

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 347**

51 Int. Cl.:

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2017 PCT/IL2017/050837**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18020501**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2017 E 17761928 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3377126**

54 Título: **Hilos de ácido hialurónico reticulado e hidroxiapatita**

30 Prioridad:

27.07.2016 US 201662367137 P

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

31.10.2019

73 Titular/es:

MARBELLE THREADS LTD. (100.0%)

1 Bat Sheva St.

7120101 Lod, IL

72 Inventor/es:

SEGAL, DAVID DADI;

GOLDBERG, ERAN;

SHKLANOVSKY, LITAL;

COHEN, AVIV y

GOLDSHAID-ZMIRI, LIAT

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 729 347 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

Hilos de ácido hialurónico reticulado e hidroxiapatita

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de fabricación de hilos de material compuesto que comprenden ácido hialurónico reticulado e hidroxiapatita, en los propios hilos, y su uso en aplicaciones cosméticas y en aplicaciones médicas.

10 Antecedentes de la invención

El ácido hialurónico es un componente común de preparaciones cosméticas y se usa en varios procedimientos cosméticos, particularmente para rellenar arrugas. El ácido hialurónico natural tiene poca estabilidad *in vivo* debida a la rápida degradación enzimática y la hidrólisis y, en consecuencia, se han preparado varias formas químicamente modificadas de ácido hialurónico (por ejemplo, formas reticuladas, formas modificadas iónicamente, formas esterificadas, etc.) para resolver la deficiente estabilidad. Por ejemplo, la Solicitud de patente PCT WO2013053457 describe una composición de hidroxiapatita y dos polímeros de ácido hialurónico de diferente peso molecular reticulados entre sí. Adicionalmente, las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 20150257989 y 2015238525 describen un gel de ácido hialurónico reticulado cohesivo lleno de partículas de hidroxiapatita.

La hidroxiapatita tiene una composición química que es muy similar a la de la fase mineral del hueso. Sus propiedades biológicas y su biocompatibilidad la convierten en un excelente producto sustituto de huesos. La colonización ósea por el sustituto usualmente depende en gran medida de las características porosas del material y, particularmente, del tamaño y distribución de los poros, y de la interconexión entre los macroporos (número y tamaño). Las interconexiones son túneles que permiten el paso de las células y la circulación de la sangre entre los poros y así, promueven la formación de hueso dentro del sustituto. La hidroxiapatita de calcio (CaHAp) es una especie mineral de la familia del fosfato, que tiene la fórmula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, usualmente escrita como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para subrayar el hecho de que la red de la estructura cristalina contiene dos moléculas. La hidroxiapatita pertenece a la familia de apatita cristalográfica, que son compuestos isomórficos que tienen la misma estructura hexagonal. Este compuesto se ha usado como un biomaterial durante muchos años en diversas especialidades médicas.

Actualmente, el ácido hialurónico o sus versiones reticuladas se usan en diversas formas de gel, por ejemplo, como productos de aumento de tejidos blandos, barreras de adhesión y similares. Particularmente, la Solicitud de patente PCT WO2013055832 describe hilos de hialurónico reticulado. El documento WO2011/109129 describe además un método de fabricación de hilos de ácido hialurónico reticulado.

Existe la necesidad en la técnica de proporcionar hilos que comprendan ácido hialurónico de manera controlada y con mejores propiedades deseadas, tales como resistencia a la degradación controlada y/o comportamiento de hinchamiento espacial, y/o mejores propiedades reológicas y/o estabilidad mecánica, y/o efectos secundarios reducidos, y/o biocompatibilidad, y/o osmolaridad controlada.

Resumen de la invención

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para fabricar un hilo, que comprende i) ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, a una concentración entre 2% y 80 % (p/p), y ii) hidroxiapatita a una concentración entre 2% y 90 % (p/p). El método comprende combinar ácido hialurónico con un reticulante e hidroxiapatita en condiciones de reticulación como se describe en la presente descripción para proporcionar una composición precursora, que forma un hilo a partir de la composición precursora, y secar el hilo. Los hilos así formados tienen una uniformidad aceptable, por ejemplo, una baja desviación estándar relativa de las medidas de su diámetro, hinchamiento y/o propiedades mecánicas.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un hilo, que comprende i) ácido hialurónico reticulado, o una de sus sales, y ii) hidroxiapatita. Los hilos tienen una uniformidad y propiedades mecánicas aceptables, y exhiben un hinchamiento aceptable. Los hilos tienen un menor contenido de agua, en comparación con sus respectivas composiciones precursoras. Las composiciones precursoras que comprenden los mismos componentes y agua forman otro aspecto de la invención.

Se ha encontrado inesperadamente por los presentes inventores que la reticulación del ácido hialurónico en presencia de hidroxiapatita puede realizarse con éxito. Además se ha encontrado inesperadamente que la adición de una cantidad específica de hidroxiapatita al ácido hialurónico no interfiere con la formación de hilos aceptables, por ejemplo, de alta uniformidad, resistencia mecánica y características de hinchamiento aceptables. Además se ha encontrado inesperadamente que con el uso de agentes de reticulación particulares, por ejemplo, éter diglicidílico de etilenglicol o éter diglicidílico de poli(etilenglicol), es posible obtener un hinchamiento significativamente mayor de los hilos sin pérdida de propiedades mecánicas. Se ha encontrado además, inesperadamente, que con el uso de partículas de hidroxiapatita de tamaño específico, es posible controlar el hinchamiento de los hilos.

De acuerdo con un método para fabricar el hilo de la invención, puede prepararse una composición precursora, en donde puede añadirse hidroxiapatita al ácido hialurónico antes o durante la reticulación del ácido hialurónico. Ahora se ha encontrado inesperadamente que la composición precursora así preparada puede proporcionar hilos con un grosor uniforme, adecuados para aplicaciones cosméticas y médicas.

5

El diámetro del hilo es esencialmente uniforme. Por ejemplo, la variación del diámetro expresado como la desviación estándar relativa del diámetro, por ejemplo, de las mediciones de SEM, tomadas a lo largo de la longitud del hilo es inferior a 20 %; por ejemplo, las mediciones representativas pueden tomarse a partir de al menos 5 puntos, por ejemplo, a partir de al menos 7 puntos, o al menos 10 puntos. Los puntos pueden estar separados por aproximadamente 0.5 mm. La uniformidad de los hilos puede ilustrarse además por el hecho de que el diámetro mínimo medible a lo largo del hilo es al menos 75 % del diámetro máximo medible a lo largo del hilo, lo que excluye los efectos de borde. Preferentemente, las mediciones pueden tomarse desde el segmento central del hilo.

10

Además, los hilos terminados están relativamente secos, es decir, pueden tener entre 0.5 y 33 por ciento en peso de humedad residual.

15

Los hilos pueden prepararse incluso a partir de una composición precursora que comprende ácido hialurónico en concentraciones de aproximadamente 0.2 a 8% p/p. La composición precursora comprende hidroxiapatita de calcio, por ejemplo, entre 0.5 y 20 % en peso. En algunas modalidades, la concentración de hidroxiapatita de calcio está entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 10 por ciento en peso (% en peso). En modalidades adicionales, la concentración de hidroxiapatita de calcio está entre 8 y 20 % en peso. Las partículas de hidroxiapatita pueden tener un tamaño de partícula promedio de 25 a 45 micrómetros de tamaño. Alternativamente, las partículas de hidroxiapatita pueden tener más de 50 micrómetros, por ejemplo, de 45 a 100, en el tamaño de partícula promedio.

20

Los hilos pueden usarse en una aplicación cosmética, médica (incluso quirúrgica) o farmacéutica. Los hilos pueden comprender además material adicional, por ejemplo, medicamentos, son ejemplos no limitantes anestésicos locales, por ejemplo, lidocaína u hormonas, factores de crecimiento, esteroides.

25

En algunas modalidades, se proporciona un proceso para fabricar un hilo de ácido hialurónico e hidroxiapatita de calcio que comprende: reticular en un medio acuoso ácido hialurónico o una sal del mismo mediante adición de un agente de reticulación e incremento del pH del medio; neutralizar el medio acuoso; en donde la hidroxiapatita de calcio está presente en el medio acuoso antes de la neutralización, lo que proporciona así una composición precursora de hilo; formar la composición precursora en un hilo húmedo; y secar el hilo húmedo para proporcionar un hilo seco. Opcionalmente, el proceso comprendió adicionar una base a un recipiente de reacción que se cargó previamente con ácido hialurónico y un agente de reticulación, para formar una mezcla de reacción alcalina, permitir que la mezcla de reacción comience a reticularse, adicionar y dispersar hidroxiapatita de calcio en el recipiente de reacción, permitir que la mezcla de reacción en el recipiente de reacción complete la reacción de reticulación y neutralizar el medio acuoso mediante adición de un agente tampón para llevar el valor de pH a un valor esencialmente neutro. En algunas modalidades, el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en éter diglicidílico de 1,4-butanodiol, éter diglicidílico de poli(etilenglicol) y éter diglicidílico de etilenglicol. Preferentemente, el agente de reticulación es éter diglicidílico de poli-(etilenglicol) o éter diglicidílico de etilenglicol. La concentración de ácido hialurónico en el medio acuoso puede estar entre 0.2 y 8 por ciento en peso. La concentración de la hidroxiapatita de calcio en el medio acuoso puede estar entre 0.5 y 5 por ciento en peso. La concentración de la hidroxiapatita de calcio en el medio acuoso puede estar entre 5 y 20 por ciento en peso. La hidroxiapatita de calcio puede tener una distribución de tamaño de partícula entre 25 y 45 micrómetros. El proceso comprende extrudir la composición precursora a través de un orificio en un líquido de deshidratación o sobre una superficie de secado. El proceso comprende además esterilizar el hilo seco. El diámetro del hilo es esencialmente uniforme, la variación del diámetro expresado como desviación estándar relativa del diámetro de las mediciones de SEM tomadas a lo largo de la longitud del hilo es inferior a 20 %.

30

35

40

45

50

Una composición precursora de hilo comprende ácido hialurónico reticulado con hidroxiapatita de calcio en un medio acuoso, en donde una concentración de hidroxiapatita de calcio en la composición precursora de hilo puede estar entre el 0.5 y 20 por ciento en peso. Preferentemente, la composición precursora de hilo puede fabricarse de acuerdo con uno cualquiera de los procesos como se describieron anteriormente.

55

Se proporciona un hilo que comprende ácido hialurónico reticulado, hidroxiapatita y menos de 33 por ciento en peso de agua de acuerdo con la reivindicación 1. El diámetro del hilo es esencialmente uniforme, la variación del diámetro expresado como desviación estándar relativa del diámetro de las mediciones de SEM tomadas a lo largo de la longitud del hilo es inferior a 20 %. Una concentración de ácido hialurónico en el hilo puede estar entre 15 y 50 por ciento en peso. El ácido hialurónico reticulado puede reticularse con un agente de reticulación y el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en éter diglicidílico de 1,4-butanodiol, éter diglicidílico de poli(etilenglicol) y éter diglicidílico de etilenglicol. La concentración de hidroxiapatita de calcio en el hilo puede estar entre 15 y 25 por ciento en peso. La concentración de hidroxiapatita de calcio en el hilo está entre 45 y 65 por ciento en peso. La hidroxiapatita de calcio puede tener una distribución de tamaño de partícula entre 25 y 45 micrómetros. Opcionalmente, el hilo es estéril.

60

Breve descripción de los dibujos

65

- La Figura 1a muestra una imagen SEM de un hilo de ácido hialurónico reticulado.
 La Figura 1b muestra una imagen SEM de un hilo de ácido hialurónico reticulado con 23 % de hidroxiapatita de calcio.
 La Figura 1c muestra una imagen SEM de un hilo de ácido hialurónico reticulado con 36 % de hidroxiapatita de calcio.
 La Figura 1d muestra una imagen SEM de un hilo de ácido hialurónico reticulado con 54 % de hidroxiapatita de calcio.
 5 La Figura 1e muestra una imagen SEM de un hilo de ácido hialurónico reticulado con 64 % de hidroxiapatita de calcio.
 La Figura 1f muestra una imagen SEM de un hilo de ácido hialurónico reticulado con 68 % de hidroxiapatita de calcio.
 La Figura 1g muestra una imagen SEM de un hilo de ácido hialurónico reticulado con 86 % de hidroxiapatita de calcio.
 La Figura 2a muestra una imagen SEM de una pluralidad de hilos seleccionados preparados de acuerdo con la presente invención.
 10 La Figura 2b muestra una imagen SEM de una pluralidad de hilos comparativos seleccionados.
 La Figura 3a muestra una curva de esfuerzo-deformación de una pluralidad de hilos preparados de acuerdo con la presente invención.
 La Figura 3b muestra una curva de tensión-elasticidad de una pluralidad de hilos comparativos.

15 Descripción detallada de la invención

Generalmente, los hilos de la presente invención se fabrican mediante un proceso de reticulación del ácido hialurónico en un medio acuoso, en presencia de hidroxiapatita de calcio, es decir, se adiciona hidroxiapatita de calcio al medio acuoso antes de que la reacción de reticulación se complete sustancialmente como se describe en la presente descripción. Una vez que la reticulación se completa sustancialmente, se forma una composición precursora, usualmente en forma de un gel. La concentración de hidroxiapatita de calcio en la composición precursora es, por lo tanto, idéntica a la concentración en el medio acuoso de la reacción de reticulación, y la concentración de ácido hialurónico reticulado es esencialmente idéntica a las concentraciones combinadas del ácido hialurónico libre y la del agente de reticulación. La composición precursora puede formarse después en un hilo húmedo, por ejemplo, mediante extrusión a través de un orificio adecuado sobre una superficie de sustrato, opcionalmente un sustrato conformado, con propiedades de superficie deseadas, por ejemplo, una superficie cóncava o convexa, por ejemplo, sobre una superficie de acero inoxidable. El hilo húmedo después se seca para formar un hilo seco.

En el contexto de la presente invención, los términos "apatita", "hidroxiapatita", "hidroxiapatita de calcio" y similares, como se usan en la presente, se refieren a un mineral de hidroxiapatita de fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, de una calidad y pureza adecuadas para su uso/administración, por ejemplo, inyección, en seres humanos.

Aunque no es parte de la invención, la hidroxiapatita puede sustituirse por otros minerales de fosfato de calcio. El término "minerales de fosfato de calcio" se refiere a una familia de minerales que contienen iones de calcio (Ca^{2+}) junto con los ortofosfatos (PO_4^{3-}), metafosfatos o pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) y ocasionalmente iones de hidrógeno o hidróxido. Ejemplos no limitantes de minerales de fosfato de calcio que pueden usarse como una alternativa a la hidroxiapatita son el fosfato de alfa-tri-calcio y el fosfato de beta-tri-calcio. Además pueden ser adecuadas otras partículas de material biocompatible.

La hidroxiapatita se incrusta en los hilos de la presente invención, a medida que puede actuar como un material de relleno dérmico y puede inducir la síntesis de colágeno. Los inventores han encontrado ahora que la inclusión de hidroxiapatita en los hilos puede proporcionar uno o más de: un mejor control de la degradabilidad de los materiales de los hilos, de su comportamiento de hinchamiento, de su biocompatibilidad, sus efectos secundarios reducidos y su osmolaridad controlada.

La hidroxiapatita puede estar presente en los hilos de acuerdo con la invención generalmente en concentraciones entre 2 y 90 % en peso; en algunas modalidades, la concentración está entre 10 y 70 % en peso. La hidroxiapatita puede proporcionarse en forma de polvo, por ejemplo, de una pluralidad de partículas. El tamaño de partícula promedio puede ser menor o igual a 650 μm , preferentemente menor que aproximadamente 200 μm , aún más preferentemente menor que aproximadamente 80 μm , y además puede ser menor que aproximadamente 500 nm. Aún más, preferentemente, aproximadamente al menos 75 % de las partículas de hidroxiapatita pueden tener un tamaño entre 25 μm y 500 μm , o entre 25 μm y 300 μm , o entre 25 μm y 200 μm , o entre 25 μm y 100 μm , preferentemente entre 25 μm y 45 μm . Alternativa o adicionalmente, al menos 75 % de las partículas de hidroxiapatita pueden estar entre 1 μm y 100 μm , o entre 5 μm y 45 μm , o entre 10 μm y 45 μm . Alternativa o adicionalmente, al menos 75 % de las partículas de hidroxiapatita pueden estar entre 30 μm y 400 μm , o entre 35 μm y 255 μm , o entre 45 μm y 100 μm . Los términos "tamaño de partícula promedio", "tamaño de partícula", "tamaño de partícula promedio ponderado" y similares, como se usan indistintamente en la presente descripción con referencia a las partículas de hidroxiapatita de calcio, se refieren a un promedio ponderado de una distribución de tamaño de partículas en polvo de hidroxiapatita de calcio; es decir, el valor promedio del tamaño de partícula en un volumen en polvo tomado como la proporción ponderada de cada fracción.

En el contexto de la presente invención, los términos "ácido hialurónico", "HA" o "hialuronato" se refieren de manera intercambiable a un polisacárido lineal o a su sal, particularmente a un glicosaminoglicano no sulfatado, compuesto de unidades de disacáridos repetidas, cada unidad que consiste en ácido D-glucorónico y D-N-acetilglucosamina, a través de enlaces β -1,4 y β -1,3 glicosídicos alternos.

65

El ácido hialurónico o sus sales pueden provenir de una variedad de fuentes en una variedad de pesos moleculares y otras especificaciones. Generalmente, todas las fuentes de ácido hialurónico pueden ser útiles para los fines de la presente invención, lo que incluye las fuentes bacterianas y aviares.

5 El peso molecular del ácido hialurónico puede usarse como una característica para describir el material. El término "peso molecular" incluye tanto el peso molecular promedio en número como el peso molecular promedio ponderado, como se conoce para los polímeros. Los materiales de ácido hialurónico útiles pueden tener un peso molecular de aproximadamente 0.25 MDa (mega Dalton) a aproximadamente 4.0 MDa, por ejemplo, de aproximadamente 0.5 MDa a aproximadamente 4.0 MDa. Los intervalos útiles de peso molecular del HA incluyen de aproximadamente 0.6 MDa a aproximadamente 2.6 MDa, preferentemente de aproximadamente 1.4 MDa a aproximadamente 1.9 MDa. Los intervalos útiles de peso molecular del HA pueden incluir, además, de aproximadamente 1.0 MDa a aproximadamente 3.0 MDa, de aproximadamente 1.0 MDa a aproximadamente 2.5 MDa, de aproximadamente 1.5 MDa a aproximadamente 2.0 MDa. Específicamente, puede usarse un HA de peso molecular de aproximadamente 0.7 MDa, de aproximadamente 1.8 MDa, o de aproximadamente 2.7 MDa.

15 El ácido hialurónico puede caracterizarse además con un valor de polidispersidad, indicativo de la variación de los pesos moleculares en el polímero. Si bien puede ser ventajoso usar un ácido hialurónico de baja polidispersidad en favor de mejorar la repetibilidad de los procesos, esto puede ser inviable económicamente. Puede lograrse un compromiso razonable entre el ancho de la polidispersidad de los pesos moleculares y el precio del material de partida, y los materiales de ácido hialurónico adecuados pueden tener una polidispersidad de aproximadamente 1.1 a 4.0, preferentemente menos de 3.0, aún más preferentemente menos de 2.0.

25 El ácido hialurónico puede estar al menos parcialmente reticulado. El término "reticulado" como se usa en la presente en referencia al ácido hialurónico debe interpretarse como una modificación química o física de dos o más cadenas de polímeros de ácido hialurónico, lo que resulta en que las cadenas de ácido hialurónico estén unidas entre sí, preferentemente unidas covalentemente. El proceso de reticulación puede incluir preferentemente un agente de reticulación. De manera similar, un proceso de reacción intermolecular o intramolecular sin un agente de reticulación, que resulta en una formación de lactona, un anhídrido o un éster, ya sea dentro de una sola cadena de polímero o entre dos o más cadenas, se denomina en la presente como "deshidratación". La deshidratación puede ocurrir concomitantemente con la reticulación durante los procesos como se describe en la presente descripción. El término "reticulado" puede además usarse en referencia a ácido hialurónico unido covalentemente a un agente de reticulación, o a un ácido hialurónico modificado covalentemente.

35 El término "agente de reticulación" como se usa en la presente se refiere a moléculas que contienen al menos dos grupos funcionales reactivos que crean enlaces covalentes entre dos o más moléculas de ácido hialurónico. Los agentes de reticulación pueden ser homobifuncionales (es decir, tienen dos extremos reactivos que son idénticos) o heterobifuncionales (es decir, tienen dos extremos reactivos diferentes). Los agentes de reticulación adecuados para su uso en la presente invención comprenden usualmente grupos funcionales complementarios a los del ácido hialurónico de manera que podrían formarse las reticulaciones. Preferentemente, la reticulación no forma ácido hialurónico esterificado. Los ejemplos no limitantes de agentes de reticulación adecuados para la presente invención incluyen éter diglicídico de 1,4-butanodiol (BDDE), 1,2,7,8-diepoxi octano (DEO), biscarbodiimida (BCDI), dihidrazida adípica (ADH), bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS3), hexametildiamina (NMDA), 1-(2,3-epoxipropil)-2,3-epoxiciclohexano, agentes de reticulación multifuncionales como éter tetraglicídico de pentaeritrol (PETGE) o PEG basado en éter diglicídico de polietileno (PEGDE), éter diglicídico de mono etilenglicol (EGDE), o una combinación de los mismos. Preferentemente, el agente de reticulación es BDDE. Alternativa o adicionalmente, el agente de reticulación es PEGDE o EGDE.

50 Como se usa indistintamente en la presente descripción, los términos "agente de reticulación a base de PEG" y similares, se refieren a derivados de (poli)etilenglicol. El término "PEG" se refiere a un compuesto de poliéter de polietilenglicol con muchas aplicaciones desde la fabricación industrial hasta la medicina. El PEG se conoce, además, como óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE), en dependencia de su peso molecular. La estructura de PEG se expresa comúnmente como H-(O-CH₂-CH₂)_n-OH. Ejemplos no limitantes de derivados de PEG que pueden usarse como agentes de reticulación son epóxidos de PEG, tales como éter diglicídico de poli(etilenglicol), PEG-dihidrazida, PEG-dihaluros, diazida-PEG, diaminooxi-PEG, diamina-PEG, etc.

55 El término general "condiciones de reticulación" como se usa en la presente se refiere a las condiciones de reacción que permiten la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de HA. Generalmente, las condiciones de reticulación incluyen el ajuste de la mezcla a un pH y temperatura deseados, específicos para un agente de reticulación usado. Las condiciones de reticulación pueden incluir ajustar el pH de la mezcla a un pH superior a 12 y exponer la mezcla a 45 °C durante un primer período, por ejemplo, de 1-5 horas, y después a 25 °C durante un segundo período, por ejemplo, de 10-24 horas. La temperatura de reticulación y el pH óptimos pueden determinarse fácilmente experimentalmente mediante ensayo de las condiciones de reticulación para HA que se conocen bien en la técnica.

65 La concentración en peso del agente de reticulación en el medio acuoso puede estar entre el 0.05 % en peso y 1 % en peso.

La reticulación de HA puede lograrse al disolver/dispersar ácido hialurónico en un disolvente, preferentemente agua, adicionar el agente de reticulación e hidroxiapatita, y llevar la mezcla a las condiciones de reticulación. Alternativamente, el agente de reticulación puede adicionarse gradualmente a una mezcla de ácido hialurónico con aditivos opcionales, en condiciones de reticulación.

5 El HA reticulado con hidroxiapatita dispersada en el mismo proporciona una composición precursora para los hilos. Los términos "hilo" y similares, como se usan indistintamente en la presente descripción, deben interpretarse como un artículo de fabricación alargado a lo largo de un eje imaginario de longitud X, y que tienen una dimensión de diámetro esencialmente perpendicular al eje de longitud X. Como se usa en la presente, el término "hilo" se refiere a una forma
10 larga, delgada y flexible de un material. El hilo como se describe en la presente descripción puede tener una variedad de formas en la sección transversal que se explican más abajo. El término "diámetro" como se usa en la presente en referencia a los hilos, debe interpretarse como el valor de longitud obtenido a lo largo de uno de una pluralidad de ejes imaginarios de grosor perpendiculares al eje imaginario de longitud X del hilo, entre los límites más externos del hilo a lo largo un eje de grosor. Mientras que el término "diámetro" implica un perímetro circular, en referencia a los hilos de la
15 presente invención, debe interpretarse que el término incluye cualquier valor de longitud a lo largo del eje de grosor, independientemente de la forma real del hilo.

El diámetro del hilo usualmente puede tener un valor relativo de desviación estándar inferior a 20 %, por ejemplo, entre 0.5 % y 10 %, o entre 0.5 % y 15 %, o entre 0.5 % y 20 %, o entre 0.5 % y 9 % , o entre 1% y 8.5 %, o entre 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3%, 3.5 % y 4 %, o 9.0 %, 8.5 %, 8.0 %, 7.5 %, 7.0 %, 6.5 %, y 5.0 %, o entre 9.0 %, 8.5 %, 8.0 %, 7.5 %, 7.0 %, 6.5 % y 6.0 %. El diámetro puede medirse mediante cualquier técnica adecuada, por ejemplo, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

El hilo puede tener una cantidad baja de agua, por ejemplo, agua residual. Generalmente, el hilo puede tener menos de 33 % de agua residual, por ejemplo, para un hilo con una cantidad relativamente baja de hidroxiapatita de calcio, por ejemplo, entre 10 y 40 %, el hilo puede tener entre 10 y 33% de agua residual, o para un hilo con una cantidad relativamente alta de hidroxiapatita de calcio, por ejemplo, entre 45 y 75 % en peso, el hilo puede tener entre 10 y 20 % de agua residual. Los términos "porcentaje de humedad", "agua residual", "pérdida por secado" y similares, como se usan indistintamente en la presente descripción, deben interpretarse como el porcentaje total de agua por peso remanente en un hilo. En una modalidad, el porcentaje de humedad del hilo es aproximadamente 40 por ciento o menos, o alternativamente, aproximadamente 30 por ciento o menos, aproximadamente 20 por ciento o menos, o alternativamente, aproximadamente 10 por ciento o menos. Esto puede medirse típicamente mediante la titulación de Karl Fisher. Alternativamente, el porcentaje de humedad puede medirse, además, mediante la pérdida de peso de los hilos al secarlos hasta un peso constante a 105 °C, es decir, 100 % menos la relación del peso de un hilo seco hasta el peso constante con su peso antes de secar, o mediante medición de la cantidad de agua que puede evaporarse al vacío del hilo o por cualquier otro medio para cuantificar la cantidad de agua en el hilo.

El hilo puede comprender además material biológicamente activo, por ejemplo, fármacos. Los ejemplos no limitantes de fármacos adecuados para los materiales compuestos incluyen anestesia local, por ejemplo, lidocaína, y además hormonas, factores de crecimiento y esteroides.

Preferentemente, el hilo comprende:

- 45 i) agua residual, entre 10 y 33 %;
- ii) ácido hialurónico reticulado o una de sus sales, a una concentración entre 15 y 50 % en peso (p/p);
- iii) hidroxiapatita a una concentración entre 10 y 75 % en peso (p/p), como se describe en la presente descripción; y opcionalmente
- iv) fármaco, por ejemplo, un anestésico local, como la lidocaína, hasta 1 % p/p.

50 El hilo puede comprender además agentes tampón y agentes de osmolaridad, por ejemplo, cloruro de sodio.

La composición precursora puede comprender habitualmente ácido hialurónico reticulado o una sal del mismo, e hidroxiapatita de calcio. Preferentemente, la composición precursora comprende:

- 55 i) agua;
- ii) ácido hialurónico reticulado o una de sus sales, a una concentración entre 0.2 y 8 % en peso (p/p);
- iii) hidroxiapatita a una concentración entre 0.5 y 20 % en peso (p/p), como se describe en la presente descripción; y opcionalmente
- iv) fármaco, por ejemplo, un anestésico local, como la lidocaína, hasta 1 % p/p.

60 La composición precursora puede comprender además agentes tampón y agentes de osmolaridad, por ejemplo, cloruro de sodio.

65 La concentración de ácido hialurónico en la composición precursora puede variar de 0.2 a 8 % en peso, o de 1 a 6 % en peso, o de 1.5 a 5 % en peso, o de 2.5 a 4.5 % en peso, o aproximadamente 4 % en peso. Preferentemente, la concentración de ácido hialurónico está entre 1 y 4 % p/p.

5 La concentración de partículas de hidroxiapatita en la composición precursora puede estar entre 0.5 y 5 % en peso, 0.7 y 4.5 % en peso, o entre 1 y 4 % en peso, o entre 1.5 y 3.5 % en peso, entre 1.7 y 3 % en peso, o entre 2 y 3 % en peso, o entre 2.2 y 2.7 % en peso. De acuerdo con una modalidad, las partículas de hidroxiapatita de calcio están presentes en la composición precursora a una concentración de 2.5 % p/p.

10 Alternativamente, la concentración de partículas de hidroxiapatita en la composición precursora puede estar entre 5 y 15 % en peso, 6 y 14 % en peso, o entre 6.5 y 13 % en peso, o entre 7 y 12 % en peso, entre 7.5 y 12 % en peso, o entre 8.5 y 11.5 % en peso, o entre 9 y 11 % en peso. De acuerdo con una modalidad, las partículas de hidroxiapatita de calcio están presentes en la composición precursora a una concentración de 10 % p/p.

15 La concentración de partículas de hidroxiapatita en el hilo puede estar entre 2 y 90 % en peso, por ejemplo, 10 y 75 % en peso. En algunas modalidades, la concentración puede estar entre 10 a 30 % en peso, o entre 15 y 25 % en peso, o entre 17 y 23 % en peso, o entre 18.5 y 21.5 % en peso. En otras modalidades, la concentración puede estar entre 40 y 75 % en peso, o entre 45 y 70 % en peso, o entre 47.5 y 65 % en peso, o entre 50 y 62.5 % en peso, o entre 55 y 62.5 % en peso, o entre 55 y 60 % en peso.

El hilo de la presente invención puede usarse en una aplicación farmacéutica, médica o cosmética.

20 La composición precursora puede prepararse mediante un método que comprende las etapas de: a) preparación de una mezcla que comprende agua y al menos 0.2 % a 8 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, y un agente de reticulación; b) adición de hidroxiapatita a una concentración entre 0.5 % en peso a 15 % en peso, y dispersarla homogéneamente en el ácido hialurónico, y c) exponer la mezcla a condiciones de reticulación para obtener un gel precursor.

25 Las composiciones precursoras pueden prepararse mediante un método que comprende las etapas de: a) preparación de una primera mezcla que comprende agua y al menos 0.2 % a 8 % en peso de ácido hialurónico o una sal del mismo, y un agente de reticulación; b) exponer la mezcla a condiciones de reticulación; c) adición de hidroxiapatita a una concentración entre 0.5 % en peso a 20 % en peso, d) exponer aún más la mezcla a condiciones de reticulación, y e) neutralizar la mezcla.

30 El pH y la osmolaridad de la composición precursora pueden ajustarse adicionalmente a valores fisiológicos. La neutralización puede llevarse a cabo mediante la adición de soluciones acuosas que comprenden agentes tampón farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de fosfato, de pH entre 6 y 8, de acuerdo con el requisito del pH final.

35 De manera similar, el ajuste de osmolaridad puede realizarse mediante adición a la mezcla de una solución de sales, por ejemplo, cloruro de sodio, y mezcla de la formulación para obtener un gel homogéneo.

40 En cualquier etapa del proceso de fabricación, la mezcla puede ensayarse con fines de control de calidad. Las pruebas estándar aplicables son conocidas por un experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, reometría, determinación del pH, cuantificación del agente de reticulación residual, microscopía, velocidad de sedimentación por centrifugación, y otros.

45 La composición precursora preparada puede molerse, por ejemplo, por extrusión, o mediante un mezclador de alto cizallamiento, para mejorar las propiedades de flujo antes de formar hilos. La molienda puede realizarse en presencia de componentes líquidos adicionales, por ejemplo, agua y/o solución de ajuste de osmolaridad y/o neutralización.

La composición precursora puede introducirse en jeringas y esterilizarse, por ejemplo, en autoclave, o mediante irradiación gamma, antes de la formación de hilos. Alternativamente, los hilos pueden formarse y secarse, y después, esterilizarse.

50 Los hilos estériles pueden usarse en una variedad de aplicaciones, por ejemplo, en relleno de tejidos, tal como relleno de arrugas, sutura o relleno de injertos óseos, atenuación de marcas por estiramiento (estrías), atenuación de cicatrices, estiramientos faciales, remodelación y aumento de tejidos, administración de fármacos, mesoterapia, biorevitalización y cirugía.

55 En algunas modalidades, los hilos se forman al extrudir una composición precursora a través de un orificio con la forma y las dimensiones deseadas. Los hilos formados pueden conformarse además de acuerdo con la necesidad, y finalmente se secan. Así, cualquier método que permita la extrusión de la composición precursora a través de un orificio con la forma y dimensiones deseadas puede usarse para formar los hilos de la presente invención.

60 En algunas modalidades, los hilos pueden formarse al conformar la composición precursora en una película y secar la composición formada. La conformación de la película formada en hilos puede realizarse mediante corte de hilos de la película.

65 Los hilos como se describen en la presente descripción pueden hacerse en una variedad de formas. El término "sustancialmente cilíndrico" se refiere a un hilo en donde la sección transversal del hilo es circular. El término "sustancialmente", como se usa en la presente, se refiere a las formas de los hilos que al menos 50 por ciento del hilo tiene la forma aproximada descrita. El término sustancialmente se usa además para abarcar hilos que tienen una variedad

de formas a lo largo de la longitud del hilo. Por ejemplo, un hilo podría ser sustancialmente cilíndrico pero los extremos del hilo podrían estar afilados. En algunas modalidades, los hilos sustancialmente cilíndricos pueden proporcionarse cuando el ángulo de contacto de la composición de gel y el sustrato sobre el que se extrude tienen un ángulo de contacto de equilibrio mayor que aproximadamente 90 grados.

5

El término "sustancialmente en forma de D" se refiere a un hilo en donde la sección transversal es lenticular, por ejemplo, en forma de D o sustancialmente semicircular. Los hilos sustancialmente en forma de D tienen un lado plano y un lado sustancialmente redondo. En algunas modalidades, los hilos sustancialmente en forma de D pueden proporcionarse cuando el ángulo de contacto de la composición de gel y el sustrato sobre el que se extrude tienen un ángulo de contacto de equilibrio de aproximadamente 90 grados.

10

El término "sustancialmente en forma de cinta" se refiere a un hilo en el que el grosor del hilo es menor que aproximadamente 50 por ciento del ancho del hilo. En algunas modalidades, la sección transversal es sustancialmente rectangular u ovalada. En algunas modalidades, los hilos sustancialmente en forma de cinta pueden proporcionarse cuando el ángulo de contacto de la composición de gel y el sustrato sobre el que se extrude tienen un ángulo de contacto en equilibrio de menos de aproximadamente 90 grados. Alternativamente, los hilos en forma de cinta pueden formarse mediante corte de un gel húmedo para lograr la forma de sección transversal deseada. La "forma de cinta" puede además incluir formas que son sustancialmente elipsoidales. El término "sustancialmente elipsoidal" se refiere a un hilo en donde la sección transversal es sustancialmente oblonga o elíptica.

15

20

En un aspecto, los hilos pueden formarse al proporcionar la composición precursora en un compartimento cerrado que tiene una salida y por aplicación de presión al compartimento cerrado mientras la salida permanece abierta, lo que extrude así la composición precursora en forma de un hilo.

25

En un aspecto, se proporciona un hilo que comprende ácido hialurónico e hidroxiapatita, en donde al menos una porción del ácido hialurónico está sustancialmente reticulada.

30

En una modalidad, el hilo comprende HA en una concentración de 10 % y 60 % (p/p), e hidroxiapatita en una concentración entre 10 % y el 75 % (p/p).

En otra modalidad, el hilo comprende HA en una concentración de entre 2 % y 80 % (p/p) y entre 2 % y 90 % (p/p) de CaHAp.

35

En otra modalidad, el hilo comprende HA en una concentración de entre 5 % y 40 % (p/p) y entre 10 % y 80 % (p/p) de CaHAp.

En otra modalidad, el hilo comprende HA en una concentración de entre 10 % y 30 % (p/p) y entre 30 % y 60 % (p/p) de CaHAp.

40

En otra modalidad, el hilo comprende HA en una concentración de entre 15 % y 25 % (p/p) y entre 45 % y 55 % (p/p) de CaHAp.

45

En otra modalidad, el hilo comprende HA en una concentración de entre 2 % y 50 % (p/p) y entre 10 % y 80 % (p/p) de CaHAp.

50

En una modalidad, el hilo tiene un diámetro de al menos aproximadamente 0.01 mm. En una modalidad, el hilo tiene un diámetro de entre 0.05 a 0.2 mm, de 0.4 a 0.6 mm, entre 0.35 a 0.65 mm, entre 0.3 a 0.7 mm, entre 0.2 a 0.8 mm, entre 0.1 a 0.6 mm, entre 0.1 a 0.8 mm, entre 0.1 a 1 mm, entre 0.1 a 2 mm, entre 0.1 a 3 mm, entre 0.3 a 1 mm, entre 0.3 a 2 mm o entre 0.3 a 3 mm.

55

El término "capacidad de hinchamiento", como se usa en la presente, se refiere a la capacidad del hilo seco para absorber agua (o una solución acuosa). En algunas modalidades, el hilo seco puede absorber agua (o una solución acuosa) hasta aproximadamente 50 veces su peso, 30 veces su peso, 10 veces su peso, 5 veces su peso, 2 veces su peso. En otra modalidad más, el hilo no absorbe agua en absoluto y, así, no se hincha.

En otra modalidad, el hilo se alarga en el tejido hasta 400 % de su longitud, hasta 300 % de su longitud, hasta 200 % de su longitud, hasta 150 % de su longitud, hasta 120 % de su longitud, o nada en absoluto.

60

En otro aspecto más, se proporciona un hilo que comprende ácido hialurónico reticulado e hidroxiapatita preparado mediante las etapas de: a) preparar una composición precursora que comprende HA reticulado e hidroxiapatita de calcio; b) extrudir la composición precursora para formar un hilo húmedo; y c) secar el hilo húmedo para formar un hilo seco.

65

En otro aspecto, se proporciona un hilo que comprende ácido hialurónico reticulado e hidroxiapatita preparado mediante las etapas de: a) preparar una composición precursora que comprende formulación de HA reticulado y CaHAp; b) extrudir la composición precursora para formar un hilo húmedo; c) secar el hilo húmedo para formar un hilo seco; d) poner en contacto el hilo seco con solución de neutralización; y e) volver a secar el hilo neutralizado.

5 En una modalidad, el secado se puede llevar a cabo en condiciones controladas, por ejemplo, 25°C y 50 % de humedad relativa. El tiempo de secado usualmente puede ser de menos de 10 minutos, menos de 30 minutos, menos de 1 hora, menos de 2 horas, menos de 3 horas, menos de 4 horas, menos de 6 horas, menos de 10 horas, menos de 12 horas, menos de 24 horas, menos de 48 horas o más de 48 horas, o entre 5 y 10 minutos, entre 5 y 30 minutos, entre 10 y 30 minutos, entre 10 y 60 minutos, entre 30 y 60 minutos, entre 30 y 120 minutos, y entre 60 y 120 minutos.

10 En una modalidad, se proporciona un hilo de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el hilo terminalmente se esteriliza.

15 Algunas modalidades específicas de la presente invención pueden demostrarse mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden limitarla en ningún aspecto.

15 EJEMPLOS

20 Generalmente, los hilos se prepararon en dos etapas básicas: i) preparación de una composición precursora de HA y CaHAp, y ii) preparación de hilos a partir de la composición precursora.

20 Ejemplo 1 - Hilos de ácido hialurónico e hidroxiapatita

25 Se adicionó hialuronato sódico (HA) de peso molecular 1.3-2.0 MDa (etiquetado de 1.3 MDa, grado farmacéutico, 7.1% de agua, suministrado por Bloomage Freda), 1.60 g a 13.55 g de agua, seguido de 0.157 g de éter diglicídico de 1,4 butanodiol (BDDE) (suministrado por TCI), se mezcló completamente con una espátula y después hasta disolución a temperatura ambiente, a 2000 rpm mediante el uso de un mezclador Thinky Planetary modelo ARM-310 durante 2 minutos. La solución se dejó incubar a 25 °C durante 30 minutos.

30 Después de eso, se adicionaron 2696 mg de una solución de hidróxido de sodio 1 M (NaOH) a la mezcla, lo que llevó el pH > 12. La mezcla se homogeneizó después durante 10 minutos a 2000 rpm mediante el uso del mezclador centrífugo. La solución se dejó incubar a 25 °C durante otros 120 minutos.

35 Se adicionaron a la mezcla microesferas densas de hidroxiapatita de calcio $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (grado médico), con un tamaño de partícula promedio de 25-45 micrómetros, 4.00 g, y después se mezclaron de nuevo durante 10 min a 2000 rpm. La mezcla se colocó después en un horno ajustado a 45 °C durante 3 horas, y después se colocó a 25 °C durante 18 horas adicionales.

40 La mezcla se neutralizó al forzar el gel reticulado a través de una jeringa de 50 mL dentro de una solución de neutralización. La composición de la solución de neutralización fue de 0.084 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) (Grado farmacéutico, suministrado por Merck), 0.295 g de hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4) (Grado farmacéutico, suministrado por Merck), 15.71 g de agua para inyección y 1.92 g de solución de ácido clorhídrico (HCl) 1M (grado farmacéutico, suministrado por Merck). La mezcla se mezcló después durante 10 minutos a 2000 rpm mediante el uso del mezclador centrífugo. El gel finalmente se desgasificó *al vacío* al someterlo a 20 mbar al vacío durante 30 minutos, y se transfirió a una jeringa de 50 mL.

45 La masa se extruyó después a través de agujas romas 16G o 19G sobre una superficie de polipropileno para crear hilos al mover la jeringa con relación a la superficie mientras se empujó el émbolo, a aproximadamente 1 mm/segundo. Los hilos se secaron durante aproximadamente 20 horas a 25 °C y 50 % de humedad relativa en una incubadora de clima controlado (Binder KBF-720).

50 La composición precursora contenía aproximadamente el 3.7 % de ácido hialurónico reticulado, aproximadamente 10 % de hidroxiapatita de calcio y aproximadamente 84.5 % de agua, y los hilos contenían aproximadamente 20.9% de ácido hialurónico reticulado, aproximadamente 56.3% de hidroxiapatita de calcio, y aproximadamente 12.8% del agua residual.

55 Después, los hilos se humedecieron con agua desionizada durante más de 20 minutos antes de medir sus pesos y longitudes. Estas mediciones se resumen en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1

	Aguja	Hilo núm.	Inmediatamente después de la extrusión		Después de secar		Después de humedecer	
			Longitud (mm)	Peso (mg)	Longitud (mm)	Peso (mg)	Longitud (mm)	Peso (mg)
5	16G	1	118	360	109	63.2	176	286
10		2	117	324.1	102	58.7	166	259
		3	111	303.0	96	54.0	149	225
15	19G	1	108	84.5	102	15.4	167	65.7
		2	127	116	116	20.5	187	101.8
20		3	112	101	103	17.3	166	85.2

Ejemplo 2 - cantidad variable de hidroxiapatita en los hilos

Los hilos se prepararon a partir de precursores que comprendían 0 a 30 % de hidroxiapatita de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se adicionó BDDE al agua, seguido de polvo de HA. La mezcla se mezcló manualmente, seguido de 2 minutos de mezcla con el uso de un mezclador Thinky (a 2000 rpm). Después de 30 minutos, se adicionó y se mezcló una solución de NaOH 1 M, primero manualmente, y después 2 minutos en un mezclador Thinky (a 2000 RPM). Se repitieron ambas etapas de mezclado. La mezcla se mezcló después durante 1 hora con un dispositivo de mezcla Rotogen (Collomix). La mezcla se mezcló manualmente con las cantidades adecuadas de CaHAp, seguido de mezclado con Thinky (4 min 2000 rpm). Las mezclas se colocaron después a 45 °C durante 3 horas, seguidas de 15 horas a 25 °C. Después las mezclas se neutralizaron con la solución de neutralización y se desgasificaron. Se obtuvieron hilos mediante extrusión del precursor a través de una boquilla 19G sobre una superficie de acero inoxidable, seguido de 2 horas de secado a 25 °C y 50 % de humedad relativa.

Las cantidades de los ingredientes fueron las descritas en el Ejemplo 1, con una cantidad variable de calcio. El hilo que no tiene hidroxiapatita de calcio no es parte de esta invención. Las características de los hilos así obtenidos se dan como promedios ± desviación estándar, en la Tabla 2. Las cantidades de los ingredientes se resumen en la Tabla 3.

Las micrografías electrónicas de barrido de los hilos se muestran en las Figuras 1a-1f.

Tabla 2

	% de CaHAp	% de Elongación	% de hinchamiento	Resistencia a la tracción (N)	Diámetro	% RSD de diámetro
45	0%	30±0.88	321±11.05	1.43±0.22	236±17	7.2
	2.5%	33±0.54	222±12.46	1.22±0.08	255±23	9.1
	5%	33±0.97	262±13.04	1.22±0.08	267±16	6.0
50	10%	33±1.60	154±10.97	0.87±0.05	315±28	8.9
	15%	36±0.73	151±2.87	0.82±0.08	339±32	9.4
	20%	36±2.67	135±9.02	0.70±0.07	417±34	8.2
55	30%	36±0.62	125±6.55	0.56±0.15	527±25	4.7

Tabla 3

	% de secado	Hidroxiapatita de calcio		Agua		Ácido hialurónico	
		Precursor	Hilo	Precursor	Hilo	Precursor	Hilo
5	91.0±0.2	0%	0	94.21	35.7	4.00	44.4
	89.1±0.3	2.5 %	22.9	91.83		3.99	36.6
10	85.9±0.4	5%	35.5	89.50	25.5	3.8	27.0
	81.5±0.5	10%	54.1	84.79	17.8	3.6	19.5
	76.6±0.3	15%	64.1	80.08	14.9	3.4	14.5
15	70.4±0.5	20%	67.6	75.37	16.8	3.2	10.8
	65.0±0.3	30%	85.7	65.95	2.7	2.8	8.0

20 La resistencia a la tracción se midió con el uso de un instrumento de medición de la resistencia a la tracción (modelo Dillon GL050) acoplado a una máquina de prueba universal (IMADA MX2-110-s), mediante estiramiento de un solo hilo seco de 100 mm de longitud a una velocidad de 45 mm/seg. El diámetro del hilo se midió en cinco especímenes por hilo con el uso de microscopía electrónica de barrido. Se realizaron siete mediciones en cada espécimen, en puntos separados aproximadamente 0.5 mm a lo largo de una sección de aproximadamente 3.5 mm del espécimen de hilo.

25 Puede apreciarse que aunque la presencia de hidroxiapatita reduce la resistencia y la capacidad de hinchamiento de los hilos, inesperadamente hay un intervalo de concentración de hidroxiapatita en donde ambos valores aún son aceptables para las aplicaciones previstas.

30 Igualmente puede apreciarse fácilmente que la desviación estándar relativa del grosor (es decir, el diámetro) de los hilos es muy baja, lo que indica la homogeneidad del hilo.

Ejemplos 3A (de la invención), 3B (comparativo *basado* en la solicitud de patente de Estados Unidos 2015/0257989), y 3C (*comparativo basado* en la solicitud de patente PCT WO2013055832) - el efecto del proceso

35 Las composiciones precursoras de hilo se prepararon de acuerdo con tres procedimientos diferentes. Las composiciones precursoras contenían 3.6 % de ácido hialurónico y 10 % de hidroxiapatita de calcio.

40 Los hilos 3.A se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 2. Brevemente, en los hilos del ejemplo comparativo 3.B se adicionó hidroxiapatita de calcio después de la etapa de neutralización; el ejemplo comparativo 3.C carece de hidroxiapatita de calcio.

45 Los precursores de los hilos 3.B se prepararon de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 de la Solicitud de patente de Estados Unidos 2015/0257989, a favor de Anteis SA y se secaron como se describe en el ejemplo 2. En resumen, el HA se mezcló con NaOH (Rotogen, 300 RPM, 90 minutos), después se adicionó BDDE y se mezcló suavemente y la mezcla se colocó a 50 °C durante 2 horas. Después se adicionó solución de HCl 1M y la mezcla se mezcló con el uso de un agitador superior (5 minutos, 70 RPM). La mezcla se dializó después en una solución de neutralización durante 24 horas. Se adicionó una solución de neutralización adicional para alcanzar la concentración final de HA y se mezcló (Rotogen, 300 RPM, 90 minutos). Después se adicionó CaHAp, 10 % en peso, se mezcló (Rotogen, 300 RPM, 90 minutos) y se desgasificó.

50 Los precursores de los hilos 3.C se prepararon de acuerdo con el procedimiento adaptado del Ejemplo 1 de la Solicitud de patente PCT WO2013055832, a favor de Tautona Group LP y se secaron como se describió en el Ejemplo 2. En resumen, el polvo de HA se hidrata en aproximadamente 75 % de un volumen total de NaOH durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 50 °C. El HA hidratado se adicionó después a una jeringa y se mezcló bien (jeringa a jeringa aproximadamente 20 veces). El calentamiento se continuó durante aproximadamente 30 minutos. El agente de reticulación (BDDE) se disolvió después en la porción restante del volumen total de NaOH (25 % del volumen total), se adicionó a la solución de ácido hialurónico hidratado, se mezcló completamente (jeringa con jeringa aproximadamente 20 veces), se calentó durante aproximadamente 30 minutos y se volvió a mezclar (de jeringa a jeringa aproximadamente 20 veces). El calentamiento se continuó a aproximadamente 50 °C durante 3 a 5 horas adicionales.

60 Los hilos se secaron como se describió en el Ejemplo 2. La composición precursora de hilo 3.C no proporcionó hilos, ya que estaba demasiado blanda y no podía procesarse en hilos.

65 Los hilos de las composiciones precursoras 3.A y 3.B se evaluaron como en el Ejemplo 2.

Se evaluaron diez especímenes de cada tipo en pruebas de hinchamiento y cinco especímenes para pruebas mecánicas. El diámetro se midió como en el Ejemplo 2 en puntos separados aproximadamente 0.5 mm, a lo largo de secciones de aproximadamente 7 mm.

5 Los resultados se resumen en la Tabla 4 más abajo. Los valores se dan como promedios \pm desviación estándar.

Las micrografías electrónicas de barrido de hilos seleccionados se muestran en las Figuras 2a y 2b. La Figura 2a muestra hilos 3.A de la presente invención, y la Figura 2b muestra hilos 3.B de la técnica comparativa.

10 Tabla 4

Hilo	% de Elongación	% de hinchamiento	Resistencia a la tracción (N)	diámetro	% de diámetro RSD
15 3.A	32 \pm 0.42	145 \pm 3.25	0.87 \pm 0.05	295 \pm 19	6.4
3.B	8.42 \pm 0.41	62.4 \pm 11.35	0.49 \pm 0.27	272 \pm 81	29.8
3.C	No se obtuvo ningún hilo.				

20 Las curvas de tensión-deformación de los hilos se presentan en la Figura 3. Puede observarse que los hilos mostraron un comportamiento diferente al estirarse. Como los hilos 3.A mostraron una elongación plástica antes del fallo, los hilos 3.B eran más frágiles. Además, la uniformidad en los hilos 3.A ha dado lugar a una menor RSD en el valor máximo de resistencia a la tracción, a diferencia de los hilos 3.B altamente variables.

25 Como puede observarse en las imágenes SEM y en el alto valor de desviación estándar en el diámetro promedio de los hilos, los hilos 3.B son menos uniformes en términos de su diámetro y la distribución de las partículas de hidroxiapatita en el hilo. La falta de uniformidad en el hilo 3.B, que se refleja en los valores altos de RSD, hace que tenga más puntos débiles y una tendencia a fallar en un uso razonable.

30 Ejemplo 4 - el efecto del tamaño de partícula de hidroxiapatita en los hilos

35 Se prepararon y examinaron los hilos con diferentes tamaños de hidroxiapatita. Los hilos se prepararon de acuerdo con el procedimiento y la composición en el Ejemplo 2, con 10 % de hidroxiapatita de calcio. Las partículas tenían un tamaño promedio ponderado de la siguiente manera: 4.a) ~Esferas de 12 μ m; 4.b) esferas de 25-45 μ m, como en el Ejemplo 2, y 4.c) esferas de 45-100 μ m.

40 Los resultados se resumen en la Tabla 5 más abajo. Los valores se dan como promedios \pm desviación estándar. Se usaron cinco especímenes. El diámetro se calculó a partir de segmentos de aproximadamente 3.5 mm de longitud cada 0.5 mm.

45 Tabla 5

Hilo	% de Elongación	% de hinchamiento	Resistencia a la tracción (N)	Diámetro	% de diámetro RSD
45 4.A	26 \pm 1.60	147 \pm 12.31	1.16 \pm 0.15	278 \pm 20	7.2
4.B	32 \pm 0.42	145 \pm 3.25	0.87 \pm 0.05	295 \pm 19	6.4
4.C	42 \pm 1.29	449 \pm 11.61	0.62 \pm 0.08	293 \pm 31	10.6

50 Puede apreciarse fácilmente que las partículas de hidroxiapatita afectan las características del hilo. Cuanto más grandes son las partículas, más débil es el hilo y además se alargan más. Igualmente puede apreciarse fácilmente que los hilos que comprenden partículas más grandes exhibieron una capacidad de hinchamiento inesperadamente alta. Puede observarse que las partículas con un tamaño promedio ponderado entre 25 y 45 micrómetros proporcionan los hilos más homogéneos.

55 Ejemplo 5 - Preparación de hilos con diferentes reticulantes

60 Los hilos se prepararon de acuerdo con la formulación y el procedimiento del Ejemplo 2. La composición precursora 5.A contenía éter diglicídico de 1,4-butanodiol BDDE para el reticulante; 5.B éter diglicídico de Poli(etilenglicol) (PEG-DE, suministrado por Sigma); y 5.C éter diglicídico de Etilenglicol (EG-DE, suministrado por TCI).

65 Los resultados se resumen en la Tabla 6 más abajo. Los valores se dan como promedios \pm desviación estándar. Se usaron cinco especímenes. El diámetro se calculó a partir de segmentos de aproximadamente 7.0 mm de longitud cada 0.5 mm.

Tabla 6

Hilo	% de Elongación	% de hinchamiento	Diámetro	% de diámetro RSD
5.A	32±0.42	145±3.25	295±19	6.4
5.B	51±3.56	278±14.50	329±24	7.3
5.C	55±3.14	303±22.01	421±41	9.7

Puede apreciarse fácilmente que todos los hilos eran homogéneos. Sin embargo, aunque todas los hilos se fabricaron de la misma manera con el uso de la misma formulación y proceso, los hilos que comprenden enlazantes de etilenglicol exhibieron inesperadamente un aumento significativo de la capacidad de alargamiento e hinchamiento sin perder la resistencia mecánica del hilo.

Ejemplo 6- Preparación de hilos por colgamiento y el secado al aire

La composición precursora obtenida como en el Ejemplo 1 se colocó en una jeringa de 1 mL con una boquilla de una aguja 21G. La jeringa se aseguró con la boquilla orientada levemente hacia abajo, para permitir que la gravedad tire hacia abajo de la composición precursora expulsada. Se inyectaron aproximadamente 50 mg de la composición precursora sobre una superficie plana, y se formó un hilo mediante elevación de la jeringa a 10 cm de altura. El hilo se dejó secar al aire. El hilo resultante era delgado, redondo y uniforme.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un hilo que comprende ácido hialurónico reticulado, hidroxiapatita de calcio y menos de 33 por ciento en peso de agua, en donde el diámetro del hilo es esencialmente uniforme, la variación del diámetro expresada como desviación estándar relativa del diámetro de las mediciones de SEM tomadas a lo largo de la longitud del hilo es inferior a 20 %.
- 10 2. Un hilo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una concentración del ácido hialurónico en el hilo está entre 15 y 50 por ciento en peso.
- 15 3. El hilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el ácido hialurónico reticulado se reticula con un agente de reticulación y el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en éter diglicidílico de 1,4-butanodiol, éter diglicidílico de poli-(etilenglicol) y éter diglicidílico de etilenglicol.
- 20 4. El hilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde una concentración de hidroxiapatita de calcio en el hilo está entre 10 y 35 por ciento en peso.
- 25 5. El hilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde una concentración de hidroxiapatita de calcio en el hilo está entre 35 y 75 por ciento en peso.
- 30 6. El hilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la hidroxiapatita de calcio tiene una distribución de tamaño de partícula promedio ponderado entre 25 y 45 micrómetros.
- 35 7. Un proceso para fabricar un hilo como se define en la reivindicación 1, el proceso comprende:
reticular en un medio acuoso ácido hialurónico o una sal del mismo mediante la adición de un agente de reticulación y el aumento del pH del medio;
neutralizar el medio acuoso;
en donde la hidroxiapatita se adiciona al ácido hialurónico antes o durante la reticulación del ácido hialurónico, lo que proporciona así una composición precursora de hilos;
40 formar la composición precursora en un hilo húmedo; y
secar el hilo húmedo para proporcionar un hilo seco.
- 45 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende adicionar una base a un recipiente de reacción que se cargó previamente con ácido hialurónico y un agente de reticulación, para formar una mezcla de reacción alcalina, lo que permite que la mezcla de reacción comience la reticulación, adicionar y dispersar hidroxiapatita de calcio en el recipiente de reacción, lo que permite que la mezcla de reacción en el recipiente de reacción complete la reacción de reticulación y neutralizar el medio acuoso mediante adición de un agente tampón para llevar el valor de pH a un valor esencialmente neutro.
- 50 9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en donde el agente de reticulación se selecciona del grupo que consiste en éter diglicidílico de 1,4-butanodiol, éter diglicidílico de poli(etilenglicol) y éter diglicidílico de etilenglicol.
- 55 10. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde una concentración de ácido hialurónico en el medio acuoso está entre 0.2 y 8 por ciento en peso.
11. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde una concentración de hidroxiapatita de calcio en el medio acuoso está entre 0.5 y 5 por ciento en peso.
12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde una concentración de hidroxiapatita de calcio en el medio acuoso está entre 5 y 20 por ciento en peso.
13. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde la hidroxiapatita de calcio tiene una distribución de tamaño de partícula promedio ponderado entre 25 y 45 micrómetros.
- 60 14. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en donde la conformación comprende extrudir la composición precursora a través de un orificio en un líquido de deshidratación o sobre una superficie de secado.
15. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en donde el diámetro del hilo es esencialmente uniforme, la variación del diámetro expresada como desviación estándar relativa del diámetro de las mediciones de SEM tomadas a lo largo de la longitud del hilo es inferior a 20 %.

Fig. 1a

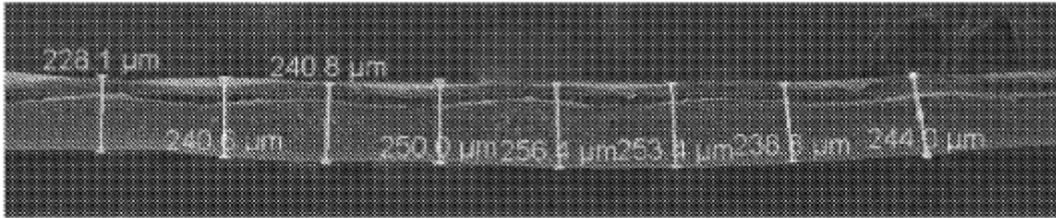


Fig. 1b

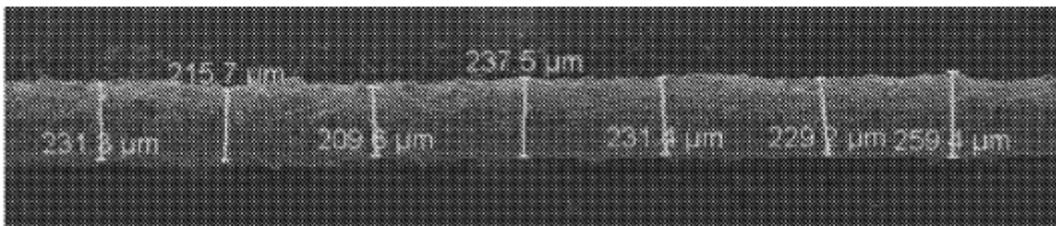


Fig. 1c



Fig. 1d

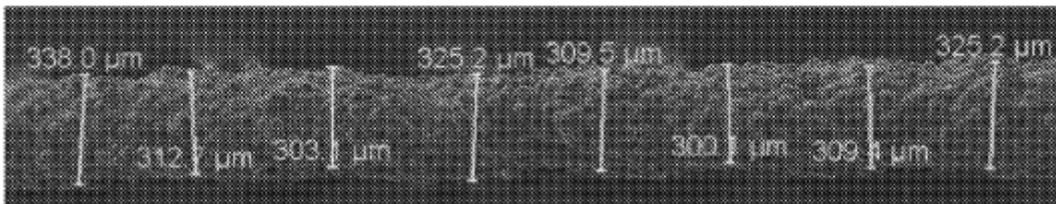


Fig. 1e

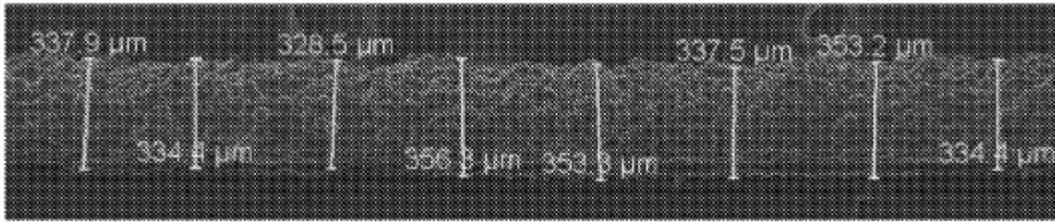


Fig. 1f

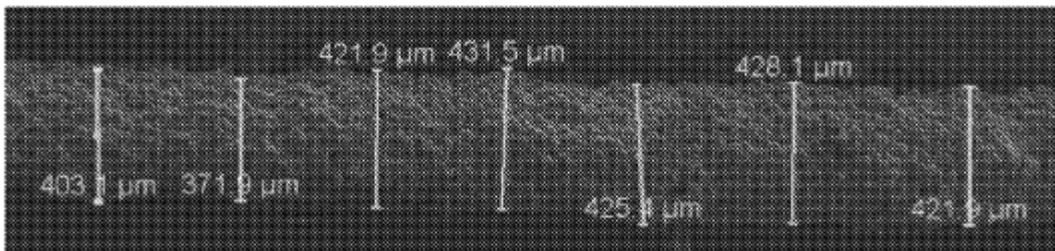


Fig. 1g

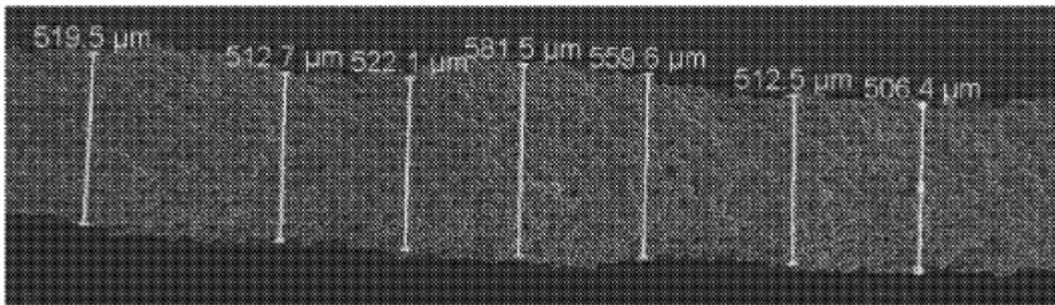


Fig. 2a

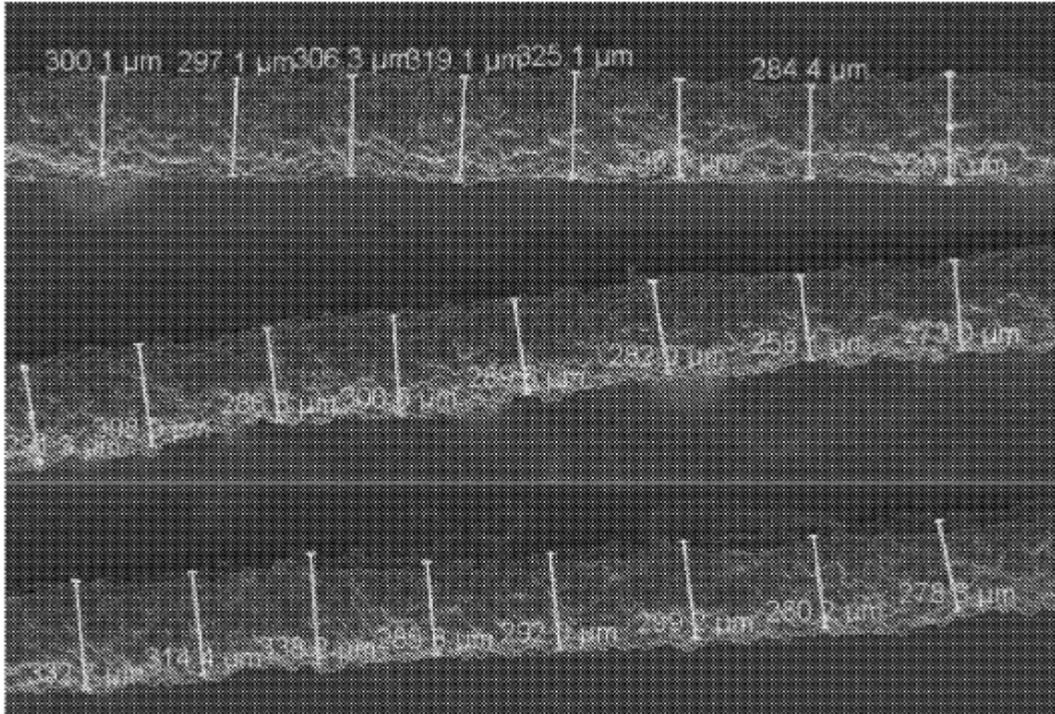


Fig. 2b

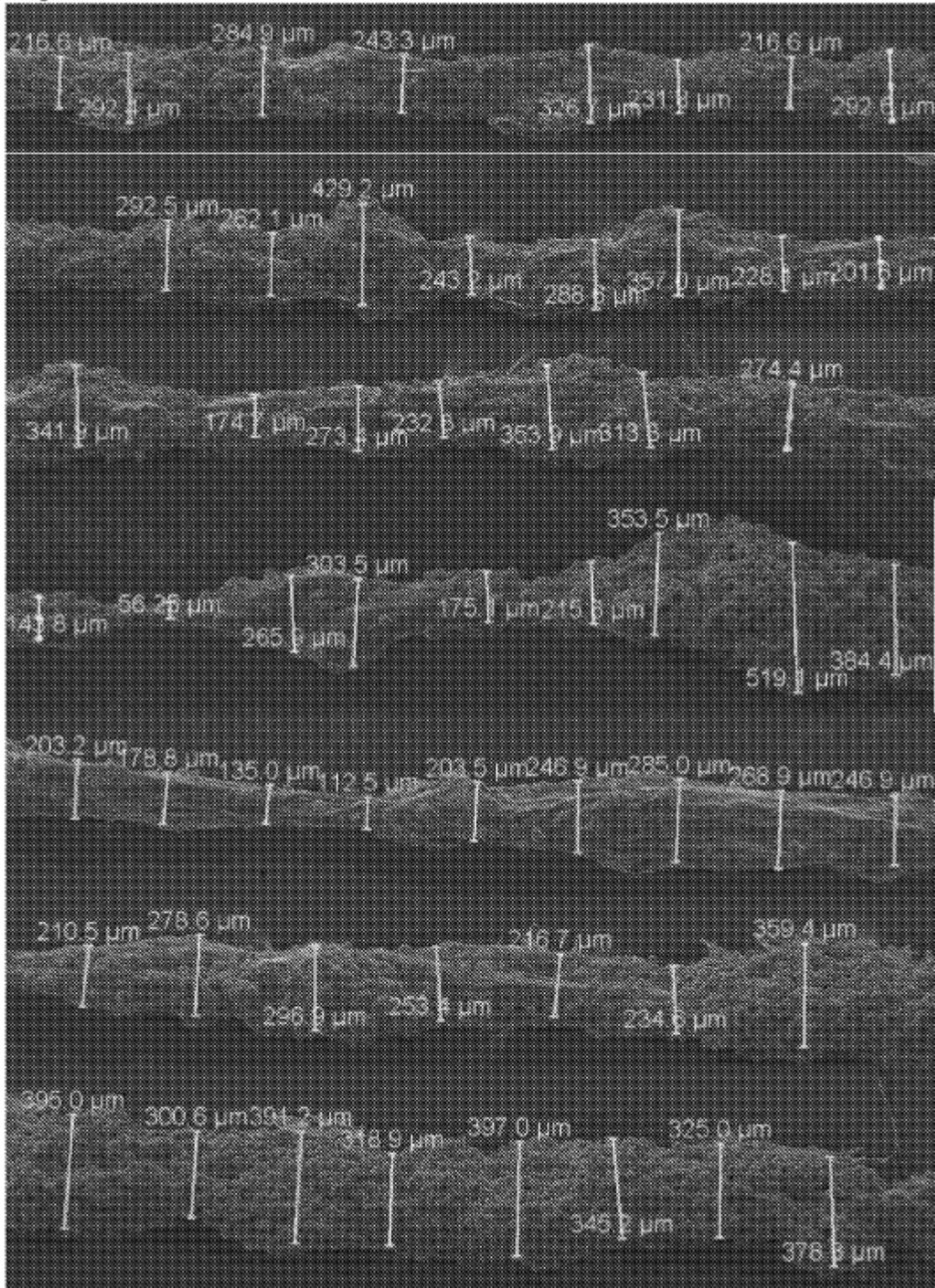


Fig. 3a

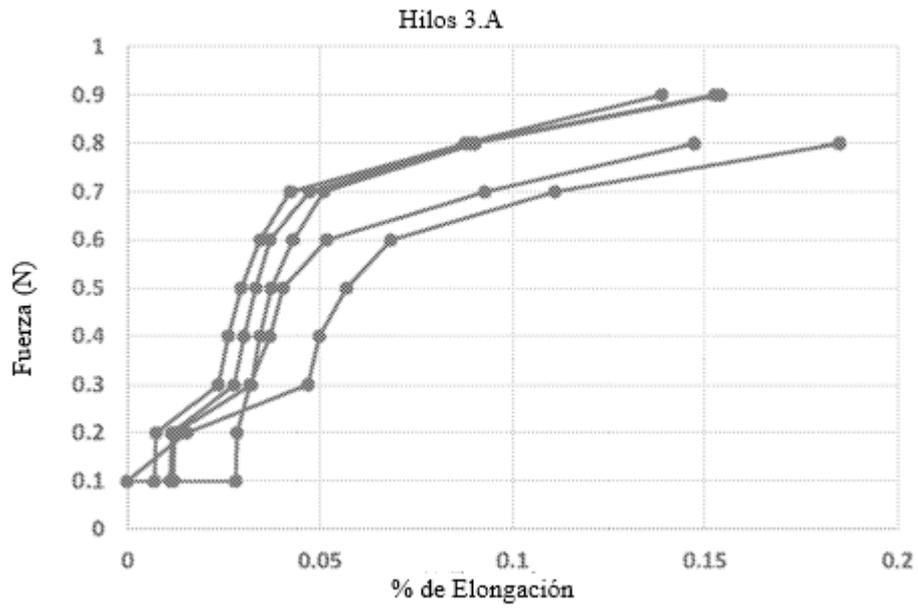


Fig. 3b

