(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 728 686**

(51) Int. Cl.:

A61P 19/02	(2006.01)
A61K 8/60	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)
A61K 31/7016	(2006.01)
A61K 31/728	(2006.01)
A61P 27/04	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 31/167	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013** **PCT/FR2013/051380**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013** **WO13186493**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013** **E 13733396 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 2861301**

(54) Título: **Composición, en un medio acuoso, que comprende al menos un ácido hialurónico y al menos una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa**

(30) Prioridad:

13.06.2012 FR 1255543
13.06.2012 US 201261659140 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2019

(73) Titular/es:

LABORATOIRES VIVACY (100.0%)
44 rue Paul Valéry
75116 Paris, FR

(72) Inventor/es:

PIRON, ESTELLE y
BON BETEMPS, JÉRÉMIE

(74) Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

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).

ES 2 728 686 T3

DESCRIPCIÓN

Composición, en un medio acuoso, que comprende al menos un ácido hialurónico y al menos una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa.

El ácido hialurónico es utilizado desde hace más de quince años en el campo de la estética, en el que se ha demostrado su inocuidad y su eficacia. Actualmente, en el mercado de los geles de relleno para fines estéticos o "rellenadores", los geles a base de ácido hialurónico reticulado obtenidos mediante biofermentación son los productos más utilizados. En efecto, en el campo de la estética, los implantes no reabsorbibles se utilizan cada vez menos y los geles a base de otros polisacáridos se han abandonado ya sea por los efectos secundarios o bien debido a su origen animal que conlleva riesgos de contaminación vírica.

La utilización del ácido hialurónico obtenido mediante biofermentación en campos tales como el relleno de arrugas, la viscosuplementación, el tratamiento oftálmico o incluso el tratamiento de la incontinencia urinaria es aún más reconocido y apreciado debido a que, por su presencia natural en el cuerpo humano y, más en particular, en la dermis, el líquido sinovial y la córnea, minimizándose los riesgos debidos a los efectos secundarios.

Pero debido al hecho de que el ácido hialurónico está presente de forma natural en el cuerpo humano, existen unas enzimas endógenas que pueden ser susceptibles de degradarlo, como, por ejemplo, las hialuronidasas. Esta degradación viene ilustrada en el documento Iocono *et al*., *J. Ped. Surg*., Vol. 33, N.º 4, 1988, 564-567, que trata de la cicatrización de las heridas. Las hialuronidasas son unas enzimas que degradan el ácido hialurónico catalizando su hidrólisis en oligosacáridos de ácido hialurónico. Esta degradación tiene como efecto una disminución de la viscosidad del ácido hialurónico. Esta disminución de la viscosidad conlleva irremediablemente una disminución del tiempo de los efectos buscados en los campos del relleno de arrugas o de la viscosuplementación y, en consecuencia, unos tiempos de inyección más cortos a fin de restaurar los efectos, lo que puede ocasionar unas molestias o dolores al paciente.

Una primera solución para resolver este problema podría ser sustituir el ácido hialurónico por otros polisacáridos, menos sensibles a las hialuronidasas y naturalmente presentes en el cuerpo humano.

Entre los polisacáridos constitutivos de la Matriz Extracelular (MEC), podrían ser interesantes el sulfato de condroitina, el sulfato de dermatano y el sulfato de queratano.

En efecto, estos son responsables, en parte, junto con el ácido hialurónico de la hidratación de la piel y de su elasticidad, y su presencia natural en la dermis permite prever una tolerancia y una excelentes tolerancia y eficacia para un producto de relleno de arrugas, de rehidratación o de viscosuplementación.

Desafortunadamente, el sulfato de condroitina es de origen animal y ningún intento de síntesis del sulfato de condroitina mediante biofermentación, a día de hoy, ha permitido producir el mismo en unas cantidades compatibles con una explotación industrial. Ocurre lo mismo con el sulfato de dermatano y el sulfato de queratano, que sólo están disponibles industrialmente como productos de origen animal.

Otra solución que pretende disminuir la degradación del ácido hialurónico por parte de las hialuronidasas es proponer unas composiciones que comprendan, en combinación con el ácido hialurónico, un compuesto que posea propiedades inhibidoras de las hialuronidasas.

Los grupos sulfato son conocidos en la bibliografía por sus propiedades antioxidantes y antirradicalarias, por su gran capacidad de hidratación y también por su acción anti-hialuronidasa.

En cuanto a sus propiedades antioxidantes y antirradicalarias, éstos protegen a los glucosaminoglucanos (GAG) de la despolimerización por parte de las especies reactivas del oxígeno tal como se ha descrito en el documento Moseley R *et al*., *Biochim Biophys Acta*, (1995), 1244(2-3), 245-52.

En cuanto a su capacidad de hidratación, se ha demostrado, por ejemplo en el documento R. Servaty et al., *International Journal of Biological Macromolecules*, (2001), 28, 121-127, una mayor capacidad de absorción de las moléculas de agua por el sulfato de condroitina con respecto al ácido hialurónico debido a la presencia del grupo sulfato que lleva el sulfato de condroitina.

Por lo que se refiere a su acción anti-hialuronidasa, los polisacáridos sulfatados y, más particularmente, los glucosaminoglucanos totalmente O-sulfatados son conocidos por presentar una acción anti-hialuronidasa importante, por ejemplo del documento T. Toida *et al.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 370(2), 176-182. Los glucosaminoglucanos totalmente O-sulfatados descritos en esta publicación son el sulfato de condroitina, el sulfato de dermatano, el sulfato de heparina y el ácido hialurónico sulfatado. Los resultados obtenidos muestran que todos los glucosaminoglucanos totalmente O-sulfatados inhiben las hialuronidasas de una manera dependiente de la dosis y que el ácido hialurónico totalmente O-sulfatado es el mejor inhibidor de las hialuronidasas de entre los glucosaminoglucanos totalmente O-sulfatados ensayados. El inconveniente del ácido hialurónico totalmente O-sulfatado es que no puede ser reticulado.

Sin embargo, en el campo de la estética, más del 80 % de las composiciones son a base de ácido hialurónico reticulado y no es posible, por tanto, desarrollar un producto de relleno a base de ácido hialurónico no reticulado.

Se podría contemplar la incorporación de una pequeña cantidad de polisacárido sulfatado de origen

animal en una composición a base de ácido hialurónico, por ejemplo la solicitud de patente WO 03/041724, a nombre de Hermida, describe composiciones inyectables estériles a base de una mezcla de hialuronato de sodio y de sulfato de condroitina para fines intraarticulares.

Asimismo, en la solicitud de patente WO 2004/034980,a nombre de Marcum, se describen unas composiciones inyectables a base de ácido hialurónico, de sulfato de condroitina y de N-acetil-glucosamina para la regeneración del cartílago mediante inyección intraarticular.

El inconveniente de tales composiciones radica en el origen animal del sulfato de condroitina.

Por lo que se refiere a los polisacáridos sulfatados de origen sintético, se han descrito también ensayos de inhibición de las hialuronidasas en composiciones de ácido hialurónico por parte del sulfato de dextrano, por ejemplo, por K. Zimmermann, *J. Cancer Res. Clin. Oncol*., 1983, 105 págs. 189-190. La hidrólisis del ácido hialurónico según el método de Nelson se ha medido para unas composiciones que comprenden ácido hialurónico, hialuronidasas así como sulfato de dextrano con un peso molecular de 17,7 kDa a diferentes concentraciones. El sulfato de dextrano está descrito como un potente inhibidor de las hialuronidasas, y si las dosis activas para un sulfato de dextrano con un peso molecular de 17,7 kDa están alejadas de las dosis tóxicas, la toxicidad aumenta con el peso molecular, y solamente unas pocas moléculas de elevado peso molecular aumentan considerablemente la toxicidad, como ha sido demostrado por Walton, *Br. J. Pharmacol.*, 1954, 9: 1-14. Además, el sulfato de dextrano es descrito como un anticoagulante que se puede utilizar *in vivo* e *in vitro* tal como se ha descrito, por ejemplo, en la patente US 2715091 y estas propiedades anticoagulantes no son, *a priori*, compatibles con los usos como ingrediente de composiciones que son implantables.

Entre los polisacáridos de origen vegetal sulfatados, se conocen los carragenanos, si bien éstos son conocidos por provocar reacciones inflamatorias, hasta tal punto que sobre sus propiedades se basan modelos para ensayar los antiinflamatorios.

De la patente WO 03/000191, a nombre de Depuy, son conocidas también composiciones para el tratamiento de articulaciones artríticas que comprenden ácido hialurónico y un inhibidor de hialuronidasa como, por ejemplo, un polisacárido sulfatado como el sulfato de dextrano, el sulfato de xilosa o el sulfato de heparano, una parte de cuyos componentes está encapsulada en unos liposomas para asegurar la difusión controlada, aunque la utilización de liposomas en composiciones destinadas fundamentalmente a ser reticuladas parece difícil de contemplar.

Así, la mayor parte de los polisacáridos que se podrían utilizar a modo de aditivos para el ácido hialurónico con el fin de disminuir la acción de las hialuronidasas son de origen animal o bien presentan una toxicidad potencial, siendo éstas dos condiciones no compatibles con los usos contemplados.

Desde un punto de vista teórico, se podría contemplar la incorporación de sulfatos en una solución en forma de iones sulfato; no obstante, su difusión en el seno del tejido inyectado sería demasiado rápida, incluso inmediata y, por tanto, ineficaz en cuanto a las propiedades anti-hialuronidasas de las composiciones en el campo del relleno de arrugas o de la viscosuplementación. Así pues, es preferible seleccionar unos compuestos funcionalizados por unos grupos sulfato.

Otra posible solución es la utilización de compuestos sulfatados que pertenecen a las subfamilias de los monosacáridos sulfatados y de los oligosacáridos sulfatados.

Esta subfamilia de mono- u oligosacáridos sulfatados (formados por de 1 a 10 osas) es interesante ya que pueden estar fácilmente disponibles mediante síntesis, y su estructura glucídica se aproxima, sin embargo, a las de los glucosaminoglucanos que constituyen la matriz extracelular, y se metabolizan muy bien generando productos de degradación no tóxicos.

Por ejemplo, se han descrito galacto-oligosacáridos activos frente a las hialuronidasas en los trabajos publicados por Salmen *et al*., *Planta Medica*, 71 n.º 8, 2005, 727-732, particularmente la verbascosa, la planteosa y la neomicina, que presentan unas actividades anti-hialuronidasas de 100 a 500 veces más elevadas que la de la apigenina, la cual es un inhibidor conocido de la hialuronidasa.

Las propiedades anti-hialuronidasas de oligosacáridos totalmente O-sulfatados procedentes del ácido hialurónico son descritas igualmente en la técnica anterior tal como en el documento A. Suzuki *et al*., *Glycobiology,* 2001, 11(1), págs. 57-64. Se ha demostrado una correlación entre la inhibición de las hialuronidasas por los oligosacáridos O-sulfatados procedentes del ácido hialurónico, su grado de funcionalización con grupos sulfato y su tamaño. Es más particularmente, mencionado que la actividad inhibidora de estos oligosacáridos O-sulfatados está asociada a su tamaño.

Existen igualmente monosacáridos sulfatados tales como las glucosaminas sulfatadas como, por ejemplo, la glucosamina-3-sulfato descrita como inhibidor de la degradación del cartílago por J.I. Fenton *et al*., *Osteoarthritis and Cartilage*, Volumen 8, Número 6, 2000, 444-451.

Entre los oligosacáridos se encuentra también la sacarosa, formada por la condensación de 2 osas, una glucosa y una fructosa.

El uso de esta sacarosa en forma sulfatada, al igual que otros oligosacáridos sulfatados, es descrito como agente de promoción de la cicatrización de heridas mediante aplicación tópica, en solución o en unas matrices de colágeno o a base de alcohol polivinílico en la patente EP 0 230 023 a nombre de Marion Laboratories.

En las patentes WO 89/05646 y EP 0640346 a nombre de Bar-Shalom, se describen unas composiciones que comprenden sales de octasulfato de sacarosa y, más particularmente, ejemplos

con la sal de aluminio de octasulfato de sacarosa, la cual es una sal insoluble, destinadas a aplicaciones tópicas o inyecciones en los tejidos incluidas las articulaciones. Las sales de octasulfato de sacarosa son utilizadas más particularmente por sus propiedades cicatrizantes. En el marco de la aplicación en cicatrización, se puede utilizar también el ácido hialurónico como principio activo que favorece la cicatrización.

De la patente WO 98/22114 a nombre de Dumex-Alpharma son conocidas composiciones que comprenden un complejo formado entre un polisacárido, tal como el quitosano o el ácido hialurónico, y un oligosacárido sulfatado tal como el octasulfato de sacarosa o una de sus sales. Estas composiciones, también en este caso, son destinadas a favorecer la cicatrización de heridas de tejidos que comprenden colágeno tales como la piel, los huesos y las mucosas. La formación del complejo se caracteriza mediante diferentes técnicas tales como, por ejemplo, las espectroscopías de RMN e infrarroja, la difracción de los rayos X, la termografía y los ensayos de solubilidad en unas condiciones definidas.

La fabricación de composiciones destinadas a ser implantadas o inyectadas implica que éstas sean esterilizadas durante sus procesos de fabricación a fin de cumplir las exigencias sanitarias mínimas para tales composiciones. El procedimiento de esterilización más extendido en los procesos de fabricación de tales composiciones es la esterilización al vapor o esterilización en autoclave y tal procedimiento puede degradar los productos que constituyen las composiciones. Por tanto, es indispensable que se conserven y se mantengan las propiedades reológicas, de pH métricas y de biocompatibilidad durante la esterilización en autoclave. Lo mismo ocurre con las exigencias de inyectabilidad a través de agujas finas, que es su modo principal de puesta en práctica.

Los ensayos han demostrado de forma totalmente sorprendente e inesperada que los geles de ácido hialurónico formulados con las sales hidrosolubles de octasulfato de sacarosa (SOS), entre todos los candidatos posibles, son los únicos que permiten obtener unas composiciones estables durante la esterilización al vapor, denominada también esterilización en autoclave, y que estos presentan, además una mayor duración debido a su resistencia a la degradación por parte de las hialuronidasas, con respecto a los geles que comprenden ácido hialurónico sin la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa.

La sal hidrosoluble del octasulfato de sacarosa posee 8 grupos sulfato por molécula de sacarosa, así, en el gel formulado con la sal hidrosoluble del octasulfato de sacarosa, la cantidad de sulfatos añadida por mg de SOS es importante. La solicitante igualmente ha demostrado de manera también sorprendente que la adición de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa en geles a base de ácido hialurónico no conlleva una reducción de la viscosidad o de la elasticidad del gel durante la esterilización.

En la presente invención, la solicitante se propone resolver el problema de la degradación por parte de las hialuronidasas de composiciones que comprenden ácido hialurónico mediante la adición de una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa, conservando al mismo tiempo la aptitud de estas composiciones para ser utilizadas en el campo del relleno de arrugas, de la viscosuplementación, de formulaciones cosméticas o farmacéuticas, debido a la estabilidad de sus propiedades reológicas durante la fase de esterilización al vapor a lo largo del proceso de fabricación.

La presente invención permite resolver el conjunto de problemas anteriormente citados y permite, además, obtener unas composiciones de acuerdo con la invención que conservan sus propiedades reológicas durante la esterilización en autoclave y que tienen una duración superior (un tiempo de semivida superior) con respecto a las composiciones de la técnica anterior.

La presente invención se refiere a una composición esterilizada que comprende al menos un ácido hialurónico, reticulado o no reticulado, o una de sus sales, y al menos una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa, a los procedimientos de fabricación de dicha composición así como a la utilización de dicha composición para la formulación de una composición de viscosuplementación, o para la formulación de una composición para el relleno de arrugas, para la formulación de una composición cosmética o para la formulación de una composición farmacéutica.

La composición de acuerdo con la presente invención posee unas propiedades de resistencia a las hialuronidasas y está caracterizada por unas propiedades reológicas conservadas tras la esterilización al vapor y al menos similares a las de una composición que comprende solamente al menos un ácido hialurónico, reticulado o no reticulado, o una de sus sales. La presente invención se refiere igualmente a una formulación cosmética que comprende la composición de acuerdo con la invención y al menos un excipiente cosméticamente aceptable.

De modo sorprendente, la presente invención permite obtener unas composiciones resistentes a las hialuronidasas que responden a las exigencias de estabilidad a la esterilización en autoclave de las composiciones destinadas a los campos previamente citados.

La presente invención se refiere a una composición, en medio acuoso, que comprende al menos un ácido hialurónico y al menos una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa, caracterizada porque dicha composición es una mezcla física y porque la relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS], [HA]/[SOS] es superior o igual a 0,1.

Se entiende por ácido hialurónico el ácido halurónico, reticulado o no reticulado, solo o mezclado, eventualmente modificado químicamente mediante sustitución, solo o mezclado, eventualmente en

forma de una de sus sales, sola o mezclada.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención comprende al menos un ácido hialurónico no reticulado, o una de sus sales, solo o mezclado.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención comprende al menos un ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, solo o mezclado.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención comprende al menos un ácido hialurónico correticulado, o una de sus sales, solo o mezclado.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención comprende al menos un ácido hialurónico químicamente modificado mediante sustitución, reticulado o no reticulado, o una de sus sales, solo o mezclado.
En un modo de realización, el ácido hialurónico está en forma de sal de sodio o de potasio.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa es escogida entre el grupo constituido por sales de metales alcalinos, sales de metales alcalino-térreos, sales de plata, sales de amonio, sales de aminoácidos.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa es escogida entre el grupo constituido por las sales de metales alcalinos o las sales de metales alcalino-térreos.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa es la sal sódica del octasulfato de sacarosa o la sal potásica del octasulfato de sacarosa.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa es la sal sódica del octasulfato de sacarosa.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa es la sal potásica del octasulfato de sacarosa.
La solubilidad máxima de la sal potásica de octasulfato de sacarosa es de 40 mg/g, así la relación [HA]/[SOS] mínima en las composiciones de la presente invención es de 0,1, dado que la concentración mínima aceptable de HA en las composiciones de la presente invención es de 4 mg/g a fin de obtener una consistencia adecuada para las utilizaciones de la presente invención. Como la solubilidad de la sal sódica del octasulfato de sacarosa es superior a la de la sal potásica, el límite de solubilidad de la sal potásica del octasulfato de sacarosa se ha tenido en cuenta para determinar el valor mínimo de la relación [HA]/[SOS].
Se entiende por medio acuoso una composición en forma de solución acuosa, eventualmente en presencia de una sal soluble o un tampón, eventualmente en forma de gel o hidrogel.
Se entiende por mezcla física entiende una mezcla en la cual se conserva la integridad de las propiedades físico-químicas de los constituyentes, es decir, que éstas son estrictamente idénticas a las de los constituyentes de la mezcla tomados por separado, pudiéndose caracterizar esta integridad de las propiedades físico-químicas mediante diferentes métodos analíticos. La solicitante ha escogido para caracterizar la mezcla física la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). El espectro de RMN de la mezcla de acuerdo con la invención es un espectro de 1 dimensión del protón ^{1}H. Por ejemplo, el espectro RMN de una mezcla física que comprende una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa está caracterizado porque los valores de los desplazamientos químicos de los protones de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa en solución, sólo, son iguales a los valores de los desplazamientos químicos de los protones de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa en la mezcla física de acuerdo con la invención, lo que prueba que no hay interacción o reacción entre la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa y el ácido hialurónico.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque, cuando ella está analizada mediante espectrometría RMN de protón ^{1}H, el valor del desplazamiento químico del protón anomérico (δ = 5,7 ppm) de la sal de octasulfato de sacarosa es idéntico al valor del desplazamiento químico del protón anomérico de la sal de octasulfato de sacarosa en solución.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS], [HA]/[SOS] está comprendida entre 0,1 y 5000.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS], [HA]/[SOS] está comprendida entre 0,1 y 2500.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS], [HA]/[SOS] está comprendida entre 1 y 1000.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS] [HA]/[SOS] está comprendida entre 10 y 500.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracteriza porque la relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS], [HA]/[SOS] está comprendida entre 0,1 y 100.
En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracteriza porque la

relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS], [HA]/[SOS] está comprendida entre 0,5 y 50.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque la relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS], [HA]/[SOS] es igual a 20.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa está comprendido entre 0,01 mg/g y 40 mg/g de composición.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracteriza porque el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa está comprendido entre 0,1 mg/g y 10 mg/g de composición.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa está comprendido entre 0,1 mg/g y 1 mg/g de composición.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el contenido de ácido hialurónico está comprendido entre 2 mg/g y 50 mg/g de composición.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el contenido de ácido hialurónico está comprendido entre 4 mg/g y 40 mg/g de composición.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el contenido de ácido hialurónico está comprendido entre 10 mg/g y 30 mg/g de composición.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque comprende al menos un ácido hialurónico no reticulado.

En una realización, la composición de acuerdo con la invención está caracteriza porque comprende al menos un ácido hialurónico reticulado.

En la presente invención, la tasa de reticulación X está definida como igual a la relación:

$$X = \frac{\text{número de moles del reticulante introducidos en el medio de reacción}}{\text{número de moles del motivo disacárido introducidos en el medio de reacción}}$$

En un modo de realización, el ácido hialurónico reticulado presenta una tasa de reticulación X comprendida entre 0,001 y 0,5.

En un modo de realización, el ácido hialurónico reticulado presenta una tasa de reticulación X comprendida entre 0,01 y 0,25.

En un modo de realización, el ácido hialurónico reticulado presenta una tasa de reticulación X comprendida entre 0,1 y 0,2.

En un modo de realización, el ácido hialurónico está correticulado tal como se describe en la solicitud WO 2000/0046253 a nombre de Fermentech o en la patente WO 2004/092222 a nombre de Cornéal o incluso en la patente FR2865737 a nombre de ANTEIS.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque comprende una mezcla de ácidos hialurónicos reticulados y no reticulados tal como la descrita en la solicitud WO2005061611 a nombre de Innomed Ltd.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracteriza porque comprende una mezcla de ácidos hialurónicos reticulados.

En un modo de realización, la mezcla de ácidos hialurónicos reticulados es una mezcla monofásica tal como la descrita en la solicitud de patente WO 2009/071697 a nombre de la solicitante.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque comprende al menos un ácido hialurónico sustituido por un grupo que aporta unas propiedades lipófilas o hidratantes tal como, por ejemplo, los ácidos hialurónicos sustituidos descritos en la solicitud WO2013079889 a nombre de la solicitante.

En un modo de realización, la composición comprende, además, otro polisacárido.

En un modo de realización, este otro polisacárido esta seleccionado entre el grupo constituido por celulosa, ácido algínico o una de sus sales.

Se denomina Mw o "peso molecular" al peso molecular promedio en peso de los polímeros, medido en Daltons.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el peso molecular Mw del ácido hialurónico está comprendido en un intervalo de 0,01 MDa a 5 MDa.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el peso molecular Mw del ácido hialurónico está comprendido en un intervalo de 0,1 MDa a 3,5 MDa.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque comprende, además, al menos un principio activo.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el principio activo es escogido entre antioxidantes, anestésicos locales, vitaminas, solos o combinados.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque los antioxidantes son escogidos entre los polioles.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque los antioxidantes son escogidos entre el manitol y el sorbitol, solos o combinados.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el agente antioxidante es el manitol.

En un modo de realización realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el agente antioxidante es el sorbitol.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención se caracteriza por que el agente antioxidante es una combinación de manitol y sorbitol.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque los anestésicos locales son escogidos entre el grupo constituido por la lidocaína, la procaína, la mepivacaína, la ropivacaína, la bupivacaína y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el anestésico local es el clorhidrato de lidocaína.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque el contenido en principio o principios activo(s) está comprendido entre un 0,01 y un 10 % en peso con respecto al peso total de la composición.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque ella contenido en principio o principios activo(s) está comprendido entre un 0,1 y un 5 % en peso con respecto al peso total de la composición.

En un modo de realización, la composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque ella es estable a la esterilización mediante autoclave al vapor.

En un modo de realización, la invención es una composición de viscosuplementación caracterizada porque comprende al menos una composición de acuerdo con la invención.

En un modo de realización, la invención es una composición para el tratamiento de la xeroftalmia o sequedad ocular, caracterizada porque comprende al menos una composición de acuerdo con la invención.

Según los modos de realización, dichas composiciones son utilizadas como lágrimas artificiales, geles lagrimosos o lubrificantes.

En un modo de realización, la invención es una formulación cosmética caracterizada porque comprende una composición de acuerdo con la invención y al menos un excipiente cosméticamente aceptable.

En un modo de realización, la formulación cosmética de acuerdo con la invención está caracterizada porque comprende entre un 0,01 y un 10 % en peso de una composición de acuerdo con la invención con respecto al peso total de dicha formulación cosmética.

En un modo de realización, la formulación cosmética de acuerdo con la invención está caracterizada porque el al menos un excipiente cosméticamente aceptable es escogido entre los adyuvantes cosméticos clásicos.

Se entiende por adyuvantes cosméticos clásicos los excipientes específicamente escogidos entre las grasas, los disolventes orgánicos, los espesantes iónicos o no iónicos, los suavizantes, los antioxidantes, los opacificantes, los estabilizantes, los emolientes, las siliconas, los α-hidroxiácidos, los agentes antiespuma, los agentes hidratantes, los perfumes, los conservantes, los tensioactivos, las cargas, los secuestrantes, los polímeros, los propulsores, los agentes alcalinizantes o acidificantes, los colorantes o cualquier otro ingrediente habitualmente utilizado en cosmética.

La formulación cosmética de acuerdo con la invención puede comprender, además, otros agentes activos, particularmente agentes hidratantes, humectantes, calmantes, antiinflamatorios, cicatrizantes.

Las formulaciones cosméticas de acuerdo con la invención pueden estar preparados mediante técnicas bien conocidas por el experto en la técnica, en particular aquellas destinadas a la preparación de emulsiones de tipo Aceite en Agua (O/W) o Agua en Aceite (W/O).

Esta formulación cosmética se puede presentar en particular en forma de emulsión, simple o compleja (O/W, W/O, O/W/O o W/O/W), tal como una crema, una leche, un gel o un gel-crema, un polvo, un bastoncillo sólido y, eventualmente, puede ser acondicionado en un aerosol y presentarse en forma de espuma o de espray.

En un modo de realización, la formulación cosmética es esterilizada mediante técnicas bien conocidas por el experto en la técnica, en particular, mediante irradiación gamma.

La presente invención se refiere igualmente a una formulación cosmética de acuerdo con la invención caracterizada porque puede ser administrable por vía tópica en forma de loción, crema, aceite, barra, champú o cualquier otra forma apropiada.

La formulación cosmética, dermatológica o farmacéutica de acuerdo con la invención puede ser utilizada como composición protectora de la epidermis humana contra las agresiones de elementos externos y luchar así contra el envejecimiento prematuro de la epidermis.

La invención se refiere igualmente a un procedimiento de fabricación de una composición de acuerdo con la invención.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque comprende al menos:

– una etapa de hidratación de las fibras de al menos un ácido hialurónico, para obtener un hidrogel,

- una etapa de mezcla de una solución de sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa con el hidrogel obtenido en la etapa anterior,
- una etapa de homogeneización, y
- una etapa de esterilización en autoclave al vapor.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizada porque la etapa de hidratación es realizada a temperatura ambiente.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizada porque la etapa de homogeneización es realizada a temperatura ambiente.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracteriza porque la etapa de esterilización en autoclave al vapor es realizado a una temperatura de 121 a 134 °C, durante un periodo adaptado a la temperatura.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizada porque comprende además al menos una etapa de acondicionamiento de la mezcla homogeneizada en unas jeringas.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque comprende además al menos una etapa de acondicionamiento de la mezcla homogeneizada en unos frascos monodosis.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque comprende además al menos una etapa de reticulación.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque la etapa de reticulación se sitúa entre la etapa de hidratación y la etapa de mezcla.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque comprende una etapa de mezcla de dos ácidos hialurónicos previamente reticulados como en el procedimiento descrito en la patente WO2013/079889.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque la etapa de reticulación es efectuada por medio de al menos un agente de reticulación.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque el agente de reticulación es bi- o polifuncional.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque el agente de reticulación bi- o polifuncional es escogido entre el grupo constituido por etilenglicol diglicidil éter, butanodiol diglicidil éter (BDDE), poliglicerol poliglicidil éter, polietilenglicol diglicidil éter, polipropilenglicol diglicidil éter, un bis- o poliepoxi tal como 1,2,3,4-diepoxibutano ó 1,2,7,8-diepoxioctano, una dialquilsulfona, la divinilsulfona, el formaldehído, la epiclorhidrina o también el glutaraldehído, las carbodiimidas tales como, por ejemplo, el clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC).

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque el agente de reticulación bifuncional es el butanodiol diglicidil éter (BDDE) o el 1,2,7,8-diepoxioctano.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque la etapa de reticulación es puesto en práctica según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque comprende, tras la etapa de reticulación, al menos una etapa de purificación y lavado puesta en práctica mediante técnicas conocidas por el experto en la materia.

La invención se refiere a la utilización de una composición de acuerdo con la invención, para la formulación de una composición de viscosuplementación.

La invención se refiere a la utilización de una composición de acuerdo con la invención, para la formulación de una composición para el relleno de arrugas.

Las aplicaciones previstas son, más particularmente, las aplicaciones comúnmente más extendidas en el marco de los viscoelásticos inyectables y de los polisacáridos utilizados o potencialmente utilizables en las patologías o tratamientos siguientes:

- Inyecciones estéticas en el rostro: relleno de arrugas, defectos cutáneos o de volumen (pómulos, mentón, labios);
- Inyecciones volumétricas en el cuerpo: aumento de senos y de glúteos, aumento del punto G, vaginoplastia, reconstrucción de los labios vaginales, aumento del pene;
- Tratamiento de la artrosis, inyección en la articulación como remplazo o complemento del líquido sinovial deficiente;
- Inyección periuretral para el tratamiento de la incontinencia urinaria por insuficiencia del esfínter;
- Inyección posquirúrgica para evitar las adhesiones peritoneales particularmente;
- Inyección después de una cirugía de la presbicia mediante incisiones esclerales con láser;
- Inyección en la cavidad vítrea.

Más particularmemte, en cirugía estética, en función de sus propiedades viscoelásticas y de duración, el hidrogel obtenido según el procedimiento de la invención se podrá utilizar:

- para el relleno de arrugas finas, medias o profundas, y se podrá inyectar con unas agujas de diámetro fino (calibre 27, por ejemplo);
- como voluminizador mediante inyección con agujas de mayor diámetro, de calibre 22 a 26, por ejemplo, y de mayor longitud (de 30 a 40 mm, por ejemplo); en este caso, su carácter

cohesivo permitirá garantizar su mantenimiento en el sitio de la inyección.

La composición de acuerdo con la invención tiene también una gran aplicación importante en cirugía articular y en cirugía dental para el relleno de las bolsas periodontales, por ejemplo.

Estos ejemplos de utilización no son en absoluto limitativos, ya que la composición de acuerdo con la presente invención está prevista de forma más amplia para:

- rellenar volúmenes;
- generar espacios en el seno de determinados tejidos, favoreciendo así su funcionamiento óptimo;
- remplazar líquidos fisiológicos deficientes.

La invención se refiere también a un kit que comprende una composición de acuerdo con la invención, acondicionada en jeringas y esterilizada después del acondicionamiento.

La invención se refiere también a un kit que comprende una composición de acuerdo con la invención, acondicionada en frascos monodosis y esterilizada después del acondicionamiento.

La composición de acuerdo con la invención tiene igualmente aplicación en el campo cosmético o farmacéutico.

Más particularmente, en el campo cosmético, una composición de acuerdo con la invención se usará como ingrediente activo hidratante en una composición cosmética.

En el campo farmacéutico, una composición de acuerdo con la invención será utilizada como composición de hidratación de los ojos con sequedad ocular, es decir, como lágrima artificial.

En estas aplicaciones cosméticas y/o farmacéuticas, las composiciones pueden comprender, además, cualquier ingrediente cosmética o farmacéuticamente aceptable.

Las características de la composición de acuerdo con la presente invención, así como sus procedimientos de fabricación y sus propiedades se ilustran en los ejemplos que siguen a continuación.

EJEMPLO 1:

Este ejemplo ilustra una composición de acuerdo con la invención que comprende ácido hialurónico no reticulado y octasulfato potásico de sacarosa.

Se pesan en un recipiente fibras de hialuronato de sodio (NaHA) de calidad inyectable (1 g; peso molecular: aproximadamente 2,7 MDa). Es añadida una solución acuosa de tampón fosfato (32,3 g), y se homogeneiza el conjunto durante aproximadamente 1 hora con una espátula, a temperatura ambiente y a una presión atmosférica de 900 mm Hg (119,99 KPa).

El hidrogel de NaHA no reticulado obtenido de este modo posee una concentración de aproximadamente 30 mg/g de NaHA.

Es solubilizado octasulfato potásico de sacarosa (KSOS) (60 mg ó $4{,}7.10^{-5}$ moles) en una solución de tampón fosfato (19,94 g) para obtener una solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 3 mg/g.

El hidrogel de NaHA obtenido en la etapa anterior es diluido mediante la adición de la solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa previamente preparada. La composición así obtenida es homogeneizada a continuación.

De este modo es obtenida una composición que comprende NaHA no reticulado con una concentración de 20 mg/g y de KSOS a una concentración de 1 mg/g; la relación másica [HA]/[SOS], es por tanto 20.

La composición así obtenida es acondicionada en jeringas que son esterilizadas mediante autoclave al vapor (T = 121 °C, 10 min).

Según un modo operativo idéntico al descrito anteriormente, adaptando las cantidades puestas en práctica, son preparados los geles descritos en la tabla 7.

Ejemplo 2:

Este ejemplo ilustra un ejemplo de composición de acuerdo con la invención que comprende ácido hialurónico reticulado y octasulfato potásico de sacarosa.

La composición que comprende ácido hialurónico reticulado es obtenido según el procedimiento de reticulación descrito en la solicitud WO 2009/071697 (ejemplo 1, primera parte) a nombre de VIVACY, a partir de fibras de hialuronato de sodio (NaHA) (1 g; peso molecular: aproximadamente 2,7 MDa) y butanodiol diglicidil éter (BDDE) (54 mg). La composición así obtenida tiene una concentración de aproximadamente de 30 mg/g de NaHA reticulado con una tasa de reticulación X de aproximadamente 0,12.

Es preparada una solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 3 mg/g como en el ejemplo 1.

El hidrogel de NaHA reticulado obtenido en la etapa anterior es diluido en la solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa previamente preparada. La composición así obtenida es homogeneizado a continuación.

De este modo es obtenida una composición que comprende NaHA reticulado con una concentración de 20 mg/g y octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 1 mg/g; y la relación másica [HA]/[SOS] es, por tanto, 20.

La composición así obtenida es acondicionada en jeringas las cuales son esterilizadas por autoclave al vapor (T = 121 °C, 10 min).

Según un procedimiento idéntico al descrito anteriormente, adaptando las cantidades puestas en

práctica, es preparado el gel descrito en la tabla 8.

EJEMPLO 3

Este ejemplo ilustra un ejemplo de composición de acuerdo con la invención que comprende ácido hialurónico no reticulado, octasulfato potásico de sacarosa y manitol.

La composición que comprende ácido hialurónico no reticulado y octasulfato potásico de sacarosa es preparado según el procedimiento del ejemplo 1, a partir de un hidrogel de ácido hialurónico con una concentración de 30 mg/g y una solución de octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 10 mg/g.

La adición de una solución de manitol con una concentración de 86 mg/g a la composición obtenida anteriormente es efectuada según el procedimiento descrito en la patente WO 2009/024670 a nombre de ANTEIS.

La composición así obtenida comprende ácido hialurónico no reticulado con una concentración de 20 mg/g, manitol con una concentración de 20 mg/g y octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 1 mg/g; y la relación másica [HA]/[SOS] es, por tanto, 20.

La composición así obtenida es acondicionada en jeringas las cuales son esterilizadas por autoclave al vapor (T = 121 °C, 10 min).

EJEMPLO 4

Este ejemplo ilustra un ejemplo de composición de acuerdo con la invención que comprende ácido hialurónico reticulado, octasulfato potásico de sacarosa y manitol.

Una composición que comprende NaHA reticulado está preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 a partir de un hidrogel de NaHA con una concentración de 30 mg/g y octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 10 mg/g.

La adición de una solución de manitol con una concentración de 86 mg/g a la composición obtenida anteriormente es efectuada según el procedimiento descrito en la patente WO 2009/024670 a nombre de ANTEIS.

La composición así obtenida comprende ácido hialurónico reticulado con una concentración de 20 mg/g, manitol con una concentración de 20 mg/g y octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 1 mg/g; la relación másica [HA]/[SOS] es, por tanto, 20.

La composición así obtenida es acondicionada en jeringas las cuales son esterilizadas por autoclave al vapor (T = 121 °C, 10 min).

EJEMPLO 5

Este ejemplo ilustra un ejemplo de composición de acuerdo con la invención que comprende ácido hialurónico no reticulado, octasulfato potásico de sacarosa y lidocaína.

La composición que comprende ácido hialurónico no reticulado y octasulfato potásico de sacarosa es preparada según el procedimiento del ejemplo 1, a partir de un hidrogel de ácido hialurónico con una concentración de 30 mg/g y una solución de octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 10 mg/g.

La adición de una solución de lidocaína con una concentración de 13 mg/g a la composición obtenida anteriormente es efectuada según el procedimiento descrito en la patente WO 2009/024670 a nombre de ANTEIS, o es efectuada según el procedimiento descrito en las solicitudes US 61/791 977 o FR 13/52971 a nombre de VIVACY.

La composición así obtenida comprende ácido hialurónico no reticulado con una concentración de 20 mg/g, lidocaína con una concentración de 3 mg/g y octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 1 mg/g; y la relación másica [HA]/[SOS] es, por tanto, 20.

La composición así obtenida es acondicionada en jeringas las cuales son esterilizadas por autoclave al vapor (T = 121 °C, 10 min).

EJEMPLO 6

Este ejemplo ilustra un ejemplo de composición de acuerdo con la invención que comprende ácido hialurónico reticulado, octasulfato potásico de sacarosa y lidocaína.

Una composición que comprende NaHA reticulado es preparada según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 a partir de un hidrogel de NaHA con una concentración de 30 mg/g y octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 10 mg/g.

La adición de una solución de lidocaína con una concentración de 13 mg/g a la composición obtenida anteriormente es efectuada según el procedimiento descrito en la patente WO 2009/024670 a nombre de ANTEIS, o es efectuada según el procedimiento descrito en las solicitudes US 61/791 977 o FR 13/52971 a nombre de VIVACY.

La composición así obtenida comprende ácido hialurónico reticulado con una concentración de 20 mg/g, lidocaína con una concentración de 3 mg/g y octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 1 mg/g; y la relación másica [HA]/[SOS] es, por tanto, 20.

La composición así obtenida es acondicionada en jeringas las cuales son esterilizadas por en autoclave al vapor (T = 121 °C, 10 min).

Las composiciones obtenidas en los ejemplos 1 a 6 pueden ser utilizadas en viscosuplementación o en un fluido de relleno.

EJEMPLO 7

Este ejemplo ilustra una composición de acuerdo con la invención que comprende ácido hialurónico no reticulado y octasulfato potásico de sacarosa para el tratamiento de la sequedad ocular.

Unas fibras de hialuronato de sodio (NaHA) de calidad inyectable (1 g; peso molecular: aproximadamente 1 MDa), son pesadas en un recipiente, una solución acuosa de tampón fosfato (165,7 g), es añadida y se homogeneiza el conjunto durante aproximadamente 1 hora con una espátula, a temperatura ambiente y a una presión atmosférica de 900 mm Hg (119,99 KPa).
El hidrogel de NaHA no reticulado obtenido de este modo tiene una concentración de aproximadamente 6 mg/g de NaHA.
Octasulfato potásico de sacarosa (KSOS) (600 mg ó $4,7.10^{-4}$ moles) es solubilizado en una solución de tampón fosfato (19,94 g) para obtener una solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 30 mg/g.
El hidrogel de NaHA obtenido en la etapa anterior es diluido mediante la adición de la solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa previamente preparada. La composición así obtenida es homogeneizada a continuación.
Se obtiene así una composición que comprende NaHA no reticulado con una concentración de 4 mg/g y de KSOS con una concentración de 10 mg/g; la relación másica [HA]/[SOS] es, por tanto, 0,4.
La composición así obtenida es acondicionado en frascos monodosis, los cuales son esterilizados.

EJEMPLO 8

Este ejemplo ilustra una formulación cosmética.

Alcohol cetearílico	5 %
Ésteres (éster dicaprílico, miristato de miristilo)	10 %
Composición de ácido hialurónico no reticulado y octasulfato potásico de sacarosa, obtenida en el ejemplo 1	1 %
Glicerina	5 %
Alcohol	5 %
Tocoferol	0,2 %
Perfume	0,1 %
Agua	c.s.p. 100 %

EJEMPLO 9

Este ejemplo ilustra una formulación cosmética esterilizada.

Composición de ácido hialurónico no reticulado y octasulfato potásico de sacarosa obtenida según el ejemplo 1 con una relación [HA]/[SOS] de 4.	1 %
Carbómero	0,5 %
Goma xantana	2,5 %
Ácido cítrico	0,1 %
2-feniletanol	0,5 %
Glicerina	1,2 %
Agua	c.s.p. 100 %

La formulación cosmética es esterilizada mediante irradiación gamma en dosis de 5-25 kGy, preferentemente de 7-15 kGy.

EJEMPLO 10

Estabilidad a la esterilización en autoclave al vapor.
Para las composiciones de acuerdo con la invención que comprenden ácido hialurónico no reticulado, la viscosidad η de las composiciones esterilizadas después de la etapa de esterilización en autoclave al vapor es caracterizado en un reómetro TA Instruments AR 2000 Ex, en deformación impuesta a 25 °C. El valor de la viscosidad es llevada a un esfuerzo de deformación de 0,02 s^{-1}.
Para las composiciones que comprenden ácido hialurónico no reticulado, el porcentaje de pérdida de la viscosidad es el valor de la diferencia de la viscosidad de la composición de referencia tras la esterilización en autoclave al vapor y la viscosidad de la composición que comprende ácido hialurónico no reticulado y un oligo- o polisacárido o una osa sulfatada tras la esterilización en autoclave al vapor con respecto al valor de la viscosidad de la composición de referencia tras la esterilización en autoclave al vapor.
Para las composiciones de acuerdo con la invención que comprenden ácido hialurónico reticulado, la componente elástica G' de las composiciones esterilizadas tras la etapa de esterilización en autoclave se caracteriza en un reómetro TA Instruments AR 2000 Ex, en oscilación a 25 °C, determinando los valores de la componente elástica a una frecuencia de 1 Hz.
Para las composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, el porcentaje de pérdida de la componente elástica G' es el valor de la diferencia de la componente elástica G' de la composición de referencia tras la esterilización en autoclave al vapor y la componente elástica G' de la composición que comprende ácido hialurónico reticulado y un oligo- o polisacárido o una osa sulfatada tras la esterilización en autoclave al vapor con respecto al valor de la componente elástica G' de la composición de referencia tras la esterilización en autoclave al vapor.
Para todas estas mediciones se formula una composición de referencia reemplazando la solución acuosa de oligosacárido o de osa sulfatada por una misma cantidad de solución acuosa de tampón

fosfato.

a) Estabilidad a la esterilización en autoclave al vapor de composiciones que comprenden ácido hialurónico no reticulado y un oligo- o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada.

Nuevas composiciones que comprenden ácido hialurónico no reticulado y un oligo- o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada a una concentración de 1 mg/g en la composición son preparadas según el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Una composición de referencia es igualmente formulada reemplazando la solución acuosa de oligo- o polisacárido o de osa sulfatada por la misma cantidad de solución acuosa de tampón fosfato.

Los porcentajes de pérdida de la viscosidad de las composiciones según el procedimiento del ejemplo 1 con respecto a la composición de referencia después de la etapa de esterilización en autoclave al vapor son medidos y los resultados obtenidos son presentados en la tabla 1 que sigue a continuación:

Tabla 1

Oligo- o polisacáridos y osas sulfatados	**% de pérdida de la viscosidad con respecto a la composición de referencia**
N-acetil-D-glucosamina-6-sulfato	96
D-glucosamina-6-sulfato	98
D-glucosamina-2-sulfato	87
Sulfato de dextrano (40 000)	16
Sulfato de condroitina	62
Carragenano(disacárido) disulfatado	94
Carragenano(hexasacárido) hexasulfatado	92
Octasulfato sódico de sacarosa	0
Octasulfato potásico de sacarosa	0

Porcentaje de pérdida de la viscosidad tras la etapa de esterilización en autoclave al vapor de composiciones que comprenden ácido hialurónico no reticulado y un oligo- o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada a una concentración de 1 mg/g con respecto a la composición de referencia.

Se observa, tras la etapa de esterilización en autoclave al vapor una pérdida de viscosidad para todas las composiciones a excepción de aquellas que comprenden una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa. Las pérdidas más importantes se observan para las composiciones que comprenden glucosaminas sulfatadas (N-acetiladas o no y sulfatadas en la posición 2 ó 6). Por lo que se refiere a las que comprenden un oligo- o polisacárido sulfatado tal como el sulfato de dextrano o el sulfato de condroitina estás pérdidas parecen menores.

b) Estabilidad a la esterilización en autoclave al vapor de composiciones que comprenden ácido hialurónico no reticulado, un oligo – o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada y manitol.

Una serie de cinco composiciones que comprenden ácido hialurónico no reticulado, manitol y un oligo- o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada a una concentración de 1 mg/g en la composición son preparadas según el procedimiento descrito en el ejemplo 3.

Una composición de referencia es igualmente reemplazando la solución acuosa de oligo-polisacárido o de osa sulfatada por la misma cantidad de solución acuosa de tampón fosfato.

Los porcentajes de pérdida de la viscosidad de las composiciones según el procedimiento del ejemplo 3 con respecto a la composición de referencia son medidas y los resultados obtenidos son presentados en la tabla 2 que sigue a continuación:

Tabla 2

Oligo- o polisacáridos y osas sulfatados	**% de pérdida de la viscosidad con respecto a la composición de referencia**
N-acetil-D-Glucosamina-6-sulfato	60
D-Glucosamina-6-sulfato	90
D-Glucosamina-2-sulfato	25
Octasulfato sódico de sacarosa	0
Octasulfato potásico de sacarosa	0

Porcentaje de pérdida de la viscosidad tras la etapa de esterilización en autoclave al vapor de composiciones que comprenden ácido hialurónico no reticulado, manitol y un oligo- o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada a una concentración de 1 mg/g con respecto a la composición de referencia.

Se observa para las composiciones que comprenden ácido hialurónico no reticulado, manitol y una glucosamina sulfato una pérdida de viscosidad con respecto a la composición de referencia.
Las únicas composiciones para las cuales no se observa ninguna pérdida de viscosidad tras la esterilización en autoclave al vapor con respecto a la composición de referencia son las composiciones que comprenden una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa.
c) Estabilidad a la esterilización en autoclave al vapor de composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, un oligo- o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada y manitol.
Una serie de cuatro composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, manitol y un oligo- o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada a una concentración de 1 mg/g en la composición es preparada según el procedimiento descrito en el ejemplo 4.
Una composición de referencia es igualmente formulada reemplazando la solución acuosa de oligo- o polisacárido o de osa sulfatada por una cantidad equivalente de solución acuosa de tampón fosfato.
Los porcentajes de pérdida de la componente elástica G' de las composiciones según el procedimiento del ejemplo 4 con respecto a la composición de referencia son medidos y los resultados obtenidos son presentados en la tabla 3 que sigue a continuación:

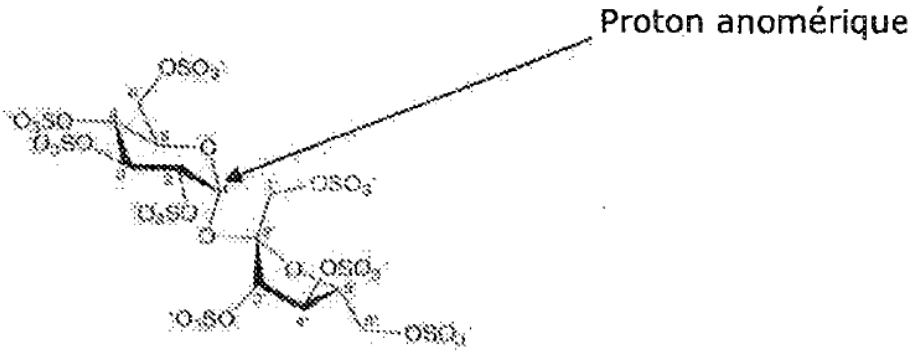
Tabla 3

Oligo-polisacáridos y osas sulfatados	**% de pérdida de la componente elástica G' con respecto a la composición de referencia**
N-acetil-D-Glucosamina-6-sulfato	32
D-Glucosamina-6-sulfato	74
D-Glucosamina-2-sulfato	18
Octasulfato potásico de sacarosa	0

Porcentaje de pérdida de la componente elástica G' tras la etapa de esterilización en autoclave al vapor de composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado, manitol y un oligo- o polisacárido sulfatado o una osa sulfatada a una concentración de 1 mg/g con respecto a la composición de referencia.
Se observan pérdidas de la componente elástica G’ con respecto a la composición de referencia para las composiciones que comprenden glucosaminas sulfatadas (N-acetiladas o no y sulfatadas en la posición 2 ó 6).
Se observa para las composiciones que comprenden octasulfato potásico de sacarosa que no hay ninguna pérdida de la componente elástica G' tras la esterilización en autoclave al vapor con respecto a la composición de referencia.
En conclusión, no se observa ninguna pérdida de la viscosidad o de la componente elástica G' tras la esterilización en autoclave al vapor con respecto a la composición de referencia únicamente para las composiciones que comprenden sales hidrosolubles de sodio o de potasio de octasulfato de sacarosa. Esta observación es la misma ya sea el ácido hialurónico reticulado o no y que las composiciones comprendan o no manitol.
Por consiguiente, estas composiciones son las únicas que permiten obtener productos tan estables como la composición de referencia tras la esterilización en autoclave al vapor.
EJEMPLO 11
Características espectroscópicas de la mezcla física que comprende ácido hialurónico y octasulfato potásico de sacarosa.
Se efectúa un análisis de RMN ^{1}H de la composición del ejemplo 4. Se determinan las características espectroscópicas de la composición del ejemplo 4 antes de la esterilización y después de la esterilización en autoclave al vapor.
Se realizan los análisis en solución en un espectrómetro Bruker Avance que opera a 600 MHz (1H) y que está equipado con una sonda TCI (criosonda).
Los resultados se presentan a continuación:

- La figura 1 es el espectro de RMN ^{1}H del octasulfato potásico de sacarosa sólo en solución en agua.
- La figura 2 es una superposición de los espectros de RMN ^{1}H de la composición del ejemplo 4 antes y después de la esterilización.

El espectro de RMN ^{1}H de la figura 1 del octasulfato potásico de sacarosa sólo en solución en agua ha permitido la asignación parcial de las señales. Se toma como referencia el valor del desplazamiento químico del protón anomérico del octasulfato potásico de sacarosa, que es δ = 5,7 ppm.
Representación del protón anomérico del octasulfato de sacarosa



Sucrose Octasulfate

Los valores del desplazamiento químico del protón anomérico del octasulfato potásico de sacarosa sólo en solución o en la composición del ejemplo 4 son idénticos. Por consiguiente, el análisis de RMN confirma que el octasulfato potásico de sacarosa no reacciona con el ácido hialurónico para formar un complejo y que la composición del ejemplo 4 es una mezcla física de una solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa y del hidrogel que comprende ácido hialurónico reticulado.

La superposición de los espectros de RMN 1H de la figura 2 de la composición del ejemplo 4 antes y después de la esterilización por autoclave al vapor confirma la enorme identidad si de los dos espectros. Las estructuras químicas del octasulfato potásico de sacarosa y del ácido hialurónico no se modifican como consecuencia de la esterilización mediante esterilización en autoclave al vapor, tal como se ilustra en la figura 2. Esto confirma los resultados relativos a las propiedades reológicas de la composición del ejemplo 4 expuestos anteriormente en el presente documento.

EJEMPLO 12

Ensayo de degradación enzimática

El ensayo de degradación se ha adaptado a partir del ensayo descrito en la publicación "Comparison of the sensitivity of 11 crosslinked hyaluronic acid gels to bovine testis hyaluronidase", I. Sall, G. Ferard, *Polymer Deg. and Stability*, (2007), 92, 915-919 y la solicitud de patente WO 2009/068215.

Los ensayos de degradación enzimática han sido realizados sobre una composición preparada según el procedimiento del ejemplo 2 que comprende NaHA reticulado con una concentración de 20 mg/g y octasulfato potásico de sacarosa con una concentración de 3 mg/g en tampón NaCl (composición A), así como para la composición del ejemplo 4 (composición B), esterilizadas mediante autoclave al vapor y para composiciones de referencia esterilizadas igualmente mediante esterilización en autoclave al vapor. La composición de referencia A y la composición de referencia B son formuladas sustituyendo la solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa por la misma cantidad de solución acuosa de tampón fosfato.

Las composiciones han sido sometidas a un ensayo de degradación enzimática *in vitro* a 37 °C. Este ensayo permite simular la duración posterior *in vivo* de las composiciones inyectadas.

Dichas composiciones son degradadas por las hialuronidasas, mezclando las composiciones que se van a ensayar con una solución de hialuronidasa.

A la degradación le sigue la reología a 37 °C (en un reómetro TA Instruments AR 2000 Ex), midiendo la viscosidad compleja. Las curvas de tendencia de los resultados de degradación de estas dos composiciones permiten evaluar después el tiempo de semivida de estas diferentes composiciones (duración necesaria para tener $n^* = n^*_0 / 2$, en minutos), con n^*_0 = viscosidad compleja a t_0 de la composición caracterizada.

Los tiempos de semivida obtenidos se dan en la tabla 4 que sigue a continuación:

Tabla 4

Composición	**Degradación enzimática (hialuronidasas)**
	Tiempo ½ vida (min)
Composición de referencia A	5,1
Composición A	6,3
Composición de referencia B	6,1
Composición B	8,7

Ensayos de degradación enzimática para una composición según el ejemplo 2 con una concentración KSOS de 3 mg/g (Composición A) y para la composición del ejemplo 4 (Composición B), esterilizadas mediante esterilización en autoclave al vapor y para composiciones de referencia a base de ácido hialurónico reticulado esterilizadas mediante autoclave al vapor.

Las composiciones A y B, esterilizadas mediante esterilización en autoclave al vapor presentan

tiempos de semivida superiores a los de las composiciones de referencia, esterilizadas mediante autoclave al vapor en las mismas condiciones; en efecto, las composiciones A y B, esterilizadas mediante autoclave al vapor, poseen duraciones superiores al 24 % y al 43 %, respectivamente, frente a la degradación enzimática con respecto a las composiciones de referencia A y B esterilizadas mediante autoclave al vapor.

Ejemplo 13

Ensayos de degradación oxidante

Los ensayos de degradación oxidante se han efectuado para la composición del ejemplo 4, esterilizada mediante autoclave al vapor y para una composición de referencia esterilizada igualmente mediante esterilización en autoclave al vapor en las mismas condiciones. La composición de referencia está formulada sustituyendo la solución acuosa de octasulfato potásico de sacarosa por una misma cantidad de solución acuosa de tampón fosfato.

Las composiciones han sido sometidas a un ensayo de degradación oxidante *in vitro* a 45 °C. Este ensayo permite simular la duración posterior *in vivo* de las composiciones inyectadas.

Las composiciones son degradadas en presencia de agua oxigenada. A la degradación le sigue la reología a 45 °C (en un reómetro TA Instruments AR 2000 Ex), midiendo la viscosidad compleja. Las curvas de tendencia de los resultados de degradación de estas composiciones permiten evaluar después el tiempo de semivida de estas composiciones diferentes (duración necesaria para tener $n^* = n^*_0 / 2$, en minutos), con n^*_0 = viscosidad compleja a t_0 de la composición caracterizada.

Los tiempos de semivida obtenidos se dan en la tabla 5 que sigue a continuación:

Tabla 5

Osas	**Degradación oxidante (H_2O_2)**
	Tiempo ½ vida (min)
Composición de referencia	19,95
Octasulfato potásico de sacarosa	25,85

Ensayos de degradación oxidante para una composición del ejemplo 4, esterilizada mediante autoclave al vapor y para una composición de referencia a base de ácido hialurónico, reticulado, esterilizada mediante autoclave al vapor.

La composición del ejemplo 4, esterilizada mediante autoclave al vapor presenta un tiempo de semivida superior al de la composición de referencia esterilizada mediante autoclave al vapor en las mismas condiciones; en efecto, la composición del ejemplo 4, esterilizada en autoclave al vapor posee una duración superior al 30 % frente a la degradación oxidante con respecto a la composición de referencia, esterilizada en autoclave al vapor.

EJEMPLO 14

Ejemplos de ensayos de formulaciones de KSOS (a diferentes concentraciones) con un gel de NaHA reticulado con una concentración de 20 mg/g (gel IPN comercializado con la marca Stylage® M) el cual es el gel de referencia.

Los geles son esterilizados y después caracterizados.

Se mide el porcentaje de pérdida de la componente elástica G' con respecto a la composición de referencia es medido según el ejemplo 8 y la diferencia entre la fuerza de inyección, a través de agujas hipodérmicas de calibre Gange 30 1/2, del gel de referencia y de los geles que comprenden octasulfato potásico de sacarosa es medido también.

Los resultados se presentan en la tabla 6 que sigue a continuación:

Tabla 6

Stylage® M	% de pérdida de la componente elástica G' con respecto a la composición de referencia	$\Delta_{\text{fuerza de inyección}}$ (N) = Fuerza de inyección gel de referencia (N) - Fuerza de inyección gel con KSOS (N)	[HA]/ [SOS]
Referencia			
+ KSOS a 3 mg/g	0	0	6,66
+ KSOS a 1 mg/g	0	0	20
+ KSOS a 0,5 mg/g	0	0	40
+ KSOS a 0,2 mg/g	0	0	100

Porcentaje de pérdida de la componente elástica G' tras la etapa de esterilización en autoclave al

vapor de composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado en presencia de concentraciones variables de octasulfato potásico de sacarosa.
No se observa ninguna pérdida de la componente elástica G' tras la etapa de esterilización en autoclave de composiciones que comprenden ácido hialurónico reticulado y octasulfato potásico de sacarosa, cualquiera que sea la concentración de octasulfato potásico de sacarosa en la composición.
Asimismo, no se observa ningún aumento de la fuerza de inyección con respecto a la formulación de referencia, cualquiera que sea el contenido de octasulfato potásico de sacarosa.
EJEMPLO 15
Ejemplos de ensayos de formulaciones de KSOS (a diferentes concentraciones) con un gel no reticulado del ejemplo 1 a las concentraciones y relaciones descritas en la tabla 7 que sigue.
Los geles son esterilizados y después caracterizados mediante reología según el ejemplo 8.

Tabla 7

Concentración de NaHA (mg/g)	Concentración de KSOS (mg/g)	Relación [HA]/ [SOS]	% de pérdida de la viscosidad con respecto a la composición de referencia
25	0	-	-
25	0,01	2500	0
25	0,05	500	0
20	0	-	-
20	10	2	0
20	20	1	0
10	0	-	-
10	10	1	0
10	20	0,5	0
4	0	-	-
4	40	0,1	0

Porcentaje de pérdida de la viscosidad tras la etapa de esterilización en autoclave de composiciones con diferentes relaciones [HA]/[SOS].
No se observa ninguna pérdida de la viscosidad tras la etapa de esterilización en autoclave de composiciones, independientemente de cual sea la relación [HA]/[SOS].
EJEMPLO 16
Ejemplo de ensayo de formulación de KSOS con un gel que comprende ácido hialurónico reticulado con la concentración y la relación descritas en la tabla 8 siguiente.
Los geles son preparados según el procedimiento descrito en el ejemplo 2 y se caracterizan después mediante reología según el ejemplo 8.

Tabla 8

Concentración de NaHA (mg/g)	Concentración de KSOS (mg/g)	Relación [HA]/ [SOS]	% de pérdida de la componente elástica G' con respecto a la composición de referencia
10,3	0	-	-
10,3	25	0,4	0

Porcentaje de pérdida de la componente elástica G' tras la etapa de esterilización en autoclave.
No se observa ninguna pérdida de la componente elástica G' tras la etapa de esterilización en autoclave de las composiciones, para una relación [HA]/[SOS] de 0,4.

REIVINDICACIONES

1. Composición esterilizada que comprende, en medio acuoso, al menos un ácido hialurónico y al menos una sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa, **caracterizada porque** dicha composición es una mezcla física y **porque** la relación másica entre el contenido de ácido hialurónico [HA] y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa [SOS], [HA]/[SOS], es superior o igual a 0,1.

2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** el peso molecular Mw del ácido hialurónico está comprendido en un intervalo de 0,01 MDa a 5 MDa y/o el contenido de ácido hialurónico está comprendido entre 2 mg/g y 50 mg/g de composición.

3. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende al menos un ácido hialurónico no reticulado.

4. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende al menos un ácido hialurónico reticulado.

5. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa es la sal sódica de octasulfato de sacarosa o la sal potásica de octasulfato de sacarosa y el contenido de la sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa está comprendido entre 0,01 mg/g y 40 mg/g de composición.

6. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende, además, al menos un principio activo escogido entre los antioxidantes, los anestésicos locales, las vitaminas, solos o en combinación.

7. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** los antioxidantes son escogidos de entre los polioles.

8. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** los anestésicos locales son escogidos entre el grupo constituido por la lidocaína, la procaína, la mepivacaína, la ropivacaína, la bupivacaína y sus sales farmacéuticamente aceptables.

9. Formulación cosmética **caracterizada porque** comprende una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un excipiente cosméticamente aceptable.

10. Procedimiento de fabricación de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** comprende al menos:

- una etapa de hidratación de las fibras de al menos un ácido hialurónico, para obtener un hidrogel,
- una etapa de mezcla de una solución de sal hidrosoluble de octasulfato de sacarosa con el hidrogel obtenido en la etapa anterior,
- una etapa de homogeneización, y
- una etapa de esterilización en autoclave al vapor.

11. Procedimiento de fabricación de una composición de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** comprende además al menos una etapa de reticulación.

12. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, destinada a ser utilizada en viscosuplementación.

13. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, destinada a ser utilizada en el relleno de arrugas.

14. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, destinada a ser utilizada en el tratamiento de la sequedad ocular.

15. Utilización de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para el relleno de arrugas.

16. Kit que comprende una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, acondicionada en jeringas o en frascos monodosis esterilizados.

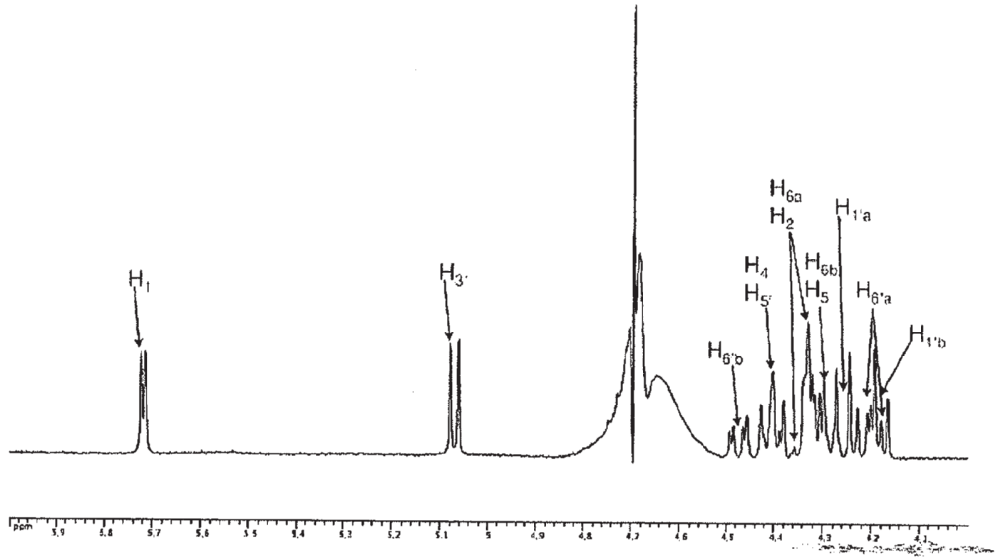


Figura 1

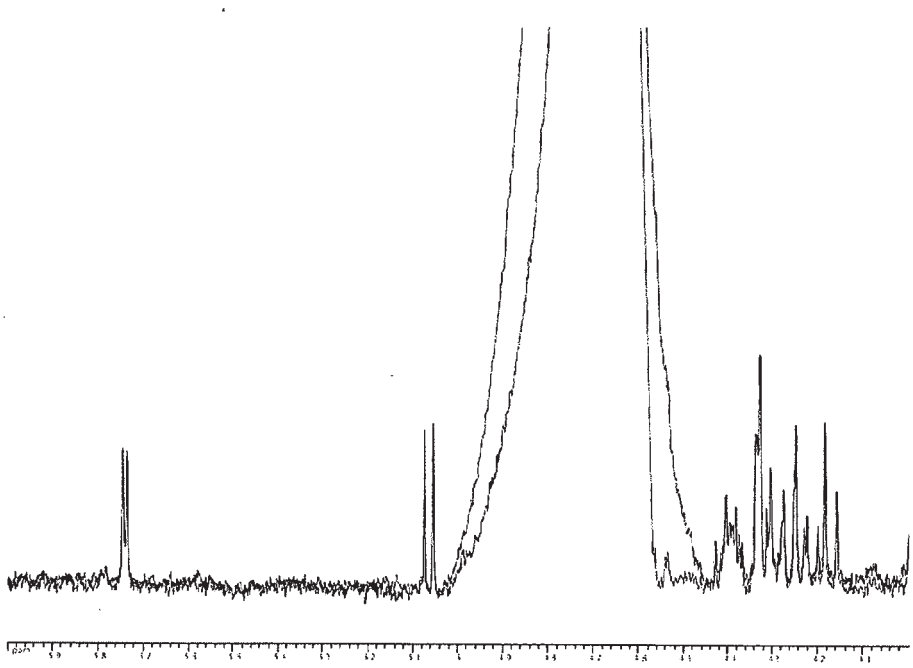


Figura 2

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 03041724 A, Hermida **[0014]**
- WO 2004034980 A, Marcum **[0015]**
- US 2715091 A **[0017]**
- WO 03000191 A, Depuy **[0019]**
- EP 0230023 A, Marion **[0028]**
- WO 8905646 A **[0029]**
- EP 0640346 A, Bar-Shalom **[0029]**
- WO 9822114 A, Dumex-Alpharma **[0030]**
- WO 20000046253 A, Fermentech **[0073]**
- WO 2004092222 A, Cornéal **[0073]**
- FR 2865737 **[0073]**
- WO 2005061611 A **[0074]**
- WO 071697 A **[0076]**
- WO 2013079889 A **[0077] [0117]**
- WO 2009071697 A **[0146]**
- WO 2009024670 A **[0154] [0159] [0164] [0169]**
- US 61791977 B **[0164] [0169]**
- FR 1352971 **[0164] [0169]**
- WO 2009068215 A **[0215]**

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- **IOCONO et al.** *J. Ped. Surg.*, 1988, vol. 33 (4), 564-567 **[0003]**
- **MOSELEY R et al.** *Biochim Biophys Acta,* 1995, vol. 1244 (2-3), 245-52 **[0010]**
- **R. SERVATY et al.** *International Journal of Biological Macromolecules,* 2001, vol. 28, 121-127 **[0011]**
- **T. TOIDA et al.** *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 1999, vol. 370 (2), 176-182 **[0012]**
- **K. ZIMMERMANN.** *J. Cancer Res. Clin. Oncol.,* 1983, vol. 105, 189-190 **[0017]**
- **WALTON, BR.** *J. Pharmacol.,* 1954, vol. 9, 1-14 **[0017]**
- **S. SALMEN et al.** *Planta Medica,* 2005, vol. 71 (8), 727-732 **[0024]**
- **A. SUZUKI et al.** *Glycobiology,* 2001, vol. 11 (1), 57-64 **[0025]**
- **J.I. FENTON et al.** *Osteoarthritis and Cartilage,* 2000, vol. 8 (6), 444-451 **[0026]**
- **I. SALL ; G. FERARD.** Comparison of the sensitivity of 11 crosslinked hyaluronic acid gels to bovine testis hyaluronidase. *Polymer Deg. and Stability,* 2007, vol. 92, 915-919 **[0215]**