

**[0290]** Se miden las propiedades reológicas de las formulaciones a base de quitosano succinamida de masa molecular "media" (referencia CSS25) a una concentración de 2 % (m/m) y glicerofosfato (GP) de concentración variable, utilizando el reómetro "Discovery Hybrid DHR-2" (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente (Tabla 20).

**Tabla 20** - Propiedades reológicas de formulaciones a base de quitosano succinamida al 2 % (m/m) en función de la concentración de GP

| Formulación (referencia) | GP % (m/m) | G'>G" a 0,6Hz | Frecuencia de cruce | G' a 0,6Hz (Pa) | Viscosidad en reposo (mPa.s) |
|--------------------------|------------|---------------|---------------------|-----------------|------------------------------|
| 8-145A                   | 4 %        | Sí            | Sin cruce           | 526             | 8160                         |
| 8-147B                   | 2 %        |               |                     | 298             | 29000                        |
| 8-147C                   | 1 %        |               |                     | 164             | 14460                        |
| 8-147D                   | 0 %        |               |                     | 184             | 12034                        |

10 **[0291]** Este ejemplo muestra que:

- Una solución de quitosano succinamida con un grado de sustitución del 20 % y una masa molecular de tipo "medio" puede formar un gel sin la adición de GP;
- La cohesión del gel se puede incrementar mediante la adición de GP en concentración creciente;

15 - La capacidad de lubricación (viscosidad en reposo) alcanza un máximo al aumentar la proporción en GP.

**Ejemplo 16 - Formulaciones a base de quitosano succinamida de grado de sustitución y concentración variable**

20 **[0292]** Las soluciones de quitosano succinamida de concentración variable se preparan según se ha descrito previamente, a partir de quitosano succinamida de grado de sustitución (DS) diferente (referencia CSS26, CSS27, CSS28) y de la misma masa molecular ("media"), sin GP. Se miden las propiedades reológicas de las formulaciones usando el reómetro "Discovery Hybrid DHR-2" (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente (Tabla 21).

25

**Tabla 21** - Propiedades reológicas de las formulaciones a base de quitosano succinamida en función del DS

| Formulación (referencia) | Concentración (% m/m) | CSS (referencia) | DS* (mol %) | G'>G" a 0,6Hz | G' 0,6Hz (Pa) | Viscosidad en reposo (mPa.s) | Frecuencia de cruce |
|--------------------------|-----------------------|------------------|-------------|---------------|---------------|------------------------------|---------------------|
| 17-032-1                 | 2 %                   | CSS26            | 20 %        | Sí            | 299           | 10500                        | Sin cruce           |
| 17-032-2                 | 1,25 %                |                  |             |               | 58            | 3400                         |                     |
| 17-033C-1                | 2 %                   | CSS27            | 25 %        |               | 52            | 2500                         |                     |
| 17-033C-2                | 1,25 %                |                  |             |               | 9             | 200                          |                     |
| 17-033B-1                | 2 %                   | CSS28            | 30 %        |               | 30            | 1000                         |                     |
| 17-033B-2                | 1,25 %                |                  |             |               | 10            | 130                          |                     |

\*DS estimado según se ha descrito previamente

**[0293]** Parece que:

- 30 - Se obtienen geles para todas las formulaciones preparadas a base de CSS de DS de 20, 25 y 30 %;
- Se modulan la cohesión y la viscosidad en reposo variando el DS y la concentración en CSS, para una misma masa molecular (media).

**Ejemplo 17 - Formulaciones a base de quitosano succinamida y ácido hialurónico**

35

**[0294]** Se prepara una solución de quitosano succinamida (referencia CSS25) al 2 % (m/m) según se ha descrito previamente. Se prepara una solución de ácido hialurónico (HA) a 2 % (m/m) disolviendo el HA y el manitol en un tampón de fosfato, para obtener una osmolaridad de entre 280 y 400 mosm/kg y un pH de entre 7,2 y 8,5. Se utiliza un HA de alto peso molecular (referencia H34, viscosidad intrínseca de 3 m<sup>3</sup>/kg, proporcionada por el fabricante) o de peso molecular bajo (referencia H22, viscosidad intrínseca de 1,55 m<sup>3</sup>/kg). Las soluciones se mezclan a continuación en diferentes proporciones por masa. Se esterilizan en autoclave según se ha descrito previamente. Se miden las propiedades reológicas de las formulaciones usando el reómetro "Discovery Hybrid DHR-

40

2" (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente (Tabla 22).

**Tabla 22** - Propiedades reológicas de formulaciones a base de quitosano succinamida y ácido hialurónico

| Formulación (referencia) | HA (referencia) | Conc. CSS m/m) | en (%, | Conc. en HA (% m/m) | Frecuencia de cruce | G' a 0,6Hz (Pa) | Viscosidad dinámica a 0,6Hz (mPa.s) |
|--------------------------|-----------------|----------------|--------|---------------------|---------------------|-----------------|-------------------------------------|
| 8-147D                   | /               | 2,0 %          | /      |                     | Sin cruce           | 650             | 164                                 |
| 49-A1                    | H34             | 0,33 %         |        | 1,67 %              | 1,2 Hz              | 48              | 19                                  |
| 49-A3                    |                 | 0,5 %          |        | 1,5 %               | 1,2 Hz              | 36              | 14                                  |
| 49-A2                    |                 | 0,67 %         |        | 1,33 %              | 1,1 Hz              | 35              | 14                                  |
| 49-A4                    |                 | 1,0 %          |        | 1,0 %               | Sin cruce           | 47              | 15                                  |
| 49-A5                    | H22             | 0,5 %          |        | 1,5 %               | 13                  | 7               | 5                                   |
| 49-A6                    |                 | 1,0 %          |        | 1,0 %               | 0,1                 | 13              | 5                                   |

- 5 [0295] Se entiende a partir de los resultados que las propiedades reológicas de los geles formados por la mezcla CSS y HA pueden modularse con la concentración, la proporción entre CSS y HA y la viscosidad intrínseca del HA. El HA de alta viscosidad permite obtener el gel con mayores G' y viscosidad dinámica a la frecuencia de marcha (0,6 Hz). Además, bajo ciertas condiciones, no hay cruce de los módulos G' y G'', lo cual muestra que se forma un gel independientemente de la frecuencia de cizallamiento.

10

#### **Ejemplo 18 - Sinergia con el líquido sinovial de la rodilla de pacientes con artrosis**

[0296] Con su consentimiento, se saca líquido sinovial (SF) de cuatro pacientes adultos voluntarios con osteoartritis de la rodilla antes de la implantación de una prótesis (SF1 a SF4). Se mezcla con diferentes soluciones a base de quitosano succinamida o con diferentes viscosuplementos comerciales en una relación másica de 1/1, y luego se miden las propiedades reológicas de las mezclas mediante un reómetro "Discovery Hybrid DHR-2" (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente (Tabla 23).

15

20 **Tabla 23** - Propiedades reológicas del líquido sinovial de la rodilla de cuatro pacientes con osteoartritis, y formulaciones de quitosano succinamida o viscosuplementos comerciales, antes y después de la mezcla con el líquido sinovial a una relación de volumen de 50/50 (v/v).

| Formulación (referencia) | Formulación sola                  |                             | Formulación mezclada con líquido sinovial |                                  |                                   |                             |                          |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
|                          | G' a una frecuencia de 0,6Hz (Pa) | Viscosidad en reposo (Pa.s) | SF (referencia)                           | G'>G'' a una frecuencia de 0,6Hz | G' a una frecuencia de 0,6Hz (Pa) | Viscosidad en reposo (Pa.s) | Frecuencia de cruce (Hz) |
| /                        | /                                 | /                           | SF1                                       | Sí                               | 3                                 | ND                          | 0,04Hz                   |
| /                        | /                                 | /                           | SF2                                       | Sí                               | 1                                 | ND                          | 0,3Hz                    |
| /                        | /                                 | /                           | SF3                                       | Sí                               | 0,8                               | 7                           | 0,4Hz                    |
| /                        | /                                 | /                           | SF4                                       | Sí                               | 1                                 | 1                           | 0,6Hz                    |
| VS1                      | 115                               | 210                         | SF2                                       | No                               | 10                                | 20                          | 1,9Hz                    |
| VS2                      | 0                                 | 7                           | SF2                                       | No                               | 0                                 | 20                          | 0,8Hz                    |
| VS3                      | 115                               | 830                         | SF2                                       | Sí                               | 9                                 | 90                          | Sin cruce                |
| 8-147D                   | 130                               | 2580                        | SF2                                       | Sí                               | 89                                | 11100                       |                          |
| 14-63B7                  | 150                               | 5400                        | SF4                                       | Sí                               | 41                                | 1400                        |                          |
| 8-145D                   | 30                                | 4200                        | SF1                                       | Sí                               | 12                                | 1500                        | Sin cruce                |
| 8-145C                   | 60                                | 5600                        | SF1                                       | Sí                               | 55                                | 6650                        |                          |
| 8-145A                   | 520                               | 8200                        | SF1                                       | Sí                               | 450                               | 64500                       |                          |

[0297] Este ejemplo muestra que:

- 25 - el líquido sinovial de pacientes con osteoartritis en la rodilla es un gel de bajas propiedades reológicas; los viscosuplementos y formulaciones a base de quitosano succinamida tienen propiedades superiores;
- los viscosuplementos a base de HA ven caer sus propiedades reológicas al diluirse con SF;
  - las formulaciones a base de CSS retienen sus propiedades de gel después de la dilución en el líquido sinovial;

- las formulaciones a base de CSS tienen propiedades reológicas mejoradas gracias a la mezcla con el líquido sinovial de un adulto voluntario con osteoartritis, en contraste con los viscosuplementos comerciales a base de HA reticulado o no. Probablemente haya una interacción con los componentes del líquido sinovial, por ejemplo, el ácido hialurónico o los agregados.

5

#### **Ejemplo 19 - Reproducibilidad de las formulaciones a base de quitosano succinamida a partir de varios lotes de quitosano succinamida**

**[0298]** Las soluciones de quitosano succinamida de concentración variable se preparan según se ha descrito anteriormente, a partir de diferentes lotes de CSS de grado de sustitución similar del 19 al 28 % (referencias CSS22, CSS24, CSS25, CSS29 y CSS30) y de masa molecular similar (media), sin GP. Se miden sus propiedades reológicas mediante un reómetro "Discovery Hybrid DHR-2" (TA Instrument) a 37 °C según los procedimientos descritos previamente, antes y después del tratamiento en autoclave (Tablas 24a y 24b).

15

**Tabla 24a - Antes del autoclave**

| Referencia CSS | DS (mol %) | Formulación (referencia) | Frecuencia de cruce (Hz) | G' a una frecuencia de 0,6Hz (Pa) | Viscosidad en reposo (Pa.s) |
|----------------|------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| CSS25          | 20         | 2 (008-147E)             | Sin cruce                | 170                               | 12300                       |
| CSS29          | 20         | 5 (016-013A)             |                          | 159                               | 8000                        |
| CSS30          | 28         | 1                        | ND                       | ND                                | ND                          |
| CSS24          | 20         | 3 (016-006B)             | Sin cruce                | 75                                | 3600                        |
| CSS22          | 19         | 4a (016-006C1)           |                          | 95                                | 4000                        |
|                |            | 4b (016-008A)            |                          | 106                               | 4800                        |

**Tabla 24b - Después del autoclave**

| Formulación (referencia) | Frecuencia de cruce | G' a una frecuencia de 0,6Hz (Pa) | Viscosidad en reposo (Pa.s) | inyectabilidad (aguja de calibre 27G, N) |
|--------------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|
| 2                        | ND                  | ND                                | ND                          | ND                                       |
| 5 (016-014A)             | Sin cruce           | 129                               | 6745                        | ND                                       |
| 1                        | ND                  | ND                                | ND                          | 9N                                       |
| 3 (016-010B)             | Sin cruce           | 133                               | 8400                        | 9N                                       |
| 4a (016-010C)            |                     | 167                               | 7800                        | 10N                                      |
| 4b (016-010D)            |                     | 109                               | 5500                        | 13N                                      |

**[0299]** Este ejemplo muestra que:

20

- El tratamiento en autoclave conserva el carácter del gel, el módulo de elasticidad y la viscosidad en reposo de las formulaciones;

- Las formulaciones con propiedades reológicas e inyectables similares se pueden preparar de forma reproducible a partir de varios lotes diferentes de CSS, provenientes estos últimos de quitosanos de diferentes lotes en el rango de

25

masa molecular "media".

#### **Ejemplo 20 - Inyectabilidad de formulaciones de quitosano succinamida y viscosuplementos comerciales**

**[0300]** Se mide la fuerza requerida para inyectar diferentes formulaciones a base de quitosano succinamida y viscosuplementos comerciales a través de agujas de inyección de diferentes tipos adaptadas a la inyección intraarticular, a temperatura ambiente según el procedimiento descrito anteriormente (Tabla 25). Los tamaños de los distintos tipos de agujas se definen en el ejemplo 23.

30

**Tabla 25 - Fuerza necesaria para inyectar las formulaciones mediante agujas par inyección de distintos tamaños (en Newton)**

35

| Formulación |                          | Tipo de aguja (de "paredes normales") |     |     |     |
|-------------|--------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|
|             |                          | 21G                                   | 22G | 25G | 27G |
| 017-008     | CSS 2 % (sin GP)         | 2,5                                   | /   | 5   | 9   |
| 014-084     | CSS1 % / HA 1 % (sin GP) |                                       | 4   | 8   | 13  |
| 016-008B    | CSS 2 % (con GP)         | /                                     | /   | /   | 13  |

|                              |     |     |   |    |                           |
|------------------------------|-----|-----|---|----|---------------------------|
| VS1                          | VS1 | 9   | / | /  | 20                        |
| VS2                          | VS2 | 2,5 | / | /  | 9                         |
| VS3                          | VS3 | 4   | 7 | 15 | Difícilmente inyectable * |
| * presencia de trozos de gel |     |     |   |    |                           |

**[0301]** Se entiende a partir de este ejemplo que las formulaciones de gel a base de quitosano succinamida son fácilmente inyectables mediante agujas finas a temperatura ambiente, presentando altas características reológicas a una temperatura fisiológica de 37 °C.

5

#### **Ejemplo 21 - Susceptibilidad a la degradación in vitro bajo estrés oxidativo**

**[0302]** En este ejemplo, las formulaciones a base de quitosano succinamida y viscosuplementos comerciales en condiciones de estrés oxidativo in vitro se usan para simular un entorno inflamatorio, según un protocolo adaptado de la publicación de Mendoza *et al.* (Carb Res 342, 96, 2007). El protocolo consiste en general radicales libres hidroxilo mediante la reacción de Fenton entre los iones cúpricos y el peróxido de hidrógeno, y de colocarlos en presencia de geles durante 24 horas a una temperatura de 37 °C. Se eliminan y se mide su módulo de elasticidad  $G'$  y su viscosidad dinámica para caracterizar el impacto de la incubación.

Brevemente, se colocan en un tubo de ensayo 800 µg de una formulación de gel a base de CSS o de un viscosuplemento comercial a base de HA. Se añaden 100 µg de una solución de EDTA de concentración 220 µM y 70 µg de una solución de sulfato de concentración 1 mM. La mezcla se homogeneiza y se incuba a 37 °C durante 24 horas. Se añaden 30 µg de una solución de peróxido de hidrógeno 0,03 M, luego se va tomando la solución a diferentes intervalos de tiempo y se miden las propiedades reológicas empleando un reómetro Discovery HR-2 (TA) a 37 °C según los procedimientos descritos anteriormente.

20 El módulo de elasticidad relativa ( $G'_R$ ) y la viscosidad dinámica relativa ( $\eta_R$ ) se calculan según las fórmulas 1 y 2, respectivamente:

Fórmula 1:  $G'_R = G' \text{ a tiempo } t / G' \text{ a tiempo cero} \times 100$  (tabla 26a)

25

Fórmula 2:  $\eta_R = \eta \text{ a tiempo } t / \eta \text{ a tiempo cero} \times 100$  (tabla 26b)

**Tabla 26a** - Módulo de elasticidad relativa ( $G'_R$ ) de los geles a una frecuencia de 0,6 Hz (3,98 rad/s), en función del tiempo de incubación en un medio oxidante

| Formulación (referencia) | Tipo                                       | 0 hr  | 2 hr  | 4 hr  | 24 hr |
|--------------------------|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 017-008                  | Gel CSS (2 %)                              | 100 % | 127 % | 125 % | 92 %  |
| 014-084                  | Gel CSS (1 %) / HA (1 %)                   | 100 % | 99 %  | 42 %  | 51 %  |
| VS1                      | Viscosuplemento a base de HA no reticulado | 100 % | 45 %  | 9 %   | 14 %  |
| VS3                      | Viscosuplemento a base de HA reticulado    | 100 % | 78 %  | 11 %  | 10 %  |

30 **Tabla 26b** - Viscosidad dinámica relativa ( $\eta_R$ ) de los geles en función del tiempo de incubación en un medio oxidante

| Formulación (referencia) | 0 hr  | 2 hr  | 4 hr  | 24 hr |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 017-008                  | 100 % | 129 % | 128 % | 92 %  |
| 014-084                  | 100 % | 99 %  | 46 %  | 51 %  |
| VS1                      | 100 % | 51 %  | 22 %  | 13 %  |
| VS3                      | 100 % | 86 %  | 14 %  | 10 %  |

**[0303]** Las formulaciones de gel a base de CSS son significativamente más resistentes a la degradación en un medio oxidante que las formulaciones comerciales a base de ácido hialurónico reticulado (VS2) o no reticulado (VS1), y conservan su capacidad de absorción de choques ( $G'$ ) y su poder lubricante ( $\eta$ ) durante un período de tiempo prolongado, de al menos 24 horas.

35

#### **Ejemplo 22 - Osmolalidad de soluciones acuosas de beta-glicerofosfato sódico**

**[0304]** Se disuelven 10 g de beta-glicerofosfato de sodio en 100 ml de agua de ósmosis. La solución se agita hasta la disolución completa, luego se diluye en diferentes concentraciones añadiendo agua. La osmolalidad de las soluciones se mide según el procedimiento anterior (Tabla 27).

40

**Tabla 27** - Osmolalidad de soluciones de beta-glicerofosfato de sodio (GP) en agua

| Concentración en GP (g/100 ml) | Osmolalidad (mosmol/kg) |
|--------------------------------|-------------------------|
| 2 %                            | 155                     |
| 4 %                            | 296                     |
| 6 %                            | 438                     |
| 7 %                            | 512                     |
| 8 %                            | 590                     |
| 9 %                            | 658                     |
| 10 %                           | 745                     |

**[0305]** De este modo, se observa que la osmolalidad aumenta con la concentración de glicerofosfato en tales composiciones. Por lo tanto, una composición que comprenda más del 10 % de glicerofosfato tendrá una osmolalidad por encima de la osmolalidad deseada para las aplicaciones contempladas en la presente invención.

En particular las publicaciones de YUHUA Chang *et al.*, (Preparation and properties of a novel thermosensitive N-trimethyl chitosane hydrogel (Preparación y propiedades de un hidrogel de quitosano N-trimetilo termosensible nuevo), Polymer Bulletin, Springer, Berlin, DE, 63, 531) y de WU J. *et al.* (A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate (Un hidrogel termosensible y sensible a pH compuesto de cuaternizado de quitosano/glicerofosfato), International Journal of Pharmaceutics, Elsevier, BV, NL, 315, No. 1-2, páginas 1-11) describen composiciones que comprenden más de un 10 % en masa de glicerofosfato. La osmolalidad de estas composiciones es, por lo tanto, superior a 700 mosmol/kg y muy superior a 500 mosmol/kg.

Se puede consultar, en particular, el documento sobre seguridad sanitaria del producto Nuflexxa® (Savient Pharmaceuticals, Inc., osmolalidad de 258-381 mosmol/kg) y de Negoro *et al.* (Effect of osmolality on glycosaminoglycan production and cell metabolism of articular chondrocyte under three-dimensional culture system ((Efecto de la osmolaridad en la producción de glicosaminoglicano y el metabolismo celular de los condrocitos articulares bajo sistema de cultivo tridimensional), Clinical and Experimental Rheumatology 2008, 26, 534-541) para la importancia del intervalo de osmolalidad. Una osmolalidad de aproximadamente 400 mosmol/kg es un valor terapéuticamente excelente porque ejerce una gran influencia sobre la proliferación de células tales como los condrocitos, los osteocitos y los fibroblastos.

#### **Ejemplo 23 - Diámetros de aguja para inyección**

Los tamaños de aguja de inyección están definidos por la norma ISO9262: 1991 y enmienda ISO9262:1991/Amd.1:2001(E). El diámetro externo se fija con una tolerancia en el valor (rango mínimo-máximo), mientras que el diámetro interno de las agujas depende del grosor de las paredes, que son de grosor normal ("normal-walled"), finas ("thin-walled") o extrafinas ("extra-thin-walled") dependiendo del tipo de aguja y las aplicaciones. La Tabla 28 muestra los diámetros exteriores (mín/máx) y los diámetros interiores mínimos de los tipos de agujas disponibles comercialmente.

**Tabla 28** - Rango de agujas de diferentes grosores para inyección y tolerancia de diámetros internos y externos según la norma ISO9262:1991/Amd.1:2001(E).

| Tipo (calibre)* | Tamaño (mm) | Diámetro externo (µm) |      | Diámetro interno (µm)  |            |                 |
|-----------------|-------------|-----------------------|------|------------------------|------------|-----------------|
|                 |             | Mín.                  | Máx. | Pared normal o Regular | Pared fina | Pared extrafina |
|                 |             |                       |      | Mín.                   | Mín.       | Mín.            |
| 32              | 0,23        | 229                   | 241  | 89                     | 105        | /               |
| 31              | 0,25        | 254                   | 267  | 114                    | 125        | /               |
| 30              | 0,30        | 298                   | 320  | 133                    | 165        | /               |
| 29              | 0,33        | 324                   | 351  | 133                    | 190        | /               |
| 28              | 0,36        | 349                   | 370  | 133                    | 190        | /               |
| 27              | 0,40        | 400                   | 420  | 184                    | 241        | /               |
| 26              | 0,45        | 440                   | 470  | 232                    | 292        | /               |
| 25              | 0,5         | 500                   | 530  | 232                    | 292        | /               |
| 24              | 0,55        | 550                   | 580  | 280                    | 343        | /               |
| 23              | 0,60        | 600                   | 673  | 317                    | 370        | 460             |
| 22              | 0,70        | 698                   | 730  | 390                    | 440        | 522             |
| 21              | 0,80        | 800                   | 830  | 490                    | 547        | 610             |

|                   |      |      |      |     |     |      |
|-------------------|------|------|------|-----|-----|------|
| 20                | 0,90 | 860  | 920  | 560 | 635 | 687  |
| 19                | 1,10 | 1030 | 1100 | 648 | 750 | 850  |
| 18                | 1,20 | 1200 | 1300 | 790 | 910 | 1041 |
| *para información |      |      |      |     |     |      |

#### Ejemplo 24 - Recomendaciones para los tipos de agujas de inyección

**[0307]** La Tabla 29 enumera los tipos de agujas que se recomiendan para la inyección de diversos productos comerciales para la reparación, el tratamiento o el llenado, por ejemplo, a nivel intraarticular para diversos productos comerciales de viscosuplementación, a nivel intradérmico o subcutáneo para productos comerciales de relleno dérmico, a nivel intradérmico superficial para productos comerciales para la regeneración de la piel, o a nivel intracamerular para oftalmología. Los diámetros externos e internos de estos distintos tipos de agujas se indican en el ejemplo 23.

**Tabla 29** - Tipos de agujas recomendados para la administración por inyección, según el lugar y el tipo de inyección y el producto en cuestión

| Producto                                                              | Tipo y lugar de inyección                       | Tamaño de aguja recomendado |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|
| Viscosuplemento intraarticular (VS1)                                  | Intraarticular/Rodilla                          | De calibre 19 a 21          |
| Viscosuplemento intraarticular (VS2)                                  | Intraarticular/Rodilla                          | De calibre 20               |
| Viscosuplemento intraarticular (VS3)                                  | Intraarticular/Rodilla                          | De calibre 18 a 20          |
| Viscosuplemento intraarticular (VS4)                                  | Intraarticular/Dedos                            | De calibre 19 a 25          |
| Reparación del cartílago por artroscopia*                             | Artroscopia/Rodilla, cadera                     | De calibre 18               |
| Relleno de arrugas a base de ácido hialurónico reticulado             | Intradérmico/Rostro                             | De calibre 25 a 27          |
| Relleno de arrugas a base de micropartículas biorreabsorbibles        | Intradérmico/Rostro                             | De calibre 26               |
| Rejuvenecimiento de la piel a base de ácido hialurónico no reticulado | Subcutáneo o intradérmico/Rostro, manos, cuello | De calibre 30 a 32**        |
| Antibioprofilaxis                                                     | Intracamerular/Cámara anterior del ojo          | 30G                         |

\*en: Stanish *et al.* 2006; \*\*por ejemplo, aguja tipo lápiz Micro-Fine™ Ultra 4mm (32G) comercializada por BD.

#### Ejemplo 25 - Prueba de esterilización con vapor

**[0308]** La solución de este ejemplo es una solución que comprende 1,2 % (m/m) de quitosano succinamida de grado de sustitución de 15 % y de masa molecular "media" (N. ° CSS16 de la Tabla 2), 3,5 % (m/m) de beta-glicerol fosfato de sodio, 0,4 % (m/m) de D-manitol y 11 mmol/l de acetato de sodio trihidrato (véase el ejemplo 11). Esta solución se esteriliza según el siguiente protocolo:

**[0309]** Colocar 400 ml de hidrogel en una botella de Schott y a continuación poner la muestra en un autoclave (modelo Systec DX-23) con un ciclo de líquido a 121 °C durante 20 minutos, según una operación de esterilización convencional recomendada en la norma ISO17665.

**Tabla 30. Características de una solución de quitosano succinamida antes y después de la esterilización con vapor**

|                                                                    | Antes de la esterilización | Después de la esterilización |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| pH                                                                 | 7,5                        | 7,51                         |
| Viscosidad dinámica aparente (Brookfield S18, 5 giros/min. a 8 °C) | 470 mPa.s                  | 370 mPa.s                    |
| Osmolalidad                                                        | 488 mosm/kg                | 507 mosm/kg                  |

**[0310]** Después de la esterilización, el hidrogel según la presente invención tenía un pH, una viscosidad y una osmolalidad bastante adecuados para su uso en humanos o animales, especialmente como una composición inyectable mediante una aguja. La medición de la osmolalidad se lleva a cabo según se ha descrito anteriormente.

**Ejemplo 26 - Ciclo de transición Sol-gel**

**[0311]** Las muestras se sometieron a un ciclo de esterilización según se ha descrito en el ejemplo 25. Varias muestras así esterilizadas se sometieron a una temperatura inicial de 4 °C. Dichas muestras son fluidas: cuando se las reintroduce en el tubo se constata visualmente que la solución es fluida en el interior del tubo. Las muestras se sometieron a continuación a un ciclo de gelificación colocándolas en una estufa durante una hora a 37 °C. Las muestras se gelificaron. La presencia de un gel se constata visualmente mediante la inversión del tubo: el gel no fluye.

Estas mismas muestras se enfrían y guardan una hora a una temperatura mínima de 4 °C. Las muestras son fluidas: cuando se las reintroduce en el tubo se constata visualmente que la solución es fluida en el interior del tubo.

Por lo tanto, las muestras pueden experimentar varias transiciones de sol-gel y, por lo tanto, tienen una reversibilidad de la transición sol-gel.

**[0312]** Las muestras se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación.

**Ejemplo 27 - Prueba de gelificación después de la esterilización**

**[0313]**

| <b>Tabla 31.</b>                             |                                         |                      |                |                                           |                |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------------------|----------------|
| Descriptivo                                  | Gelificación antes de la esterilización |                      |                | Gelificación después de la esterilización |                |
|                                              | pH                                      | Gelificación a 37 °C | Inyectabilidad | Gelificación a 37 °C                      | Inyectabilidad |
| Solución CsS/GP sodio                        | 8,2                                     | OK                   | OK             | OK                                        | OK             |
| Solución CsS hidrogel Na                     | 7,6                                     | OK                   | OK             | OK                                        | OK             |
| Solución CsS de control (sin esterilización) | 7,55                                    | OK                   | OK             | OK                                        | OK             |
| Solución CsS/GP sodio                        | 7,92                                    | OK                   | OK             | OK                                        | OK             |
| Solución CsS de control (sin esterilización) | 7,55                                    | OK                   | OK             | OK                                        | OK             |

**[0314]** La inyectabilidad se mide según se ha descrito previamente. Las soluciones se presentan bien en forma de gel a 37 °C.

**Ejemplo 28 - Prueba de contaminación microbiana**

**[0315]** Las composiciones termogelificables de la invención se introdujeron en jeringas de plástico para uso médico único y luego se esterilizaron con vapor según la esterilización descrita anteriormente. Luego se llevaron a cabo pruebas de crecimiento microbiano:

Las jeringas esterilizadas con las composiciones termogelificables se colocaron bien en agar Columbia con 5 % de sangre de oveja (agar COS) y PolyViteX agar Chocolate (agar PVX), bajo condiciones aeróbicas a 35 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, bien en tubos de tioglicolato (THIO) a 35 °C subcultivados en agar Columbia. No se detectó contaminación microbiana alguna: las pruebas de crecimiento resultaron todas negativas.

El ciclo de esterilización es por lo tanto adecuado para esterilizar composiciones termogelificables según la invención, por ejemplo, para uso inyectable en seres humanos o animales.

La invención se refiere, así, a los siguientes puntos:

**[0316]**

1.- Composición termogelificable esterilizada que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina substituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina y opcionalmente de las unidades de N-acetil-D-glucosamina substituidas.

2.- Composición termogelificable esterilizada, según el punto 1, caracterizada porque la transición sol-gel es reversible.

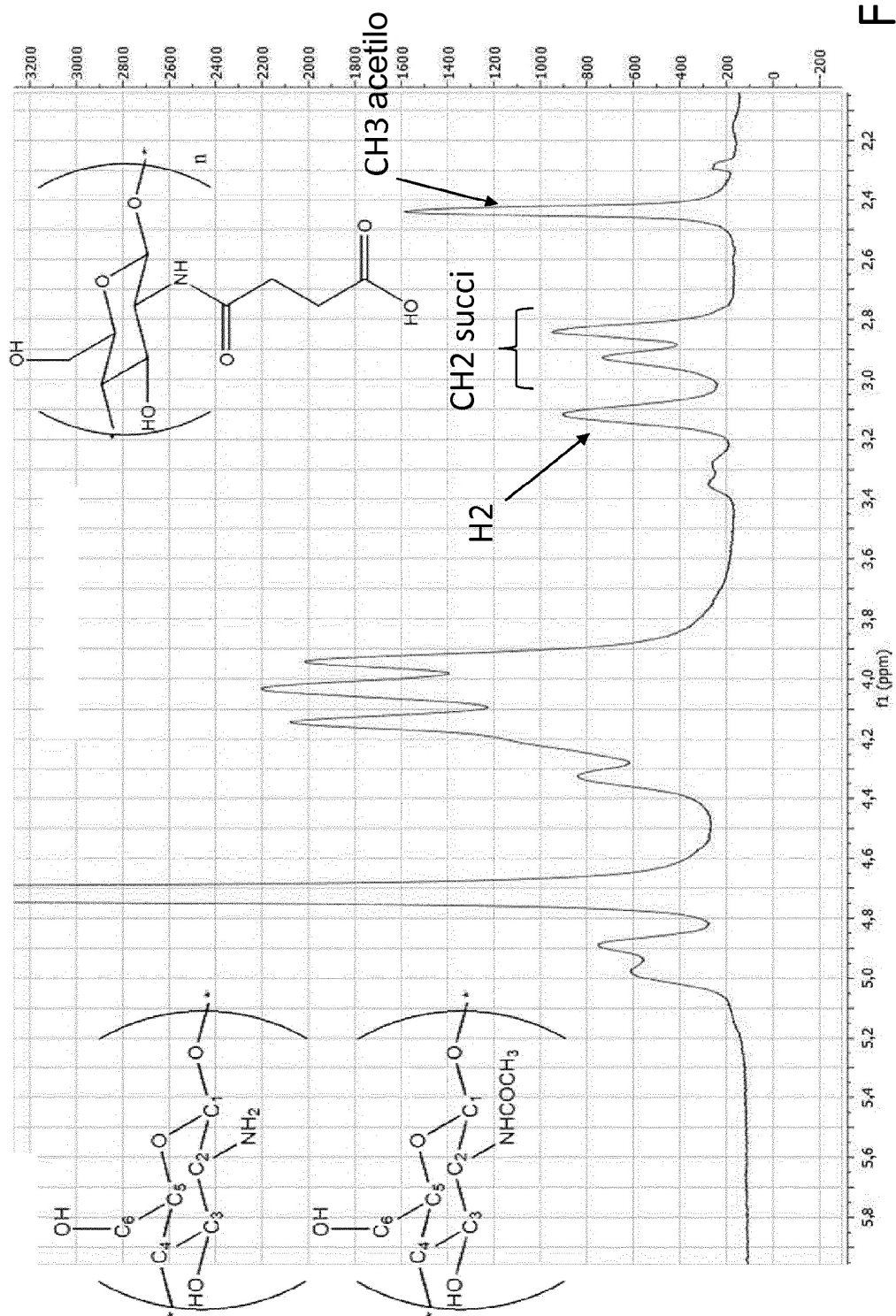
3.- Composición termogelificable esterilizada, según los puntos 1 o 2, caracterizada porque está esterilizada con vapor.

- 4.- Composición según cualquiera de los puntos 1 a 3, caracterizada porque no está gelificada después de la esterilización.
- 5.- Solución esterilizada que está constituida por o comprende una composición termogelificable según cualquiera de los puntos 1 a 4.
- 5 6.- Procedimiento para esterilizar una composición termogelificable, caracterizado porque comprende al menos las siguientes etapas:  
colocar en un autoclave una composición termogelificable que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina substituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina;
- 10 aumentar y mantener la temperatura del autoclave a una temperatura de esterilización de modo que, durante el período de esterilización, la temperatura y la duración de la esterilización sean suficientes para esterilizar la composición termogelificable;  
reducir la temperatura del autoclave;  
retirar la composición termogelificable esterilizada del autoclave.
- 15 7.- Procedimiento según el punto 6, caracterizado porque la temperatura de la cámara se mantiene a una temperatura superior a 60 °C, preferiblemente superior a 100 °C, preferiblemente superior a 120 °C.
- 8.- Procedimiento según los puntos 7 u 8, caracterizado porque el tiempo de esterilización es de al menos 3 minutos, preferiblemente de al menos 10 minutos, preferiblemente de al menos 15 minutos y más preferiblemente de al menos 20 minutos.
- 20 9.- Procedimiento según cualquiera de los puntos 6 a 8, caracterizado porque comprende uno o más ciclos de esterilización con vapor.
- 10.- Composición inyectable caracterizada porque comprende o consiste en una composición termogelificable según cualquiera de los puntos 1 a 6 u obtenible mediante un procedimiento tal y como se define en cualquiera de los puntos 7 a 9.
- 25 11.- Composición inyectable, según el punto 10, caracterizada porque se usa como una composición farmacéutica inyectable o un dispositivo médico inyectable o implantable.
- 12.- Composición según el punto 11, para uso para un procedimiento de tratamiento terapéutico que comprende la inyección subcutánea, intradérmica, intraocular o intraarticular de dicha composición, o para su uso para reparación o llenado de al menos un tejido corporal que requiera reparación o llenado.
- 30 13.- Composición según el punto 12, caracterizada porque el tejido corporal se selecciona a partir de tejidos que pertenecen a las cuerdas vocales, los músculos, los ligamentos, los tendones, el cartílago, los órganos sexuales, los huesos, las articulaciones, los ojos, la dermis o cualquiera de sus combinaciones, y más particularmente a las articulaciones.
- 14.- Composición según los puntos 12 o 13, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la artrosis, o la
- 35 reparación de un defecto del cartílago, por ejemplo, mediante inyección en el líquido sinovial o después de mezclarse con la sangre e implantación en el cartílago.
- 15.- Dispositivo médico, por ejemplo un implante médico, caracterizado porque comprende o consiste en una composición tal y como se define en cualquiera de los puntos 10 a 14.

## REIVINDICACIONES

1. La invención cubre especialmente una composición termogelificable esterilizada inyectable o implantable en el cuerpo humano o animal, y que comprende un quitosano sustituido que presenta unidades de N-acetil-D-glucosamina, unidades de D-glucosamina y unidades de D-glucosamina substituidas distintas de las unidades de N-acetil-D-glucosamina y opcionalmente de las unidades de N-acetil-D-glucosamina substituidas, comprendiendo dicha composición una concentración de quitosano sustituido inferior al 4 %.
2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende una transición sol-gel reversible.
3. Composición según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada porque** se encuentra en forma de gel acuoso.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** no incluye sal de glicerol fosfato.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** comprende un azúcar reductor, por ejemplo manitol o sorbitol.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** se encuentra en forma de gel antes de su uso y a temperatura de uso en el cuerpo humano o animal a pH neutro o a pH fisiológico, con una osmolalidad fisiológica adecuada para el uso deseado.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** presenta una osmolalidad de 200 a 650 mosm/kg.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** presenta un pH superior o igual a 7, por ejemplo, superior o igual a 7,1.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso como composición farmacéutica inyectable o dispositivo inyectable o implantable.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en un procedimiento de tratamiento terapéutico que comprenda la inyección por vía subcutánea, intradérmica, intraocular o intraarticular de dicha composición, o para su uso para la reparación o el llenado de al menos un tejido corporal que requiera reparación o llenado.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en un procedimiento de tratamiento de la artrosis, o la reparación de un defecto del cartílago, por ejemplo, mediante inyección en el líquido sinovial o después de su mezcla con la sangre e implantación en el cartílago.
12. Dispositivo de inyección **caracterizado porque** comprende una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Dispositivo médico, por ejemplo, un implante médico, **caracterizado porque** comprende o consiste en una composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
14. Artículo o envase que comprenden uno o varios dispositivos según las reivindicaciones 12 o 13.
15. Procedimiento de preparación de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y que comprende:
  - la disolución de un quitosano sustituido en una solución acuosa, preferiblemente agua, opcionalmente tamponada;
  - el eventual ajuste del pH a un pH fisiológico;
  - el eventual ajuste de la osmolalidad de la composición;
  - el eventual ajuste de la viscosidad de la composición.
16. Procedimiento de preparación de un dispositivo según las reivindicaciones 12 o 13, que comprende:

- la disolución de un quitosano sustituido en una solución acuosa, preferiblemente agua, opcionalmente tamponada;
  - el eventual ajuste del pH a un pH fisiológico;
  - el eventual ajuste de la osmolalidad de la composición;
  - el eventual ajuste de la viscosidad de la composición.
- 5 - el llenado de un dispositivo de inyección, como por ejemplo una jeringa, con la composición obtenida;
- el dispositivo de inyección, tal como, por ejemplo, una jeringa, puede someterse luego a esterilización con vapor,
  - el dispositivo, por ejemplo, una jeringa, puede embalsarse a continuación.



**FIG.1**