(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 743 196**

(51) Int. CI.:

***A61L 27/20*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015 PCT/EP2015/000701**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15149941**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015 E 15722062 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3125961**

(54) Título: **Rellenos de tejidos blandos de polisacárido con persistencia mejorada**

(30) Prioridad:

**01.04.2014 EP 14001213**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**18.02.2020**

(73) Titular/es:

**MERZ PHARMA GMBH & CO. KGAA (100.0%)**
**Eckenheimer Landstrasse 100**
**60318 Frankfurt, DE**

(72) Inventor/es:

**LINKO, ALEXANDER;**
**KRAUSE, ANDREAS y**
**VILLAIN, FRANCK**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

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

Rellenos de tejidos blandos de polisacárido con persistencia mejorada

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a rellenos de tejidos blandos de polisacárido que comprenden heparosano, y a procesos para su preparación. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

**Antecedentes de la invención**

La sustitución o el relleno de un tejido biológico o el aumento del volumen del tejido pueden ser necesarios o deseables en muchas aplicaciones terapéuticas y cosméticas. Una forma de lograr esto es la introducción de productos viscoelásticos basados en materiales permanentes o biodegradables en el tejido biológico.

Con respecto a las aplicaciones terapéuticas, los productos viscoelásticos pueden usarse para aumentar el volumen de ciertos tejidos, por ejemplo del esfínter, la uretra o las cuerdas vocales. En el caso de aplicaciones cosméticas, las aplicaciones potenciales incluyen el relleno de arrugas, enmascaramiento de cicatrices o aumento del volumen de los labios. La inyección de productos viscoelásticos es un método simple no invasivo con menos riesgos que la cirugía estética.

El uso de productos viscoelásticos basados en materiales permanentes ofrece la ventaja de un largo tiempo de residencia en el tejido, pero tiene grandes inconvenientes. Por ejemplo, la inyección de silicona se asocia con efectos indeseables a largo plazo, caracterizados por la aparición de nódulos y úlceras en la piel. Además, la inyección de partículas en disolución o en una matriz de biopolímero conlleva el riesgo de reacciones inflamatorias indeseables, y la migración de fragmentos sintéticos puede incluso conducir a la aparición de granulomas.

Por lo tanto, los productos viscoelásticos basados en biopolímeros biodegradables reticulados en forma de geles se utilizan cada vez más en tratamientos terapéuticos y en el campo dermocosmético. Los polímeros biodegradables utilizados en estos geles son típicamente polímeros naturales que se pueden reabsorber con el tiempo en el tejido donde se han inyectado. La gran mayoría de los productos de geles comerciales, en particular los rellenos dérmicos, emplean ácido hialurónico reticulado (HA) como polímero biodegradable preferido. Se pueden usar diferentes agentes de reticulación, tales como DVS (divinilsulfona), DEO (diepoxioctano) y BDDE (1,4-butanodiol diglicidiléter).

Los geles biodegradables de biopolímeros se clasifican comúnmente en dos tipos diferentes, los geles "de una fase" (o "monofásicos") y los geles "de dos fases" (o "bifásicos"). Los geles bifásicos comprenden un material que consiste en uno o más biopolímeros reticulados (por ejemplo, hialuronato de sodio) dispersos dentro de una fase fluida o en una disolución basada en biopolímero no reticulado (véase, por ejemplo, el documento EP 0 466 300 B1). El material de biopolímero reticulado se degrada lentamente mediante degradación superficial, mientras que el biopolímero no reticulado (por ejemplo, hialuronato de sodio) se degrada muy rápidamente. Como resultado, cuando se desea un aumento del volumen de tejido, se necesitan numerosos tratamientos posteriores después de la primera inyección, lo que reduce la calidad de vida del usuario. Los ejemplos de geles biodegradables, bifásicos y comercialmente disponibles incluyen, entre otros, los rellenos dérmicos Hylaform®, Restylane® y Perlane®.

Los geles monofásicos también se basan en uno o más biopolímeros biodegradables reticulados (por ejemplo, hialuronato de sodio), pero comprenden solo una fase, lo que significa que es un gel sin partículas visibles. En vista de la naturaleza reticulada, estos geles sufren una lenta degradación superficial. Tales geles viscoelásticos monofásicos se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO 2008/068297 A1, US 8.450.475 B2, US 8.455.465 B2, US 7.741.476 B2 y US 8.052.990 B2. Los geles de HA monofásicos comerciales incluyen, entre otros, Juvéderm®, Teosyal®, Glytone® y los geles de HA monofásicos, doblemente reticulados (polidensificados) comercializados bajo las marcas Belotero®, Esthelis®, Fortélis® Extra y Modélis® Shape.

Se cree que una persistencia mejorada de los rellenos, es decir, un mayor tiempo de residencia en el cuerpo humano, es beneficiosa debido a la reducción esperada del número y la frecuencia de los tratamientos requeridos para obtener un resultado satisfactorio. La reticulación mejora significativamente la persistencia. Sin embargo, la inyección de un polímero altamente reticulado es más difícil, lo cual es una característica indeseable. Además, tras la inyección del gel, los sitios sin reticular del polímero se vuelven más propensos a ataques bioquímicos y enzimáticos, lo que promueve la degradación del gel.

Por lo tanto, se han realizado intentos adicionales para aumentar aún más la persistencia de los rellenos basados en biopolímeros. Por ejemplo, se propuso incorporar partículas hechas de HA reticulado o ácido (met)acrílico en una matriz de polímero de HA reticulada (véanse, por ejemplo, los documentos WO 00/01428 A1 y US 2010/0028435 A1). Sin embargo, este enfoque está asociado con el riesgo de reacciones inflamatorias indeseables e incluso granulomas. Además, el documento WO 2013/149161 A1 describe la producción de heparosano de alto peso molecular, un polímero similar al HA pero más resistente a la degradación, y propone su uso como composición de biomaterial para,

entre otros, el aumento de tejido.

**Objetivo de la invención**

En vista de lo anterior, el objetivo de la presente invención es proporcionar un relleno de tejidos blandos que tenga una larga persistencia, sea fácilmente inyectable y tenga una fuerte capacidad de crear un aumento del volumen de tejido.

**Sumario de la invención**

El objetivo anterior se resuelve mediante la provisión de composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos en forma de un gel reticulado, como se define en las reivindicaciones, y que comprende heparosano y ácido hialurónico (HA), o una de sus sales. Estos nuevos tipos de rellenos de tejidos blandos tienen un largo tiempo de residencia en el cuerpo humano (es decir, una larga persistencia), se pueden inyectar fácilmente a través de una aguja y tienen una excelente capacidad para crear volumen.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una primera composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende heparosano y ácido hialurónico (HA), o una de sus sales, reticulada con un agente de reticulación, preferiblemente 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE), para formar una matriz de HA-heparosano reticulada. Preferiblemente, esta primera composición en forma de gel se prepara reticulando una mezcla de heparosano, o una de sus sales, y HA, o una de sus sales, usando BDDE como agente de reticulación para formar una matriz de HA-heparosano reticulada compuesta de polímeros de heparosano y HA que están reticulados de manera intermolecular (es decir, entre moléculas de HA, moléculas de heparosano o moléculas de HA y heparosano) o intramolecular mediante BDDE.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una segunda composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende una mezcla de (i) un gel preformado de ácido hialurónico reticulado con BDDE (HA), o una de sus sales, y (ii) un gel preformado de heparosano reticulado con BDDE, o una de sus sales.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una tercera composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende una matriz de ácido hialurónico (HA)-heparosano doblemente reticulada preparada (a) reticulando con BDDE el heparosano, o una de sus sales, para formar un gel de heparosano reticulado, mezclando HA, o una de sus sales, con el gel de heparosano reticulado, y reticulando con BDDE el HA, o una de sus sales, y el gel de heparosano reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano doblemente reticulada, o (b) reticulando con BDDE el HA, o una de sus sales, para formar un gel de HA reticulado, mezclando heparosano, o una de sus sales, con el gel de HA reticulado, y reticulando con BDDE el heparosano, o una de sus sales, y el gel de HA reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano doblemente reticulada.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una cuarta composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende una matriz de ácido hialurónico (HA)-heparosano triplemente reticulada preparada reticulando con BDDE el heparosano, o una de sus sales, para formar un gel de heparosano reticulado, reticulando con BDDE el HA, o una de sus sales, para formar un gel de HA reticulado, mezclando el gel de heparosano reticulado con el gel de HA reticulado y reticulando con BDDE la mezcla del gel de heparosano reticulado y el gel de HA reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano triplemente reticulada.

En otro aspecto más, se proporciona un kit que comprende una jeringa que contiene un relleno inyectable de tejidos blandos de la presente invención.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona procesos para la preparación de las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos primera a cuarta de la presente invención. En particular, se proporcionan:

(i) un proceso para la preparación de la primera composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención, que comprende las etapas de:

  (a) proporcionar una mezcla acuosa que comprende ácido hialurónico (HA), heparosano y un agente de reticulación, preferiblemente 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE), y

  (b) reticular la mezcla de (a), preferiblemente usando BDDE como agente reticulador, para obtener una matriz de HA-heparosano reticulada, y

(ii) un proceso para la preparación de la segunda composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención, que comprende las etapas de:

  (i) proporcionar una mezcla acuosa que comprende ácido hialurónico (HA), o una de sus sales, y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

  (ii) reticular la mezcla de (i) usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de HA reticulado,

(iii) proporcionar una mezcla acuosa que comprende heparosano, o una de sus sales, y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(iv) reticular la mezcla de (iii) usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de heparosano reticulado, y

(v) mezclar el gel de HA reticulado de la etapa (ii) y el gel de heparosano reticulado de la etapa (iv); o

(iii) un proceso para la preparación de la tercera composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención, que comprende las etapas de:

(a') proporcionar una mezcla acuosa que comprende heparosano, o una de sus sales, y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(b') reticular la mezcla de (a') usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de heparosano reticulado,

(c') mezclar HA, o una de sus sales, y, opcionalmente, BDDE con el gel de heparosano reticulado, y

(d') reticular la mezcla de (c') usando BDDE como agente reticulador para obtener una matriz de HA-heparosano doblemente reticulada,

o que comprende las siguientes etapas:

(a") proporcionar una mezcla acuosa que comprende HA, o una de sus sales, y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(b") reticular la mezcla de (a") usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de HA reticulado,

(c") mezclar heparosano, o una de sus sales, y, opcionalmente, BDDE con el gel de HA reticulado, y

(d") reticular la mezcla de (c") usando BDDE como agente reticulador para obtener una matriz de HA-heparosano doblemente reticulada; o

(iv) un proceso para la preparación de la cuarta composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención, que comprende las etapas de:

(1) proporcionar una mezcla acuosa que comprende HA, o una de sus sales, y 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(2) reticular la mezcla de (1) usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de HA reticulado,

(3) proporcionar una mezcla acuosa que comprende heparosano, o una de sus sales, y 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(4) reticular la mezcla de (3) usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de heparosano reticulado,

(5) mezclar el gel de HA reticulado de (2) y el gel de heparosano reticulado de (4) y, opcionalmente, BDDE y

(6) reticular la mezcla de (5) usando BDDE como agente reticulador para obtener una matriz de HA-heparosano triplemente reticulada.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención, o del kit de la presente invención, para sustituir o rellenar un tejido biológico o aumentar el volumen de dicho tejido biológico. De manera particularmente ventajosa, las composiciones de relleno se usan en el campo dermocosmético para reducir arrugas o líneas de la piel.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

**Descripción detallada de la invención**

Los inventores de la presente invención han descubierto inesperadamente que la reticulación de un polisacárido, como el ácido hialurónico (HA), con heparosano da como resultado un gel que exhibe un tiempo de residencia prolongado en el cuerpo, mientras que al mismo tiempo exhibe propiedades favorables para su uso como un relleno de tejidos blandos, por ejemplo, en aplicaciones dermocosméticas.

Heparosano (HEP) es un biopolímero que pertenece a la familia de polisacáridos de glicosaminoglicanos (GAG). En humanos, es un producto intermedio en la biosíntesis de heparina y sulfato de heparina. La estructura del heparosano es muy similar a la del hialuronano (HA), ya que tiene los mismos componentes de monosacáridos que el hialuronano y difiere del HA solo en que el enlace glucosídico β-(1,3) entre el ácido glucurónico (GlcUA) y la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) en HA se reemplaza por un enlace glucosídico β-(1,4) en HEP, y porque el enlace glucosídico β-(1,4) entre la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y el ácido glucurónico (GlcUA) en HA se reemplaza por un enlace glucosídico α-(1,4) en HEP:

GlcUA-β-(1-4)-[GlcNAc-α-(1-4)-GlcUA-β-(1-4)]$_n$-GlcNAc HEP

GlcUA-β-(1-3)-[GlcNAc-β-(1-4)-GlcUA-β-(1-3)]$_n$-GlcNAc HA

Una característica clave del heparosano es su excelente biocompatibilidad. El heparano tiene una gran cantidad de cargas negativas y grupos hidroxilo y, por lo tanto, es altamente hidrófilo, lo que aumenta la compatibilidad con los tejidos. Además, debido al hecho de que los polímeros de heparosano, incluso después de la modificación, todavía comprenden tramos que se dan en los polímeros de sulfato de heparano y heparina naturales, el heparosano no es inmunogénico (por ejemplo, no induce anticuerpos). Además, debido a la similitud estructural entre el heparosano y el hialuronano, se pueden realizar las mismas modificaciones químicas, incluida la reticulación, como la conocida para el hialuronano en los grupos funcionales.

Además, no se producen enzimas hidrolíticas extracelulares en humanos que degraden específicamente el heparosano, lo que resulta en una persistencia prolongada en el cuerpo en comparación con el ácido hialurónico. Además, no se produce acumulación de productos de degradación potencialmente dañinos. El término "persistencia", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad del relleno de tejidos blandos de resistir la degradación *in vivo* durante un período prolongado de tiempo. Por lo tanto, el término persistencia se usa como sinónimo de "tiempo de residencia (en el cuerpo)" o "tiempo de vida".

El relleno inyectable de tejidos blandos de la presente invención proporciona una serie de ventajas sobre los rellenos conocidos, que incluyen una excelente biocompatibilidad, persistencia mejorada, baja fuerza de extrusión (facilidad de inyectabilidad), alta retención de humedad, ausencia de inmunogenicidad y absorción segura por parte del cuerpo, mientras se mantienen las propiedades mecánicas y reológicas deseables para el uso como relleno de tejidos blandos.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una primera composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende heparosano y ácido hialurónico (HA), o una de sus sales, reticulada con 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE), para formar una matriz de HA-heparosano reticulada.

El término "composición de relleno de tejidos blandos", como se usa en la presente memoria, pretende significar una composición que se usa o es adecuada para el uso como un relleno de tejidos blandos. Un "relleno de tejidos blandos", en el sentido de la presente invención, se refiere a un material diseñado para añadir volumen a áreas de deficiencia de tejidos blandos. El término "tejido blando" generalmente se refiere a tejidos que conectan, sostienen o rodean otras estructuras y órganos del cuerpo. En la presente invención, el tejido blando incluye, por ejemplo, músculos, tendones (bandas de fibra que conectan los músculos con los huesos), tejidos fibrosos, grasa, vasos sanguíneos, nervios y tejidos sinoviales (tejidos alrededor de las articulaciones). En el contexto de la presente invención, el relleno de tejidos blandos es preferiblemente un relleno dérmico. Las aplicaciones de rellenos de tejidos blandos incluyen, entre otras, las aplicaciones dermocosméticas, como añadir volumen a los labios, aumentar las mejillas, tratar las líneas o arrugas de la piel, o aplicaciones terapéuticas, como aumentar el volumen de otros tejidos que lo necesitan, como el esfínter, la uretra o las cuerdas vocales.

Según la presente invención, la composición inyectable de relleno de tejidos blandos es un gel. El término "gel", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a un material que tiene una fluidez a temperatura ambiente entre la de un líquido y un sólido. Además, el término "gel" pretende significar un material capaz de absorber agua (es decir, un "hidrogel"), típicamente en una cantidad de al menos un 90% en peso basado en el peso total del gel (sin el peso de partículas opcionalmente presentes (es decir, partículas de hidroxiapatita de calcio)). En la presente invención, la composición inyectable de relleno de tejidos blandos generalmente comprende un fluido portador fisiológicamente aceptable, preferiblemente un tampón isotónico apirógeno, más preferiblemente una solución salina fisiológica.

De acuerdo con la presente invención, los polisacáridos se usan para formar una "matriz". Como se usa en la presente memoria, el término "matriz" pretende significar una red de polisacáridos, ya sea reticulados o no reticulados, en forma de una disolución o gel. Como se usa en la presente memoria, el término "ácido hialurónico" o "HA" significa ácido hialurónico, hialuronato y cualquier sal de hialuronato tal como hialuronato de sodio. Del mismo modo, el término "heparosano", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier sal del mismo.

Además, la composición de relleno de tejidos blandos de la presente invención es "inyectable". Esto significa que la composición de relleno de tejidos blandos es adecuada para la inyección en la piel u otro tejido con el fin de llevar la composición de relleno de tejidos blandos al sitio objetivo deseado. Una composición "inyectable", en el sentido de la presente invención, se puede dispensar desde jeringas en condiciones normales a presión normal.

En general, los rellenos de tejidos blandos de la presente invención, a menos que se indique lo contrario, no se limitan

a un tipo particular de gel e incluyen geles inyectables monofásicos y bifásicos, geles inyectables que comprenden una matriz reticulada con partículas de biopolímero integradas o covalentemente co-reticuladas o con otras partículas dispersas en los mismos, geles polidensificados o doblemente reticulados (es decir, geles caracterizados por una variación del grado de reticulación dentro del gel), geles triplemente reticulados y geles no reticulados. El relleno de tejidos blandos de la presente invención puede ser un gel monofásico hecho análogamente al gel de HA descrito en el documento US 2010/0316683 A1.

Además, el relleno de tejidos blandos de la presente invención puede prepararse de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2013/185934 A1. La fabricación de geles polidensificados (es decir, geles doblemente reticulados) se describe, por ejemplo, en el documento EP 1 711 552 B1.

En el caso de geles reticulados, el relleno de tejidos blandos de la presente invención es preferiblemente un gel inyectable que tiene simultáneamente las características de ser monofásico, cohesivo y de larga duración. El término "cohesivo", como se usa en la presente memoria, significa una tendencia del gel a reagruparse y no extenderse o disgregarse. El carácter cohesivo del gel contribuye así a obtener una alta compatibilidad y una larga persistencia en el tejido blando.

La presente invención se refiere además a una segunda, tercera y cuarta composición de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que se describen a continuación. No hace falta decir que las explicaciones y definiciones proporcionadas anteriormente en relación con la primera composición inyectable de relleno de tejidos blandos (por ejemplo, las definiciones de los términos persistencia, composición de relleno de tejidos blandos, relleno de tejidos blandos, tejido blando, relleno, gel, hidrogel, matriz, ácido hialurónico, heparosano, inyectable, los tipos de gel, cohesivo, etc.) se aplican igualmente a la segunda, tercera, cuarta y quinta (explicada más adelante) composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención.

Según la presente invención, se proporciona además una segunda composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende una mezcla de (i) un gel preformado de ácido hialurónico (HA) reticulado con BDDE, o una de sus sales, y (ii) un gel preformado de heparosano reticulado con BDDE, o una de sus sales. Esta composición de gel se puede obtener preparando primero (i) y (ii), y luego mezclando físicamente (i) y (ii) en una proporción en peso deseada de acuerdo con técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Preferiblemente, la segunda composición inyectable de relleno de tejidos blandos se puede obtener mediante un proceso de la invención como se describe en la presente memoria. La proporción en peso de (i): (ii) es preferiblemente de 0,1:99,9 a 99,9:0,1, más preferiblemente de 1,0:99,0 a 99,9:1,0, particularmente preferida de 5:95 a 95:5, de 10:90 a 90:10 o de 20:80 a 80:20, y más preferiblemente de 30:70 a 70:30 o de 40:60 a 60:40.

Además, la presente invención se refiere a una tercera composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende una matriz de ácido hialurónico (HA)-heparosano doblemente reticulada preparada (a) reticulando con BDDE el heparosano o una de sus sales, para formar un gel de heparosano reticulado, mezclando HA, o una de sus sales, con el gel de heparosano reticulado, y reticulando con BDDE el HA, o una de sus sales, y el gel de heparosano reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano doblemente reticulada, o (b) reticulando con BDDE el HA, o una de sus sales, para formar un gel de HA reticulado, mezclando heparosano, o una de sus sales, con el gel de HA reticulado, y reticulando con BDDE el heparosano, o una de sus sales, y el gel de HA reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano doblemente reticulada.

Preferiblemente, la tercera composición inyectable de relleno de tejidos blandos se puede obtener mediante un proceso de la invención como se describe en la presente memoria. La segunda reticulación se puede llevar a cabo utilizando el BDDE que permanece en la primera mezcla de reacción de reticulación (por ejemplo, añadiendo el HA o heparosano usado para la segunda reticulación a la primera mezcla de reacción de reticulación que comprende el primer polímero reticulado (es decir, HA o heparosano)). Típicamente, la dilución de la mezcla de reacción que viene junto con la adición del segundo polímero (es decir, el HA o heparosano a reticular en la segunda etapa de reticulación) da como resultado un grado variable (por ejemplo, un grado inferior) de reticulación en el gel (reticulación heterogénea).

Alternativamente, se añade una cantidad suplementaria de BDDE después de la primera etapa de reticulación para efectuar la segunda reticulación. Típicamente, la cantidad añadida es (sustancialmente) menor que la cantidad añadida para la primera reticulación (o inicial). El gel doblemente reticulado de acuerdo con la presente invención se caracteriza ventajosamente por una inyectabilidad facilitada, una larga permanencia *in vivo* y excelentes propiedades viscoelásticas.

El término "polidensificado", como se usa en la presente memoria, se refiere a un gel que se caracteriza por una variación del grado de reticulación dentro del gel o, en otras palabras, un gel "polidensificado" tiene (al menos) dos niveles de densidad diferentes, con partes más densas (mayor grado de reticulación) y partes menos densas (menor grado de reticulación). En general, los geles doblemente reticulados o triplemente reticulados de la presente invención, por ejemplo, un gel doblemente reticulado preparado mediante una primera reacción de reticulación para reticular el/los primer(os) polisacárido(s), seguido de una segunda reacción de reticulación para reticular el/los segundo(s) polisacárido(s), son tales geles polidensificados. Además, los geles polidensificados de la presente invención son

típicamente monofásicos y exhiben una alta cohesividad. El proceso de doble reticulación (tecnología de reticulación dinámica) se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en el documento EP 1 711 552 B1.

Aún más, la presente invención se refiere a una cuarta composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende una matriz de ácido hialurónico (HA)-heparosano triplemente reticulada preparada reticulando con BDDE el heparosano, o una de sus sales, para formar un gel de heparosano reticulado, reticulando con BDDE el HA, o una de sus sales, para formar un gel de HA reticulado, mezclando el gel de heparosano reticulado con el gel de HA reticulado, y reticulando con BDDE la mezcla del gel de heparosano reticulado y el gel de HA reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano triplemente reticulada.

Como se explicó anteriormente con respecto al gel doblemente reticulado de la presente invención, el BDDE residual presente en la (primera y/o segunda) mezcla de reacción de reticulación se puede usar para efectuar otra (tercera) reacción de reticulación, o se puede añadir opcionalmente una cantidad suplementaria de BDDE. Los comentarios proporcionados

A continuación, se describen realizaciones particulares de las diferentes composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención. Las explicaciones, definiciones y características adicionales de estas composiciones descritas a continuación se aplican igualmente a la primera, segunda, tercera y cuarta composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención sin la necesidad de una mención explícita, a menos que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que todas las realizaciones descritas en el contexto de las composiciones o kits de la invención se aplican igualmente a los métodos de tratamiento, usos y viceversa. Por lo tanto, la mención de una realización particular en el contexto de una composición o un kit, método de tratamiento o uso describe esta realización para todos estos tipos de materias.

La proporción en peso de heparosano respecto de HA en la matriz reticulada de HA-heparosano del primer, tercer o cuarto relleno de tejidos blandos de la presente invención puede variar de 0,1:99,9 a 99,9 a 0,1 o de 1:99 a 99:1, preferiblemente de 50:50 a 1:99, más preferiblemente de 25:75 a 1:99, aún más preferiblemente de 10:90 a 1:99, particularmente preferiblemente de 5:95 a 1:99, y lo más preferiblemente de 3:97 a 1:99.

La matriz reticulada de HA-heparosano de las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención tiene preferiblemente un grado de modificación, expresado como la proporción de la suma de reticuladores de BDDE mono y doblemente ligados respecto de la suma de unidades de disacárido de HA y heparosano de 0,5% a 25%, más preferiblemente de 2,0% a 20%, incluso más preferiblemente de 3,0% a 15%, aún más preferiblemente de 4,0% a 12%, aún más preferiblemente de 5,0% a 10,0%, particularmente preferiblemente de 6,0% a 9,0%, y lo más preferiblemente de 7,0% a 8,0%.

El grado de modificación se puede determinar mediante RMN de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (Edsman et al., Gel Properties of Hyaluronic Acid Dermal Fillers, Dermatol. Surg. 2012, 38:1170-1179; Guarise et al., SEC determination of cross-link efficiency in hyaluronan fillers, Carbohydrate Polymers 2012, 88:428-434; Kenne et al., Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels - Definitions and analytical methods, Carbohydrate Polymers 2013, 91:410-418).

Brevemente, los geles dializados y esterilizados se degradan antes de realizar la medición de RMN. La degradación puede realizarse mediante condroitinasa AC (Edsman *et al.*, anteriormente mencionado; Kenne *et al.*, anteriormente mencionado), NaOH (Guarise *et al.*, anteriormente mencionado), adición de hialuronidasa (p. ej., 150 U de hialuronidasa ovina a 1 g de gel) o mediante incubación a 90 °C durante al menos 35 h. Las disoluciones obtenidas se liofilizan, se disuelven en $D_2O$ y se homogenizan bien.

La medición de RMN se puede realizar, por ejemplo, a 500 MHz, a un pulso de 20 grados con varias repeticiones a temperatura ambiente para recibir un espectro con la resolución adecuada. De acuerdo con la bibliografía, el grado de modificación (MoD) se evalúa calculando la proporción de las señales de *N*-acetilo de HA respecto de las señales de metileno de BDDE. Para el *N*-acetilo de HA, las señales críticas se ubican a aproximadamente 2,0 ppm, y a aproximadamente 1,6 ppm para BDDE cuando se solubilizan en $D_2O$. Para calcular el grado de modificación, se identificaron los valores integrales, y se debe tener en cuenta la proporción de protones de 3H de *N*-acetilo ($CH_3$) respecto de 4H de metileno ($CH_2CH_2$), de acuerdo con la bibliografía (Edsman *et al.*, anteriormente mencionado, y Kenne *et al.*, anteriormente mencionado).

El peso molecular de los polímeros de heparosano utilizados para la preparación de los rellenos de tejidos blandos de la presente invención puede variar de 0,5 x $10^5$ Da a 6,8 x $10^6$ Da, preferiblemente de 1,0 x $10^5$ Da a 5,0 x $10^6$ Da, y más preferiblemente de 1,0 x $10^5$ Da a 3,5 x $10^6$ Da. En otra realización preferida, el peso molecular del polímero de heparosano es de 0,5 x $10^5$ Da a 1,0 x $10^6$ Da o menos, más preferiblemente de 2,0 x $10^5$ Da a 8,0 x $10^5$ Da, y lo más preferiblemente de 3,0 x $10^5$ Da a 7,0 x $10^5$ Da.

El peso molecular de los polímeros de HA utilizados para la preparación de los rellenos de tejidos blandos de la presente invención no está particularmente limitado, pero típicamente está en el rango de 1,0 x $10^5$ Da a 5,0 x $10^6$ Da, preferiblemente en el rango de 3,0 x $10^5$ Da a 3,0 x $10^6$ Da, y más preferiblemente en el rango de 5,0 x $10^5$ Da a 2,5 x $10^6$ Da.

Se pueden aplicar varios métodos en la presente memoria para determinar el peso molecular de HA, como la viscosidad intrínseca (por ejemplo, según la Farmacopea China, segunda revisión, 2006), la electroforesis capilar (CE) (por ejemplo, según Kinoshita et al., Biomed. Chromatogr., 2002, 16: 141-45), cromatografía de permeación en gel de alto rendimiento (HPGPC) (p. ej., según Kim et al., Food Chem., 2008, 109: 63-770), y dispersión de luz láser con múltiples ángulos combinada con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-MALLS) (por ejemplo, de acuerdo con Hokputsa et al., Eur. Biophys. J. Biophys. Lett., 2003, 32: 450-456).

El grado de modificación y, en un grado mucho menor, el peso molecular del polisacárido, tienen un impacto en la estabilidad de la degradación y, por lo tanto, permiten ajustar la persistencia del relleno inyectable de tejidos blandos de la presente invención. Un peso molecular más alto de los polisacáridos usados, por ejemplo, de HA y/o heparosano, generalmente da como resultado un tiempo de residencia más prolongado del relleno de tejidos blandos en el cuerpo. Con respecto al grado de reticulación, se aplica lo siguiente: cuanto mayor es el grado de reticulación, mayor es el tiempo de residencia en el cuerpo.

En una realización preferida de la presente invención, el AH de las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención comprende un primer HA que tiene un primer peso molecular, y un segundo HA que tiene un segundo peso molecular que es diferente del primer peso molecular.

Preferiblemente, el HA comprende un primer HA que tiene un primer peso molecular en el rango de 0,5-1,0 x $10^5$ Da a menos de 1,0 x $10^6$ Da y un segundo HA que tiene un segundo peso molecular en el rango de 1,0 x $10^6$ Da a 5,0 x $10^6$ Da, más preferiblemente un primer HA que tiene un primer peso molecular en el rango de 1,0 x $10^5$ Da a 9,0 x $10^5$ Da y un segundo HA que tiene un segundo peso molecular en el rango de 1,1 x $10^6$ Da a 4,0 x $10^6$ Da, y lo más preferiblemente un primer HA que tiene un primer peso molecular en el rango de 2,0 x $10^5$ Da a 6,0 x $10^5$ Da y un segundo HA que tiene un segundo peso molecular en el rango de 1,3 x $10^6$ Da a 2,0 x $10^6$ Da.

La proporción en peso del primer HA respecto del segundo HA en las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención es preferiblemente de 50:50 a 99:1, más preferiblemente de 70:30 a 95:5, y lo más preferiblemente de 85:15 a 95:5.

En otra realización preferida, el heparosano de la composición de relleno inyectable de tejidos blandos de la presente invención comprende un primer heparosano y un segundo heparosano caracterizado por tener diferentes pesos moleculares.

Preferiblemente, el heparosano comprende un primer heparosano que tiene un primer peso molecular en el rango de 1,0 x $10^5$ Da a 9,0 x $10^5$ Da y un segundo heparosano que tiene un segundo peso molecular en el rango de 1,0 x $10^6$ a 3,0 x $10^6$ Da, más preferiblemente un primer heparosano que tiene un primer peso molecular en el rango de 1,0 x $10^5$ Da a 5,0 x $10^5$ Da y un segundo heparosano que tiene un segundo peso molecular en el rango de 1,5 x $10^6$ a 3,0 x $10^6$ Da.

La proporción en peso del primer heparosano respecto del segundo heparosano en las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención es preferiblemente de 50:50 a 99:1, más preferiblemente de 70:30 a aproximadamente 95:5, y lo más preferiblemente de 85:15 a 95:5.

En una realización preferida, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención comprenden además HA no reticulado y/o heparosano no reticulado. Los polímeros no reticulados se añaden al relleno como lubricante, y ayudan a que el producto final fluya y facilite la inyección.

El HA no reticulado tiene preferiblemente un peso molecular de 3,0 x $10^5$ Da a 3,0 x $10^6$ Da, más preferiblemente de 8,0 x $10^5$ Da a 2,5 x $10^6$ Da, y lo más preferiblemente de 1,0 x $10^6$ Da a 1,5 x $10^6$ Da. El heparosano no reticulado tiene preferiblemente un peso molecular de 1,0 x $10^5$ Da a 6,8 x $10^6$ Da, más preferiblemente de 5,0 x $10^5$ Da a 5,0 x $10^6$ Da, y lo más preferiblemente de 1,0 x $10^6$ Da a 3,5 x $10^6$ Da.

La cantidad total de dicho HA no reticulado y/o dicho heparosano no reticulado es preferiblemente del 0,001% en peso al 50% en peso o del 0,01% en peso al 40% en peso o del 0,1% en peso al 35% en peso o del 1% en peso al 30% en peso, más preferiblemente del 1% en peso al 20% en peso, y lo más preferiblemente del 5% en peso al 20% en peso, basado en el peso total de los polímeros de heparosano y HA reticulados y no reticulados presentes en las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos.

Preferiblemente, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención no contienen otro polímero no reticulado que el HA no reticulado. También preferiblemente, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención no contienen polímeros no reticulados. En este contexto, el término "polímero", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto polimérico natural o sintético con unidades estructurales repetitivas, que incluyen polisacáridos tales como HA y heparosano.

De acuerdo con la presente invención, la concentración total del heparosano reticulado y no reticulado y los polímeros de HA reticulados y no reticulados presentes en las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención es preferiblemente de 0,5 mg/ml a 40 mg/ml, de 1 mg/ml a 40 mg/ml, de 5 mg/ml a 35 mg/ml o de 10 mg/ml a 35 mg/ml, más preferiblemente de 15 mg/ml a 30 mg/ml, incluso más preferiblemente de 18 mg/ml a 28

mg/ml, y lo más preferiblemente de 20 mg/ml a 26 mg/ml. Además, en caso de que las composiciones de relleno contengan polímeros de heparosano no reticulados y/o de HA no reticulados, se prefiere que tanto la matriz de HA-heparosano reticulada como los polímeros de heparosano y/o HA no reticulados añadidos tengan una concentración dentro de los rangos indicados anteriormente.

La presente invención contempla además el uso de uno o más polisacáridos adicionales distintos de HA y heparosano, preferiblemente en una cantidad inferior al 10% en peso, basado en el peso total de todos los polisacáridos contenidos en las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención. De manera deseable, los polímeros son de origen natural. El uso de polímeros de origen natural permite una mejor biocompatibilidad, lo que da lugar a un menor riesgo de reacciones inflamatorias. Los ejemplos de polisacáridos adicionales adecuados incluyen, pero sin limitación, sulfato de condroitina, queratano, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparina, celulosa y sus derivados, quitosano, carragenano, xantano y alginato, o una de sus sales.

El/los polisacárido(s) adicional(es) además de HA y heparosano están preferiblemente todos co-reticulados con los polímeros de ácido hialurónico y heparosano de la matriz de HA-heparosano. Sin embargo, en realizaciones menos preferidas, los polisacáridos adicionales distintos de HA y heparosano pueden estar presentes parcial o totalmente en forma no reticulada.

En una realización preferida, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención no contienen polímeros no reticulados y reticulados distintos de HA y heparosano.

La presente invención contempla además que las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención pueden comprender partículas que típicamente tienen un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 1000 µm, en particular de aproximadamente 10 µm a 200 µm. Las partículas se integran preferiblemente en la matriz reticulada de HA-heparosano de las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención. Las partículas pueden ser partículas reticuladas, en particular partículas de HA reticuladas.

Preferiblemente, las partículas son partículas cerámicas. Un material cerámico particularmente adecuado para el uso en la presente invención es una apatita seleccionada de hidroxiapatita, fluorapatita y clorapatita, o una mezcla de las mismas. Preferiblemente, las partículas son partículas de hidroxiapatita de calcio. Las partículas cerámicas (por ejemplo, partículas de hidroxiapatita de calcio) están típicamente contenidas en el relleno de tejidos blandos inyectable en una cantidad de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 65% en peso o de aproximadamente 5% en peso a aproximadamente 60% en peso, en particular en una cantidad de aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 50% en peso, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 20% en peso a aproximadamente 40% en peso. El tamaño de las partículas cerámicas (por ejemplo, de partículas de hidroxiapatita de calcio) está preferiblemente en el rango de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 1000 µm, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 200 µm, y lo más preferiblemente en el rango de aproximadamente 25 µm a aproximadamente 50 µm. Además, las partículas cerámicas tienen preferiblemente un porcentaje en volumen de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 65%.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos descritas anteriormente de la presente invención que contienen partículas cerámicas, en particular partículas de hidroxiapatita de calcio, comprenden además glicerol y/o manitol y/o lidocaína.

La presente invención contempla además la inclusión de al menos una sustancia activa, por ejemplo uno o más agentes anestésicos, en las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos descritas en la presente memoria. El agente anestésico es típicamente un anestésico local como la lidocaína. Preferiblemente, la lidocaína está comprendida en el relleno de tejidos blandos de la presente invención en una concentración del 0,05% en peso al 5,0% en peso, más preferiblemente del 0,1% en peso al 2,0% en peso, incluso más preferiblemente del 0,1% en peso al 2,0% en peso, aún más preferiblemente del 0,1% en peso al 1,0% en peso, particularmente preferiblemente del 0,1% en peso al 0,5% en peso, y lo más preferiblemente del 0,2% en peso al 0,4% en peso, basado en el peso total de la composición inyectable de relleno de tejidos blandos.

Además, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención pueden comprender opcionalmente uno o más compuestos seleccionados de polioles, vitaminas, aminoácidos, metales, minerales. Además, el relleno de tejidos blandos de la presente invención también puede contener células madre y/o factores de crecimiento y/o aditivos comunes (por ejemplo, modificadores del pH y ajustadores de la osmolalidad).

Los polioles ejemplares para el uso en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, manitol, glicerol, propilenglicol, sorbitol, eritritol, xilitol, lactitol, maltitol y glucosa. Particularmente adecuados para su uso en la presente memoria son manitol y glicerol. La concentración total de poliol(es) está generalmente entre 0,01 mg/ml y 50,0 mg/ml, preferiblemente entre 0,5 mg/ml y 20,0 mg/ml, más preferiblemente entre 1,0 mg/ml y 5,0 mg/ml. Los polioles pueden usarse como agentes antioxidantes, que mejoran la capacidad del gel de resistir la degradación *in vivo*.

Las vitaminas adecuadas incluyen vitamina C, vitamina E y vitaminas del grupo B, es decir, una o más de las vitaminas $B_1$, $B_2$, $B_3$, $B_5$, $B_6$, $B_7$, $B_9$ y $B_{12}$. La concentración de vitamina C o de vitamina E es preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente

5,0 mg/ml, y la concentración total de las vitaminas del grupo B es preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5,0 mg/ml. Las vitaminas pueden estar presentes para estimular y mantener el metabolismo celular y, por lo tanto, para promover la producción de colágeno. Particularmente preferido para su uso en la presente invención es la vitamina C, vitamina E y vitamina $B_6$.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos tienen generalmente un módulo elástico G' a una frecuencia de cruce (f) de 1 Hz de 20 Pa a 1000 Pa, preferiblemente de 100 Pa a 500 Pa, más preferiblemente de 250 Pa a 500 Pa, para composiciones de relleno sin partículas (por ejemplo, partículas cerámicas como hidroxiapatita de calcio). En el caso de las composiciones de relleno que comprenden partículas (por ejemplo, partículas cerámicas como partículas de hidroxiapatita de calcio), el módulo elástico G' a una frecuencia de cruce (f) de 1 Hz puede estar en el rango de 400 Pa a 5000 Pa, preferiblemente en el rango de 500 Pa a 2000 Pa, más preferiblemente en el rango de 600 Pa a 1500 Pa.

La fuerza de inyección de las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención, medida a través de una aguja de 27G½ a una velocidad de 12,5 mm/min usando una jeringa estándar, generalmente está entre 10 N y 40 N, preferiblemente entre 10 N y 35 N, más preferiblemente entre 15 N y 30 N, y lo más preferiblemente entre 20 N y 25 N.

La osmolalidad es preferiblemente de 200 mOsmol/l a 400 mOsmol/l, más preferiblemente de 280 mOsmol/l a 330 mOsmol/l. Además, dado que las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención se destinan a la inserción en el cuerpo humano, el pH de la composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención está generalmente entre 6,5 y 7,5, preferiblemente entre 6,8 y 7,4.

Dentro del contexto de la presente invención, el heparosano también puede ser una mezcla de dos o más heparosanos que tienen diferentes pesos moleculares. Preferiblemente, el heparosano comprende un primer heparosano que tiene un primer peso molecular de 0,5 x $10^5$ Da a 9,0 x $10^5$ Da, más preferiblemente de 1,5 x $10^5$ Da a 5,0 x $10^5$ Da, y un segundo heparosano que tiene un segundo peso molecular de 1,0 x $10^6$ Da a 6,8 x $10^6$ Da, más preferiblemente de 1,5 x $10^6$ Da a 5,0 x $10^6$ Da.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un kit que comprende una jeringa que contiene un relleno de tejidos blandos inyectable de la presente invención.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de la primera composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención, que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una mezcla acuosa que comprende ácido hialurónico, heparosano y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(b) reticular la mezcla de (a) usando BDDE como agente reticulador, preferiblemente en condiciones alcalinas, para obtener una matriz de ácido hialurónico-heparosano.

La etapa (a) típicamente implica la hidratación de polímeros de ácido hialurónico y polímeros de heparosano puros y secos en una disolución alcalina. El ácido hialurónico al que se hace referencia en la etapa (a) es preferiblemente hialuronato de sodio (NaHA). Dicha disolución alcalina se puede preparar añadiendo una cantidad deseada de NaOH sólido a los polímeros de HA y heparosano secos, seguido de la adición de un disolvente acuoso adecuado, por ejemplo agua pura, para hidratar la mezcla de polímeros en condiciones alcalinas. En una variación de la etapa (a), el reticulador (es decir, BDDE) también puede estar presente durante la hidratación, es decir, presente en la disolución alcalina. La hidratación de los polímeros usualmente toma aproximadamente 1 hora a aproximadamente 3 horas, y preferiblemente se lleva a cabo con agitación.

En la etapa (b), la mezcla obtenida en la etapa (a) se reticula con BDDE. La reticulación se lleva a cabo generalmente en condiciones alcalinas, típicamente en una disolución acuosa alcalina. Las técnicas de reticulación adecuadas son muy conocidas para una persona experta, y no se explican con detalle en la presente invención. Por ejemplo, la reticulación puede iniciarse mediante la adición de una cantidad efectiva de agente de reticulación y puede llevarse a cabo a una temperatura de 20 °C a 60 °C (por ejemplo, 50 °C). Preferiblemente, la mezcla de reacción se homogeneiza mecánicamente antes y/o durante la reacción de reticulación. La reticulación con BDDE conduce a la formación de enlaces éter estables que favorecen la estabilidad del gel producido en condiciones *in vivo*.

La reacción de reticulación puede detenerse mediante neutralización usando un ácido y/o la eliminación del agente de reticulación durante la purificación. Esto último se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante diálisis, lo que permite eliminar el agente de reticulación y las cadenas cortas de polímero que no han reaccionado. La disolución acuosa utilizada para la diálisis es generalmente una disolución tamponada. La composición de esta disolución tampón se selecciona para que tenga las propiedades fisicoquímicas (pH, osmolaridad) y reológicas deseadas. Las disoluciones tampón adecuadas incluyen, pero sin limitación, tampones fosfato, solución salina isotónica y tampones de PBS. Después de la purificación, la composición de relleno generalmente se llena en jeringas, que luego se esterilizan mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante esterilización con vapor, autoclave y similares.

Además, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de la segunda, tercera y cuarta composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención como se describe anteriormente en la presente memoria (véase la sección Sumario) y en las reivindicaciones adjuntas. Las técnicas para preparar estas composiciones son muy conocidas por los expertos en la técnica de fabricación de rellenos de polisacáridos. Las condiciones de reacción descritas anteriormente también se aplican a la fabricación de la segunda, tercera, cuarta y quinta composiciones (véase más adelante). La reticulación generalmente se detiene mediante diálisis. Esto elimina el agente de reticulación, pequeñas cadenas de polímeros sin reaccionar, productos de reacción no deseados y otras impurezas. Generalmente, las composiciones de relleno de tejidos blandos de la presente invención son estériles. Con este fin, las (primera, segunda, tercera, cuarta y quinta) composiciones de relleno de tejidos blandos de la presente invención pueden rellenarse en jeringas y esterilizarse convenientemente en autoclave, por ejemplo, a 121-132 °C durante 2 a 30 min.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención, o del kit de la presente invención, para sustituir o rellenar un tejido biológico o aumentar el volumen de un tejido biológico en aplicaciones terapéuticas o cosméticas. En particular, la presente invención se refiere a un método para sustituir o rellenar un tejido biológico o aumentar el volumen de un tejido biológico, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la presente invención. La administración se da generalmente mediante inyección (por ejemplo, inyección subcutánea o intradérmica).

Preferiblemente, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención se administran solo con fines cosméticos (por ejemplo, para mejorar la apariencia visual, en particular de la cara). En una realización particularmente preferida, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos de la presente invención se usan como relleno dérmico que se inyecta por vía intradérmica o subcutánea, tal como mediante la técnica de punción en serie, en el sitio objetivo (por ejemplo, el tejido para el que se desea un incremento del volumen (aumento)).

En particular, las composiciones inyectables de relleno de tejidos blandos o el kit de la presente invención pueden usarse para aplicaciones terapéuticas, tales como para aumentar el volumen del esfínter, la uretra o las cuerdas vocales, o para aplicaciones en el campo (dermo)cosmético, como para aumentar o rellenar arrugas o líneas finas de la piel (p. ej., pliegues nasolabiales, arrugas de marioneta, pliegues de la barbilla, mandíbulas inferiores, comisura oral y similares), rellenar depresiones cutáneas, enmascaramiento de cicatrices, aumento del volumen de los labios, aumento de mejillas, correcciones de la nariz y/o mejora de la hidratación y textura de la piel.

La presente invención se ilustrará adicionalmente a continuación mediante los ejemplos.

**Ejemplos**

Los ejemplos proporcionados a continuación ilustran la preparación de rellenos inyectables de tejidos blandos de la presente invención que tienen buena persistencia en el cuerpo humano, excelente biocompatibilidad y propiedades mecánicas y reológicas deseables para su uso como relleno de tejidos blandos.

EJEMPLO 1

Preparación de un gel de HA de tipo monofásico (técnica anterior)

Se diluyen 3,43 g de ácido hialurónico ($\eta$ = 0,6 $m^3/kg$; Mw = 3,0 x $10^5$ Da) en 13 ml de agua para inyección para hidratar el ácido hialurónico antes de la reticulación. Después de hidratar durante 16 horas, la mezcla se homogeneiza hasta que se obtiene una disolución transparente.

La reacción de reticulación se inicia luego mediante la adición de 2,48 g de una disolución de NaOH 2 M, 5,74 g de agua para inyección y 390 mg de 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) a la mezcla de reacción, seguido de mezcla durante 1 hora a 50 °C y reticulación durante 3 horas a 50 °C. A continuación, el pH se ajusta a pH fisiológico con HCl 1 M, y el volumen se diluye con 53,52 ml usando un tampón PBS a pH 7,0.

El gel obtenido se dializa luego durante 48 horas (límite de separación: $M_W$ = 12-14 kDa) con 35 litros de tampón PBS a pH 7,0. El producto de gel resultante tiene una concentración total ajustada de ácido hialurónico de 25 mg/ml. El ajuste se realizó con tampón PBS a pH 7,0. Finalmente, el gel se esteriliza mediante esterilización con vapor a 127 °C durante 4 a 10 minutos. El gel resultante se denomina "gel A" a continuación.

EJEMPLO 2

Preparación de un gel de heparosano de tipo monofásico (técnica anterior)

Se diluyen 3,68 g de heparosano ($M_W$ = 2,0 x $10^5$ Da) en 12,77 ml de agua para inyección para hidratar el heparosano antes de la reticulación. Después de hidratar durante 16 horas, la mezcla se homogeneiza hasta que se obtiene una disolución transparente.

La reacción de reticulación se inicia luego mediante la adición de 2,48 g de una disolución de NaOH 2 M, 5,73 g de agua para inyección y 390 mg de 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) a la mezcla de reacción, seguido de mezcla

durante 1 hora a 50 °C y reticulación durante 3 horas a 50 °C. A continuación, el pH se ajusta a pH fisiológico con HCl 1 M, y el volumen se diluye con 53,39 ml usando un tampón PBS a pH 7,0.

El gel obtenido se dializa luego durante 48 horas (límite de separación: $M_W$ = 12-14 kDa) con 35 litros de tampón PBS a pH 7,0. El producto de gel resultante tiene una concentración total ajustada de heparosano de 25 mg/ml. El ajuste se realizó con tampón PBS a pH 7,0. Finalmente, el gel se esteriliza mediante esterilización con vapor a 127 °C durante 4 a 10 minutos. El gel resultante se denomina "gel B" a continuación.

EJEMPLO 3

Preparación de un relleno de tejidos blandos de heparosano/HA según la invención

Se diluyen 1,71 g de ácido hialurónico ($\eta$ = 0,6 $m^3/kg$, $M_W$ = 3,0 x $10^5$ Da) y 1,84 g de heparosano ($M_W$ = 2,5 x $10^5$ Da) en 12,88 ml de agua para inyección para hidratar el ácido hialurónico y el heparosano antes de la reticulación. Después de hidratar durante 16 horas, la mezcla se homogeneiza hasta que se obtiene una disolución transparente.

La reacción de reticulación se inicia luego mediante la adición de 2,48 g de una disolución de NaOH 2 M, 5,71 g de agua para inyección y 390 mg de 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) a la mezcla de reacción, seguido de mezcla durante 1 hora a 50 °C y reticulación durante 3 horas a 50 °C. A continuación, el pH se ajusta a pH fisiológico con HCl 1 M, y el volumen se diluye con 53,71 ml usando un tampón PBS a pH 7,0.

El gel obtenido se dializa luego durante 48 horas (límite de separación: $M_W$ = 12-14 kDa) con 35 litros de tampón PBS a pH 7,0. El producto de gel resultante tiene una concentración total ajustada de ácido hialurónico de 12,5 mg/ml y una concentración total de heparosano de 12,5 mg/ml, es decir, una concentración total de polímero de 25,0 mg/ml. El ajuste se realizó con tampón PBS a pH 7,0. Finalmente, el gel se esteriliza mediante esterilización con vapor a 127 °C durante 4 a 10 minutos. El gel resultante se denomina "gel C" a continuación.

EJEMPLO 4

Preparación de una mezcla física de un gel de HA reticulado y un gel de heparosano reticulado de acuerdo con la invención

Primero, se preparó un gel de HA reticulado de acuerdo con el Ejemplo 1 (gel A). Por separado, se preparó un gel de heparosano reticulado de acuerdo con el Ejemplo 2 (gel B).

A continuación, el gel A de HA reticulado preformado se mezcló con el gel B de heparosano reticulado preformado en una proporción en peso de 1:1 conectando una primera jeringa de 1 ml que contenía el gel A y una segunda jeringa de 1 ml que contenía el gel B a través de un adaptador Luer-Lock, seguido de mezcla manual 20 veces en ambas direcciones. Esta mezcla física de gel A y gel B se denomina "gel D" a continuación.

EJEMPLO 5

Comparación de los geles A-D preparados en los Ejemplos 1-4

En este ejemplo, los geles A-D, tal como se prepararon en los Ejemplos 1-4, se caracterizaron con respecto a su fuerza de extrusión, módulo elástico (G') y módulo viscoso (Tanδ), y su resistencia a la degradación enzimática por hialuronidasa.

Todas las mediciones reológicas se realizaron utilizando un reómetro Anton Paar MCR 302 equipado con un cono de 1°, 50 mm de diámetro. Las mediciones se realizaron a una frecuencia (f) de 0,1 a 10 Hz con un espacio constante de 0,1 mm. La fuerza de inyección se midió a través de una aguja de 30G½ a una velocidad de 12,5 mm/min utilizando una jeringa estándar.

En un primer experimento, los geles A a D se sometieron a degradación enzimática utilizando 100 U de hialuronidasa. El tratamiento con hialuronidasa no condujo a ninguna degradación del gel B (heparosano reticulado), como lo indica un módulo elástico constante (G') a lo largo del tiempo (resultados no mostrados). Sin embargo, se descubrió que el gel C (HEP + HA reticulado) es susceptible a la degradación enzimática.

Además, los geles A-D se sometieron a mediciones reológicas y de fuerza de extrusión. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los geles A-D (siendo las muestras A y B ejemplos comparativos)

| Característica | Gel A[1] | Gel B[2] | Gel C[3] | Gel D[4] |
|---|---|---|---|---|
| Fuerza de extrusión (N) | 62 | 31 | 15 | 20 |
| G' a 1 Hz (Pa) | 396 | 415 | 358 | 350 |
| Tanδ | 0,10 | 0,17 | 0,13 | 0,14 |

| |
|---|
| 1 = solo HA reticulado (cHA) |
| 2 = solo HEP reticulado (cHEP) |
| 3 = HEP + HA reticulados |
| 4 = mezcla 1:1 de gel A y gel B |

Como se puede ver en la Tabla 1, los geles C y D según la presente invención tienen valores de fuerza de extrusión bajos en el rango de 15 a 32 N. En comparación, el gel A, es decir, un gel de HA reticulado, tiene una extrusión significativamente mayor, de 62 N. Además, los geles C y D tienen valores de G' y Tanδ que están en el mismo rango que los observados para el gel A (cHA) y el gel B (cHEP). Por lo tanto, los ejemplos demuestran que los geles según la presente invención pueden extrudirse fácilmente a través de agujas finas, a la vez que tienen propiedades reológicas viscoelásticas deseables (G' y Tanδ).

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende heparosano y ácido hialurónico (HA), o una de sus sales, reticulada con 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) para formar una matriz reticulada de HA-heparosano.

2. Una composición inyectable de relleno de tejidos blandos en forma de gel, que comprende una mezcla de (i) un gel preformado de ácido hialurónico (HA), o una de sus sales, reticulado con BDDE y (ii) un gel preformado de heparosano, o una de sus sales, reticulado con BDDE.

3. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la reivindicación 1, que comprende una matriz de ácido hialurónico (HA)-heparosano doblemente reticulada preparada:

   (a) reticulando con BDDE el heparosano, o una de sus sales, para formar un gel de heparosano reticulado, mezclando HA, o una de sus sales, con el gel de heparosano reticulado, y reticulando con BDDE el HA, o una de sus sales, y el gel de heparosano reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano doblemente reticulada, o

   (b) reticulando con BDDE el AH, o una de sus sales, para formar un gel de HA reticulado, mezclando heparosano, o una de sus sales, con el gel de HA reticulado, y reticulando con BDDE el heparosano, o una de sus sales, y el gel de HA reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano doblemente reticulada.

4. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de la reivindicación 1, que comprende una matriz de ácido hialurónico (HA)-heparosano triplemente reticulada preparada reticulando con BDDE el heparosano, o una de sus sales, para formar un gel de heparosano reticulado, reticulando con BDDE el HA, o una de sus sales, para formar un gel de HA reticulado, mezclando el gel de heparosano reticulado con el gel de HA reticulado y reticulando con BDDE la mezcla del gel de heparosano reticulado y el gel de HA reticulado para obtener dicha matriz de HA-heparosano triplemente reticulada.

5. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proporción en peso de heparosano respecto de HA en dicha matriz reticulada de HA-heparosano es de 1:99 a 99:1, por ejemplo, de 50:50 a 99:1, y/o en donde la matriz reticulada de HA-heparosano tiene un grado de modificación, expresado como la proporción de la suma de los reticuladores de BDDE mono y doblemente unidos respecto de la suma de las unidades de disacárido de HA y heparosano, del 0,5% al 25%.

6. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el heparosano tiene un peso molecular de $0,5 \times 10^5$ Da a $6,8 \times 10^6$ Da, y/o el HA tiene un peso molecular de $1,0 \times 10^5$ Da a $5,0 \times 10^6$ Da, y/o en donde el HA comprende un primer HA que tiene un primer peso molecular en el rango de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ Da a menos de $1,0 \times 10^6$ Da y un segundo HA que tiene un segundo peso molecular en el rango de $1,0 \times 10^6$ Da a $5,0 \times 10^6$ Da, y/o el heparosano comprende un primer heparosano que tiene un primer peso molecular en el rango de $1,0 \times 10^5$ Da y $9,0 \times 10^5$ Da y un segundo heparosano que tiene un segundo peso molecular en el rango de $1,0 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^6$ Da.

7. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además HA no reticulado y/o heparosano no reticulado, en donde dicho HA no reticulado tiene, por ejemplo, un peso molecular de $3,0 \times 10^5$ Da a $3,0 \times 10^6$ Da, y/o en donde dicho heparosano no reticulado tiene, por ejemplo, un peso molecular de $1,0 \times 10^5$ Da a $6,8 \times 10^6$ Da, y/o en donde la cantidad total de dicho HA no reticulado y/o dicho heparosano no reticulado es del 1% en peso al 50% en peso, basado en el peso total de los polímeros de heparosano y HA reticulados y no reticulados presentes en la composición inyectable de relleno de tejidos blandos.

8. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la concentración total de polímeros de heparosano reticulado y no reticulado y de HA reticulado y no reticulado presentes en la composición inyectable de relleno de tejidos blandos es de 10 mg/ml a 35 mg/ml, y/o en donde la composición comprende además uno o más polisacáridos distintos de HA y heparosano, por ejemplo, en una cantidad inferior al 10% en peso, basado en el peso total de todos los polisacáridos de la composición inyectable de relleno de tejidos blandos, y dicho o dichos otros polisacáridos se seleccionan, por ejemplo, del grupo que consiste en sulfato de condroitina, queratano, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparina, celulosa y sus derivados, quitosano, carragenano, xantano y alginato, o una de sus sales.

9. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición de relleno inyectable de tejidos blandos no contiene otro polímero no reticulado que el HA no reticulado, o en donde la composición de relleno inyectable de tejidos blandos no contiene polímeros no reticulados, o en donde la composición de relleno inyectable de tejidos blandos no contiene ningún polímero no reticulado ni reticulado distinto de HA y heparosano.

10. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde

la composición comprende además partículas que tienen un tamaño de partícula promedio de 1 µm a 1000 µm, en donde las partículas son, por ejemplo, partículas cerámicas, en especial partículas de hidroxiapatita de calcio, y en donde las partículas cerámicas, por ejemplo, están contenidas en la composición inyectable de relleno de tejidos blandos en una cantidad del 5% en peso al 60% en peso, y/o en donde la composición comprende además al menos una sustancia activa, por ejemplo, un agente anestésico, particularmente lidocaína, más particularmente lidocaína en una cantidad del 0,05% en peso al 5,0 % en peso, basado en el peso total de la composición inyectable de relleno de tejidos blandos, y/o en donde la composición comprende además uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en polioles, vitaminas, aminoácidos, metales y minerales.

11. La composición inyectable de relleno de tejidos blandos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el módulo elástico G' a una frecuencia de cruce (f) de 1 Hz es de 20 Pa a 1000 Pa, para composiciones de relleno sin partículas, y de 400 Pa a 5000 Pa para composiciones de relleno con partículas, y/o en donde la fuerza de inyección, medida a través de una aguja de 27G½ a una velocidad de 12,5 mm/min usando una jeringa estándar, es de aproximadamente 10 N a 35 N, y/o en donde la osmolalidad está en el rango de 200 mOsmol/l a 400 mOsmol/l, y/o en donde el pH está entre 6,5 y 7,5.

12. Un kit que comprende una jeringa que contiene un relleno de tejidos blandos inyectable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Un proceso para la preparación de una composición inyectable de relleno de tejidos blandos según la reivindicación 1 o cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, con tal de que dependa de la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una mezcla acuosa que comprende ácido hialurónico (HA), heparosano y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE), y

(b) reticular la mezcla de (a) usando BDDE como agente reticulador para obtener una matriz de HA-heparosano reticulada; o

un proceso para la preparación de una composición inyectable de relleno de tejidos blandos según la reivindicación 2 o cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, con tal de que dependa de la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas:

(i) proporcionar una mezcla acuosa que comprende ácido hialurónico (HA), o una de sus sales, y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(ii) reticular la mezcla de (i) usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de HA reticulado,

(iii) proporcionar una mezcla acuosa que comprende heparosano, o una de sus sales, y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(iv) reticular la mezcla de (iii) usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de heparosano reticulado, y

(v) mezclar el gel de HA reticulado de la etapa (ii) y el gel de heparosano reticulado de la etapa (iv); o

un proceso para la preparación de una composición inyectable de relleno de tejidos blandos según la reivindicación 3 o cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, con tal de que dependa de la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:

(a') proporcionar una mezcla acuosa que comprende heparosano, o una de sus sales, y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(b') reticular la mezcla de (a') usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de heparosano reticulado,

(c') mezclar HA, o una de sus sales, y, opcionalmente, BDDE con el gel de heparosano reticulado, y

(d') reticular la mezcla de (c') usando BDDE como agente reticulador para obtener una matriz de HA-heparosano doblemente reticulada,

o que comprende las siguientes etapas:

(a'') proporcionar una mezcla acuosa que comprende HA, o una de sus sales, y 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(b'') reticular la mezcla de (a'') usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de HA reticulado,

(c'') mezclar heparosano, o una de sus sales, y, opcionalmente, BDDE con el gel de HA reticulado, y

(d'') reticular la mezcla de (c'') usando BDDE como agente de reticulación para obtener una matriz de HA-heparosano doblemente reticulada; o

un proceso para la preparación de una composición inyectable de relleno de tejidos blandos de acuerdo con la reivindicación 4 o cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, con tal de que dependa de la reivindicación 4, que comprende las siguientes etapas:

(1) proporcionar una mezcla acuosa que comprende HA, o una de sus sales, y 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(2) reticular la mezcla de (1) usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de HA reticulado,

(3) proporcionar una mezcla acuosa que comprende heparosano, o una de sus sales, y 1,4 butanodiol diglicidil éter (BDDE),

(4) reticular la mezcla de (3) usando BDDE como agente reticulador para obtener un gel de heparosano reticulado,

(5) mezclar el gel de HA reticulado de (2) y el gel de heparosano reticulado de (4) y, opcionalmente, BDDE y

(6) reticular la mezcla de (5) usando BDDE como agente reticulador para obtener una matriz de HA-heparosano triplemente reticulada.

14. Una composición inyectable de relleno de tejidos blandos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o del kit de acuerdo con la reivindicación 12, para el uso en la sustitución o el relleno de un tejido biológico o en el aumento del volumen de un tejido biológico.