

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 755**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/445</b>	(2006.01)	<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/728</b>	(2006.01)	<b>A61Q 90/00</b>	(2009.01)
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/02</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/16</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/18</b>	(2006.01)		
<b>A61K 8/42</b>	(2006.01)		
<b>A61K 8/49</b>	(2006.01)		
<b>A61K 8/60</b>	(2006.01)		
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2014 PCT/IB2014/063503**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15015407**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2014 E 14767131 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3027186**

54 Título: **Proceso de preparación de composiciones que comprenden ácido hialurónico y clorhidrato de mepivacaína**

30 Prioridad:  
**30.07.2013 US 201313954360**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2020**

73 Titular/es:  
**TEOXANE (100.0%)  
Les Charmilles Rue de Lyon 105  
1203 Geneva, CH**

72 Inventor/es:  
**BOURDON, FRANÇOIS y  
MEUNIER, STÉPHANE**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 743 755 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**

Proceso de preparación de composiciones que comprenden ácido hialurónico y clorhidrato de mepivacaína

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones estériles e inyectables que comprenden ácido hialurónico o una sal del mismo, y especialmente composiciones de relleno de tejidos blandos, en particular para el aumento y/o la reparación de tejidos blandos, incluido el tejido periodontal, y especialmente para el tratamiento de defectos e imperfecciones de materiales de queratina, tales como la piel. La invención se refiere a un procedimiento de preparación de dichas composiciones.

10 Descripción de la técnica relacionada

Se han realizado intentos de desarrollar composiciones útiles para corregir defectos de la piel tales como cicatrices y arrugas o para aumentar el tejido de un sujeto con el fin de mejorar el aspecto de la piel, en particular la piel facial. El procedimiento principal empleado para corregir dichos defectos implica inyectar una composición de relleno en la capa dérmica de la piel cercana a los mismos para lograr el efecto o el aumento de tejido deseado.

15 El ácido hialurónico es el componente principal de la matriz extracelular (MEC). Se encuentra, por lo tanto, en grandes cantidades principalmente en la piel. También es el componente fisiológico principal de la matriz del cartílago articular y es particularmente abundante en el líquido sinovial.

20 En consecuencia, el ácido hialurónico, en su forma ácida o salina, es un biomaterial utilizado ampliamente como material de relleno inyectable para aplicaciones de ingeniería de tejidos y especialmente para el aumento de tejido dérmico u otro tejido blando tal como el tejido gingival.

25 El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfatado lineal compuesto por unidades de repetición de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina (Tammi R., Agren UM., Tuhkanen AL., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry (2): 1. -81, 1994).

30 En la piel, el ácido hialurónico es sintetizado principalmente por fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos (Tammi R., citado anteriormente). Por medio de sus residuos que portan una carga negativa, el ácido hialurónico actúa como una bomba de agua para mantener la elasticidad de la piel.

35 Además, la MEC es una estructura dinámica con un papel estructural y regulador para los tejidos. La MEC está compuesta por colágeno y elastina y también por una sustancia fundamental, principalmente agua, minerales y proteoglicanos. Esta matriz confiere a la piel su turgencia y propiedades mecánicas de firmeza, elasticidad y tono.

40 Con respecto a la piel, debe indicarse que, con la edad, la cantidad de ácido hialurónico y su grado de polimerización disminuyen, lo que tiene como consecuencia una disminución de la cantidad de agua retenida en el tejido conectivo.

Paralelamente, los componentes de la MEC se degradan, principalmente por medio de enzimas de tipo endopeptidasa denominadas metaloproteinasas de matriz o MMP.

45 Finalmente, las disminuciones en las defensas celulares aumentan el daño y los trastornos inducidos por tensiones externas tales como el estrés oxidativo.

La piel experimenta entonces un proceso de envejecimiento que conduce a la aparición de defectos y manchas de sustancias queratinosas, en particular de la piel.

50 En el campo de los rellenos de arrugas, los geles que consisten principalmente en ácido hialurónico, el caso en que se presenta químicamente reticulado, se inyectan por vía intradérmica para llenar la depresión excavada por la arruga.

55 La reticulación puede aumentar la persistencia del producto dentro de la dermis. Dichos geles basados en ácido hialurónico, si es necesario reticulado, permiten una reducción de arrugas por medio del efecto mecánico del relleno resultante del vacío de la arruga de la piel.

60 No obstante, se sabe que la inyección de dichos geles a menudo produce una sensación dolorosa para el paciente, exacerbando aún más esta sensación que el gel sea muy viscoso y/o elástico.

Actualmente, para superar este problema técnico, los rellenos principales a base de ácido hialurónico están disponibles con un agente anestésico local para garantizar una mayor comodidad para el paciente. Este agente anestésico local es solo lidocaína, a una dosis de aproximadamente el 0,3%.

65

No obstante, se sabe que la lidocaína puede presentar la desventaja, con respecto a sus propiedades vasodilatadoras, de implicar una absorción demasiado rápida por parte del cuerpo del paciente y, a veces, una aparición exacerbada de hematomas que, por razones estéticas obvias, debe evitarse en la medida que sea posible. Una solución para superar los problemas mencionados anteriormente puede consistir en aplicar la lidocaína en asociación con un vasoconstrictor, en particular epinefrina (J. Endod., mayo de 2013; 39 (5): 597-9). Sin embargo, la presencia de un vasoconstrictor como la epinefrina puede requerir la adición de un conservante que no siempre es inerte con respecto al paciente y puede producir alergias.

Por lo tanto, sigue siendo necesario desarrollar geles que consistan principalmente en ácido hialurónico, el caso que se presenta químicamente reticulado, que superen los problemas técnicos mencionados anteriormente de sensación dolorosa para el paciente durante la inyección y que tampoco impliquen ningún problema de alergia ni la aparición exacerbada de hematomas.

#### Sumario de la invención

La invención se refiere a un procedimiento de preparación de una composición estéril e inyectable, más particularmente una composición de relleno de tejido blando, comprendiendo el procedimiento al menos las etapas siguientes:

- a) proporcionar al menos un gel de un ácido hialurónico o una sal del mismo, seleccionándose dicho ácido hialurónico de entre una forma reticulada de ácido hialurónico, una forma no reticulada de ácido hialurónico o una mezcla de las mismas;
- b) añadir a dicho gel de ácido hialurónico al menos clorhidrato de mepivacaína como agente anestésico; y
- c) esterilizar la mezcla obtenida en la etapa b).

El documento FR 2 979 539 describe una composición a base de ácido hialurónico estéril e inyectable para el tratamiento de defectos de la piel, pero que solo contiene clorhidrato de lidocaína como agente anestésico. El documento WO 2012/104419 divulga composiciones estériles e inyectables que comprenden gel de ácido hialurónico, un agente anestésico y ácido ascórbico. El clorhidrato de mepivacaína no se propone como agente anestésico local. El documento WO 2004/032943 se refiere a una composición que comprende ácido hialurónico no reticulado y al menos un agente anestésico para el tratamiento de enfermedades degenerativas y traumáticas de todas las articulaciones y también para el tratamiento de cambios en la piel y las membranas mucosas. El clorhidrato de mepivacaína no se propone como agente anestésico. El documento WO 2005/067994 se refiere más particularmente a la hidratación de partículas de ácido hialurónico con una solución acuosa que contiene un agente bioactivo que es diferente del clorhidrato de mepivacaína. El documento EP 2404619 sugiere combinar con un fármaco tal como, en particular, un agente anestésico, un componente de gel para mejorar su eficacia. Los agentes anestésicos locales enumerados en el documento anterior son todos diferentes del clorhidrato de mepivacaína. El documento WO 2013/186493 divulga composiciones útiles para el aumento de arrugas y que comprenden ácido hialurónico y al menos un octasulfato de sacarosa hidrosoluble ([00035]). El clorhidrato de mepivacaína no se describe ni se sugiere en el mismo.

El documento J. Oral Maxillofac Surg. 2008, 66, 286 y el documento WO 2013/092860 consideran el uso de clorhidrato de mepivacaína, pero no según el procedimiento reivindicado de la presente invención. Así, en el documento J. Oral Maxillofac Surg. 2008, 66, 286 solo se discute el efecto de la combinación de una inyección de hialuronidasa sobre la duración de la acción de la mepivacaína. En particular, el clorhidrato de mepivacaína se utiliza en combinación con epinefrina. No obstante, no divulga ningún procedimiento para la preparación de una composición inyectable y estéril que comprenda un gel de ácido hialurónico. Con respecto al documento WO 2013/092860, su ejemplo 1 divulga un procedimiento para preparar una solución acuosa inyectable producida a partir de una solución acuosa de ácido hialurónico y de una solución de escandicaína (clorhidrato de mepivacaína). Sin embargo, no especifica si el ácido hialurónico está hinchado y, por lo tanto, en forma de un gel cuando se mezcla con la escandicaína y no se produce ningún tipo de divulgación sobre una etapa de esterilización.

#### Descripción detallada de la invención

En primer lugar, a diferencia de la lidocaína, la mepivacaína no muestra propiedades vasodilatadoras significativas como la lidocaína.

Además, la mepivacaína tiene un pKa de 7,6 mientras que la lidocaína tiene un pKa de 7,9.

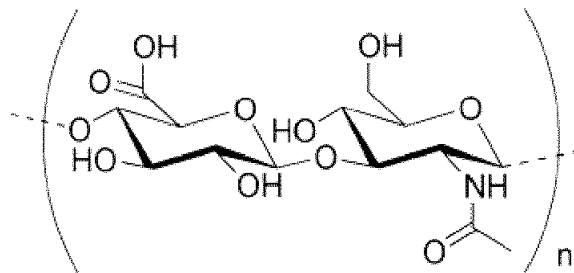
Por lo tanto, la mepivacaína, que tiene un pKa más bajo que la lidocaína, presenta una mejor solubilidad en lípidos, lo que mejora su difusión a través de las barreras lipídicas. Por lo tanto, debido al hecho de que la mepivacaína se puede absorber más rápidamente que la lidocaína, la mepivacaína es apropiada, por lo tanto, para prevenir mejor una sensación dolorosa durante la inyección.

Pero sobre todo, los inventores han observado inesperadamente que una composición de relleno obtenida según el procedimiento de la invención, es decir, que incluye clorhidrato de mepivacaína como agente anestésico, puede esterilizarse sin afectar significativamente a la estabilidad del gel de ácido hialurónico.

5 De hecho, se sabe que los geles de ácido hialurónico son particularmente sensibles al tratamiento térmico como el requerido para su esterilización y que esta baja estabilidad puede aumentarse mediante la presencia de otros materiales tales como el agente anestésico. Inesperadamente, este fenómeno no deseado se reduce significativamente con el clorhidrato de mepivacaína en comparación con la lidocaína, tal como se muestra en los ejemplos 1 y 2 siguientes. Además, los inventores han demostrado que una composición obtenida según el procedimiento de la invención también cumple con los requisitos en términos de estabilidad en el tiempo, tal como se muestra a continuación en el ejemplo 3.

Según los inventores, no se conocía la manifestación de estos efectos ventajosos mencionados anteriormente en composiciones de relleno de tejidos blandos que comprenden ácido hialurónico.

15 *Ácido hialurónico*



20 Como se ha mencionado anteriormente, el ácido hialurónico (también denominado hialuronano o hialuronato) es un glicosaminoglicano no sulfatado lineal compuesto por unidades de repetición de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina (Tammi R., Agren UM., Tuhkanen AL., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry 29 (2): 1.-81, 1994).

25 En la piel, el ácido hialurónico se sintetiza principalmente por fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos (Tammi R., citado anteriormente). Por medio de sus residuos que portan una carga negativa, el ácido hialurónico actúa como una bomba de agua para mantener la elasticidad de la piel.

30 Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención considera la aplicación de ácido hialurónico como tal, pero también de una sal del mismo.

Por lo tanto, el ácido hialurónico según la invención se puede elegir más particularmente entre sales fisiológicamente aceptables tales como la sal de sodio, la sal de potasio, la sal de zinc, la sal de plata y mezclas de las mismas, preferentemente la sal de sodio.

35 Preferentemente, el ácido hialurónico según la invención tiene un alto peso molecular promedio, que varía preferentemente de 50.000 a 10.000.000 daltons, preferentemente de 500.000 a 4.000.000 daltons.

Una sal particularmente preferida del ácido hialurónico es el hialuronato de sodio (NaHA).

40 Tal como se ha mencionado anteriormente, el ácido hialurónico se administra mediante inyección en una cantidad eficaz.

45 Una "cantidad eficaz" de ácido hialurónico es una cantidad apropiada para obtener el efecto técnico deseado, en particular para tener un resultado visible en el aspecto de la superficie de la piel. En particular, una cantidad eficaz de ácido hialurónico es una cantidad apropiada de ácido hialurónico para un buen relleno de defectos de volumen de la piel, y en particular el relleno de arrugas.

El ajuste de la cantidad de ácido hialurónico es competencia de un experto en la técnica.

50 Ventajosamente, el ácido hialurónico, o una sal del mismo, se encuentra presente en una solución en un procedimiento según la invención.

55 A este respecto, una cantidad eficaz de ácido hialurónico puede variar del 0,1 al 5% en peso, preferentemente del 1 al 3% en peso, con respecto al peso total de dicha solución que comprende el ácido hialurónico o una sal del mismo.

Según una forma de realización particular, el ácido hialurónico puede estar presente en una forma no reticulada.

Para los fines de la presente invención, las expresiones "no reticulado" o "sin reticular" se entienden en el contexto de la presente invención como un gel de ácido hialurónico que no está reticulado o que está ligeramente reticulado, es decir un gel que tiene un ángulo de desplazamiento de fase  $\delta$ , medido en condiciones de reología dinámica a 1 Hz, que es superior a  $40^\circ$  cuando se somete a una tensión superior a 1 Pa.

Según otra forma de realización particular, el ácido hialurónico puede estar presente en una forma reticulada.

Según otra forma de realización particular, el ácido hialurónico puede estar presente en forma reticulada y no reticulada.

A este respecto, la relación en peso "ácido hialurónico reticulado/ácido hialurónico no reticulado" es preferentemente superior a 1.

Cuando el ácido hialurónico está reticulado, dicho ácido hialurónico reticulado tiene preferentemente un grado de modificación que varía del 0,1 al 20%, preferentemente del 0,4 al 10%.

Por "grado de modificación" se entiende, en el contexto de la presente invención, la relación entre el número de moles de agente de reticulación unido al ácido hialurónico y el número de moles de ácido hialurónico que forman dicho gel de ácido hialurónico reticulado.

Este valor puede medirse mediante un análisis de RMN 1D 1H del gel reticulado.

Por "número de moles de ácido hialurónico" se entiende el número de moles de unidades de disacáridos de repetición del ácido hialurónico, estando compuesta una unidad de disacárido por ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina unidos entre sí mediante enlaces beta-1,4- y beta-1-3-glicosídicos alternos.

Este grado de modificación puede apreciarse en particular tal como se divulga en el presente documento más adelante.

Por lo tanto, la caracterización del grado de modificación del ácido hialurónico se lleva a cabo mediante espectroscopia por RMN (espectrómetro Bruker Avance 1 que opera a 400 MHz ( $^1\text{H}$ )).

Para BDDE, el grado de modificación se obtiene integrando la señal de RMN de  $^1\text{H}$  del grupo N-acetilo ( $\delta \approx 2$  ppm) presente en el ácido hialurónico y una señal presente en el agente de reticulación (dos grupos  $-\text{CH}_2-$ ,  $\delta \approx 1,6$  ppm). La relación de integrales de estas dos señales (agente de reticulación/NaHA) se relaciona con el grado de modificación, después de corregir el número de protones asociados a cada señal:

$$\text{Grado de modificación} = \frac{\left[ \frac{\text{Integral } \delta_{\text{H}1,6}}{4} \right]}{\left[ \frac{\text{Integral } \delta_{\text{H}2,0}}{3} \right]}$$

*Agente de reticulación*

Se entiende que la expresión "agente de reticulación" significa cualquier compuesto capaz de inducir una reticulación entre las diversas cadenas del ácido hialurónico.

La elección de este agente de reticulación se encuentra claramente dentro de la competencia de un experto en la técnica.

Un agente de reticulación según la invención se puede elegir entre agentes de reticulación epoxi-difuncionales o - multifuncionales, pero también poliaminas tales como, por ejemplo, hexametildiamina (HMDA) o poliaminas endógenas.

Por "poliamina endógena", dentro del contexto de la presente invención, se entiende una poliamina presente de forma natural en organismos vivos y particularmente en el cuerpo humano. Como representativas de las poliaminas endógenas, se pueden mencionar especialmente las citadas en animales eucariotas, tales como la putrescina (o 1,4-diaminobutano), la espermidina (o 1,8-diamino-5-azaoctano) y la espermina (1,12-diamino-5,9-diazadodecano), preferentemente la espermina.

Más particularmente, un agente de reticulación según la presente invención puede seleccionarse preferentemente del grupo que consiste en 1,4-butanodiol-diglicidil-éter (BDDE), 1,4-bis(2,3-epoxipropoxi)butano, 1,4-

bisglicidiloxibutano, 1,2-bis(2,3-epoxipropoxi)etileno y 1-(2,3-epoxipropil)-2,3-epoxiciclohexano, una poliamina endógena, y mezclas de los mismos.

Preferentemente, un agente de reticulación según la invención es el 1,4-butanodiol-diglicidil-éter (BDDE).

En la forma de realización particular en la que el agente de reticulación es una poliamina, y más particularmente una poliamina endógena, la reacción de acoplamiento con el ácido hialurónico puede llevarse a cabo en presencia de al menos un activador, y el caso se presenta asociado con al menos un acoplamiento auxiliar.

A este respecto, el activador puede seleccionarse de entre carbodiimidas hidrosolubles tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), clorhidrato de 1-etil-3-(3-25-trimetilaminopropil)carbodiimida (ETC), 1-ciclohexil-3-(2-morfilinoetil)carbodiimida (CMC) y una sal de la misma, y mezclas de las mismas, estando representado preferentemente por la EDC.

Con respecto al auxiliar de acoplamiento, cuando este está presente, puede seleccionarse de entre N-hidroxisuccinimida (NHS), N-hidroxibenzotriazol (HOBt), 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazol (HOObt), 1-hidroxi-7-7-azabenzotriazol (HAt) y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), y mezclas de los mismos, y preferentemente está representado por el HOBt.

El agente de reticulación se aplica en una cantidad eficaz.

Una "cantidad eficaz" de agente de reticulación es una cantidad apropiada para obtener un grado de reticulación apropiado del ácido hialurónico.

El ajuste de la cantidad de agente de reticulación es competencia de un experto en la técnica.

Ventajosamente, una cantidad eficaz de agente de reticulación puede variar entre el 0,05 y el 15% en peso con respecto al peso total del ácido hialurónico o una sal del mismo.

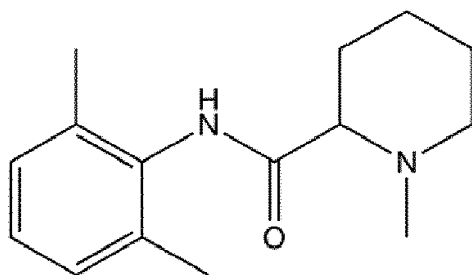
Ventajosamente, cuando el ácido hialurónico está reticulado, y cuando el agente de reticulación es BDDE, la relación en moles n de ácido hialurónico/n de BDDE puede variar entre 0,01 y 0,5, preferentemente entre 0,04 y 0,25.

#### Agente anestésico

El agente anestésico según la presente invención tiene la ventaja particular de reducir o eliminar la sensación de dolor experimentada por el paciente durante y/o después de la inyección.

Además, el agente anestésico según la presente invención se elige de entre compuestos que no aumentan el riesgo de incompatibilidad con otros compuestos utilizados en una composición obtenida según el procedimiento de la invención, especialmente con ácido hialurónico, y es al menos clorhidrato de mepivacaína.

La mepivacaína es un anestésico local de la familia de aminoácidos de fórmula (I):



(I)

La mepivacaína se comercializa especialmente con la denominación Carbocaína® por la empresa Cook-Waite.

La mepivacaína es una molécula que tiene una buena estabilidad. Su principal producto de degradación es 2,6-dimetilanilina. La mepivacaína es una molécula que contiene un centro quiral (carbono asimétrico). Por lo tanto, existen los enantiómeros R y S. En los siguientes ejemplos, se considera la mezcla racémica de las dos formas de mepivacaína.

Ventajosamente, el clorhidrato de mepivacaína está presente en una solución en un procedimiento según la invención.

A este respecto, una cantidad eficaz de clorhidrato de mepivacaína puede variar del 0,05 al 3% en peso con respecto al peso de la solución que comprende dicho clorhidrato de mepivacaína.

5 La composición obtenida según el procedimiento de la invención. La composición estéril e inyectable, en particular una composición de relleno blando obtenida según el procedimiento reivindicado, comprende una cantidad eficaz de al menos ácido hialurónico o una sal del mismo e incluye una cantidad eficaz de al menos clorhidrato de mepivacaína como agente anestésico.

10 Por "estéril", en el contexto de la presente invención, se entiende un entorno capaz de garantizar a los compuestos considerados en una composición obtenida según el procedimiento de la invención requisitos de seguridad para las vías de administración tales como los mencionados anteriormente, en particular en, o a través de, la piel. De hecho, por razones obvias, es esencial que una composición obtenida según el procedimiento de la invención esté desprovista de cualquier cuerpo contaminante capaz de iniciar una reacción secundaria no deseada en el organismo huésped.

15 El ácido hialurónico, el agente de reticulación y el o los agente(s) anestésico(s) son los mencionados anteriormente.

20 Con respecto al ácido hialurónico, una composición obtenida según el procedimiento de la invención puede comprender del 0,1 al 5% en peso, preferentemente del 1 al 3% en peso de ácido hialurónico, con respecto al peso total de dicha composición.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el ácido hialurónico puede estar presente en forma reticulada y no reticulada.

25 A este respecto, la relación "ácido hialurónico reticulado/ácido hialurónico no reticulado" es preferentemente superior a 1.

Más particularmente, la composición obtenida según el procedimiento de la invención puede comprender:

30 - del 50% al 99% en peso, de forma más preferida del 70% al 95% en peso de ácido hialurónico presente en forma de un gel reticulado,

35 - del 1% al 50% en peso, preferentemente del 5% al 30% en peso de ácido hialurónico presente en una forma no reticulada,

la relación entre el peso del gel de ácido hialurónico reticulado y el peso del ácido hialurónico no reticulado se encuentra entre 1:1 y 1:0,02.

40 Con respecto al o a los agente(s) anestésico(s), una composición obtenida según el procedimiento de la invención puede comprender del 0,01% al 5% en peso, preferentemente del 0,05% al 3% en peso de agente(s) anestésico(s), con respecto al peso total de dicha composición.

45 Por su carácter inyectable, una composición obtenida según el procedimiento de la invención comprende necesariamente un medio fisiológicamente aceptable.

Un "medio fisiológicamente aceptable" significa un medio desprovisto de toxicidad y compatible con la inyección y/o la aplicación de la composición tal como se considera en el presente documento.

50 La composición puede comprender un disolvente o una mezcla de disolventes fisiológicamente aceptables.

La composición puede comprender un medio acuoso fisiológicamente aceptable.

Como medio acuoso adecuado para la invención, se puede mencionar, por ejemplo, el agua.

55 Como agentes isotónicos adecuados para la preparación de una composición obtenida según el procedimiento de la invención, se pueden mencionar azúcares y cloruro de sodio.

Una composición obtenida según el procedimiento de la invención puede comprender además al menos una solución salina equilibrada.

60 La aplicación de esta solución salina equilibrada es particularmente interesante ya que permite reducir aún más el dolor de la inyección (véase Farley J.S. *et al.*, Regional Anesthesia A., 1994, vol. 19: 48).

65 Preferentemente, dicha solución salina equilibrada es una solución salina tamponada con fosfato, y más particularmente es una solución salina tamponada con fosfato y particularmente un tampón salino de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

- 5 Dicha solución salina equilibrada puede comprender adicionalmente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un ácido alfa-lipoico; N-acetil-L-cisteína; glutatión reducido; aminoácidos tales como L-arginina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina monohidratada, glicina, L-valina, L-treonina, L-prolina; clorhidrato de piridoxina; acetato de zinc deshidratado; sulfato de cobre pentahidratado, y mezclas de los mismos.
- 10 Una composición obtenida según el procedimiento de la invención puede comprender además al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un ácido alfa-lipoico; N-acetil-L-cisteína; glutatión reducido; aminoácidos tales como L-arginina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina monohidratada, glicina, L-valina, L-treonina, L-prolina; clorhidrato de piridoxina; acetato de zinc deshidratado; sulfato de cobre pentahidratado, y mezclas de los mismos.
- 15 Una composición obtenida según el procedimiento de la invención puede comprender, además de los compuestos mencionados anteriormente, al menos un compuesto adicional compatible con el uso en el campo de composiciones de relleno de tejidos blandos.
- 20 A este respecto, los compuestos adicionales que pueden utilizarse en una composición obtenida según el procedimiento de la invención pueden elegirse de entre sal de cobre, ácido alfa-lipoico, derivado acetilado de cisteína o una mezcla de los mismos.
- 25 Las cantidades de estos compuestos adicionales dependen de la naturaleza del compuesto en cuestión, el efecto deseado y el destino de la composición obtenida según el procedimiento de la invención.
- Estos parámetros pertenecen a las competencias generales de la técnica.
- 30 Una composición obtenida según el procedimiento de la invención, que comprende además al menos una sal de cobre, puede comprender preferentemente dicha sal de cobre en una cantidad que varía de 0,1 a 50 ppm con respecto al peso total de dicha composición.
- 35 Una composición obtenida según el procedimiento de la invención, que comprende además al menos un ácido alfa-lipoico, comprende preferentemente dicho ácido alfa-lipoico en una cantidad que varía de 0,5 a 10.000 ppm, preferentemente de 5 a 100 ppm de ácido alfa-lipoico, con respecto al peso total de dicha composición.
- Una composición obtenida según el procedimiento de la invención, que comprende además al menos un derivado acetilado de cisteína, comprende preferentemente dicho derivado acetilado de cisteína en una cantidad que varía de 0,5 a 10.000 ppm, con respecto al peso total de dicha composición.
- 40 Entre los otros compuestos adicionales que pueden utilizarse en la presente invención, se pueden mencionar antioxidantes, aminoácidos, vitaminas, minerales, ácidos nucleicos, coenzimas, derivados adrenales y mezclas de los mismos, siendo dichos compuestos adicionales distintos de los indicados anteriormente.
- 45 Como antioxidante, se pueden mencionar glutatión, ácido elágico, espermina, resveratrol, retinol, L-carnitina, polioles, polifenoles, flavonoles, teaflavinas, catequinas, cafeína, ubiquinol, ubiquinona y mezclas de los mismos.
- 50 Como aminoácido, se pueden mencionar arginina, isoleucina, leucina, lisina, glicina, valina, treonina, prolina, metionina, histidina, fenilalanina, triptófano y mezclas de los mismos.
- Como vitaminas y sus derivados, se pueden mencionar las vitaminas E, A, C, B, especialmente las vitaminas B6, B8, B4, B5, B9, B7, B12 y mejor piridoxina.
- 55 Como minerales, se pueden mencionar en particular sales de zinc, sales de magnesio, sales de calcio, sales de potasio, sales de manganeso, sales de sodio y mezclas de las mismas.
- Como ácidos nucleicos, se pueden mencionar en particular los derivados de adenosina, citidina, guanosina, timidina, la citodina y mezclas de los mismos.
- 60 Como coenzimas, se pueden citar la coenzima Q10, CoA, NAD, NADP y mezclas de las mismas. Como derivados de adrenalina, se puede mencionar adrenalina, noradrenalina.
- 65 Además, una composición obtenida según el procedimiento de la invención puede comprender adicionalmente cualquier excipiente que se utilice comúnmente en el campo técnico, tal como, por ejemplo, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de sodio monohidratado y/o dihidratado, en concentraciones fisiológicas.
- Las cantidades de agentes activos y/o excipientes adicionales, por supuesto, dependen de la naturaleza del compuesto en cuestión, el efecto deseado y el destino de la composición tal como se describe en el presente documento.



Una composición obtenida según el procedimiento de la invención puede poseer una viscosidad compleja  $\eta^*$  de entre aproximadamente 5 Pa\*s y aproximadamente 450 Pa\*s cuando se mide a aproximadamente 1 Hz.

- 5 Una composición obtenida según el procedimiento de la invención constituida por ácido hialurónico reticulado puede poseer una viscosidad de entre 200 y 2000 Pa.s, preferentemente de entre 1000 y 1800 Pa.s.

10 Las propiedades viscoelásticas de una composición obtenida según el procedimiento de la invención pueden medirse utilizando un reómetro (en particular Haake RS6000) con una geometría de cono/placa (ángulo de cono de 1°/placa de 35 mm de diámetro). Se realiza un barrido de tensión y se miden el módulo elástico  $G'$  (en Pa) y el ángulo de desplazamiento de fase  $\delta$  (en °) para una tensión de 5 Pa.

Procedimiento de preparación de una composición estéril e inyectable, según la invención

- 15 Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición estéril e inyectable, más particularmente una composición de relleno de tejidos blandos, comprendiendo el procedimiento al menos las etapas siguientes:

20 a) proporcionar al menos un gel de un ácido hialurónico o una sal del mismo, seleccionándose dicho ácido hialurónico de entre una forma reticulada de ácido hialurónico, una forma no reticulada de ácido hialurónico o una mezcla de las mismas;

b) añadir a dicho gel de ácido hialurónico al menos clorhidrato de mepivacaína como agente anestésico; y

25 c) esterilizar la mezcla obtenida en la etapa b).

Según una forma de realización preferida, el clorhidrato de mepivacaína se añade a una forma inyectable de ácido hialurónico.

- 30 En otras palabras, el gel de ácido hialurónico considerado en la etapa a) muestra ya una concentración de ácido hialurónico, de residuos de agentes de reticulación si están presentes, y condiciones fisiológicas y/o de pH que son compatibles con un uso inyectable, en particular en los campos de las aplicaciones consideradas anteriormente.

35 De esta forma, los riesgos que afectan a la estabilidad del ácido hialurónico en la mezcla de ácido hialurónico y clorhidrato de mepivacaína mediante la imposición de etapas de purificación adicionales, tales como los definidos anteriormente, se reducen significativamente.

40 La mezcla se somete ventajosamente a una única etapa de esterilización. Esta etapa se lleva a cabo preferentemente en la mezcla ya envasada en su dispositivo de administración, generalmente una jeringa, tal como se define posteriormente en el presente documento.

Ventajosamente, la etapa de esterilización puede realizarse por medios térmicos.

45 Ventajosamente, la esterilización se lleva a cabo a una temperatura que varía de 120 a 140 °C.

En particular, la etapa de esterilización se puede realizar en un autoclave (calor húmedo)  $T \text{ } ^\circ\text{C} \geq 121 \text{ } ^\circ\text{C}$ , para obtener un  $F_0 > 15$  (valor de esterilización).

50 A este respecto, y como se ha mencionado anteriormente, una composición obtenida según la invención es particularmente ventajosa porque muestra una resistencia alta muy interesante a esta etapa de esterilización.

55 De hecho, tal como se muestra en los ejemplos 1 y 2, la pérdida de  $G'$  generada por esterilización para una composición obtenida según el procedimiento de la invención es inferior que para una composición que comprende lidocaína en lugar de mepivacaína.

60 Según una forma de realización particular, el procedimiento de preparación de un gel de ácido hialurónico según la invención puede comprender además una etapa d) que consiste en añadir un agente anestésico adicional o una sal del mismo, diferente del clorhidrato de mepivacaína, llevándose a cabo dicha etapa d) antes, simultáneamente y/o después de la etapa b).

65 Este agente anestésico adicional puede seleccionarse en particular de entre ambucaína, amolanona, amilocaína, benoxinato, benzocaína, betoxicaína, bifenamina, bupivacaína, butacaína, butambeno, butanilicaína, butetamina, butoxicaína, carticaína, cloroprocaína, cocaetileno, cocaína, ciclometicaína, dibucaína, dimetisoquina, dimetocaína, diperodona, diclonina, ecgonidina, ecgonina, cloruro de etilo, etidocaína, beta-eucaína, euprocina fenalcomina, formocaína, hexilcaína, hidroxitetraína, p-aminobenzoato de isobutilo, mesilato de leucinocaína, levoadrol, lidocaína, meprilcaína, metabutoxicaína, cloruro de metilo, mirtecaína, naepaína, octacaína, ortocaína, oxetazaína,

paretoxicaina, fenacaina, fenol, piperocaina, piridocaina, polidocanol, pramoxina, prilocaína, procaína, propanocaina, proparacaina, propipocaina, propoxicaína, pseudococaina, pirrocaina, ropivacaina, alcohol salicílico, tetracaina, tolicaína, trimecaina, zolamina, o una sal de los mismos, y una mezcla de los mismos.

5 Cuando el gel considerado en la etapa a) comprende una forma reticulada de ácido hialurónico, este último se puede obtener de antemano a partir de una forma no reticulada de ácido hialurónico.

La reticulación se puede realizar de forma convencional con al menos un agente de reticulación, tal como se ha mencionado anteriormente.

10 La mezcla acuosa que comprende el agente de reticulación y el ácido hialurónico que se va a reticular se homogeneiza ventajosamente antes de realizar la reticulación.

15 El propósito de esta operación es, más particularmente, que el ácido hialurónico o una sal del mismo en el medio acuoso se hidrate y homogeneice perfectamente y, por lo tanto, ayude a optimizar las propiedades del gel de ácido hialurónico esperadas. Esta etapa de homogeneización es más importante cuando el ácido hialurónico tiene un peso molecular elevado, debido a que la hidratación de dicho compuesto tiende a dar como resultado la formación de una solución de alta viscosidad dentro de la cual se observa habitualmente la aparición de aglomerados.

20 El propósito de esta operación también es homogeneizar perfectamente el agente de reticulación dentro de la mezcla para asegurar posteriormente una reacción de reticulación homogénea.

25 La homogeneización se considera satisfactoria cuando la solución obtenida tiene un color uniforme, sin aglomerados, y posee una viscosidad uniforme. La homogeneización se puede llevar a cabo ventajosamente en condiciones de operación suaves para evitar la degradación de las cadenas de ácido hialurónico.

30 La duración de esta etapa de homogeneización depende de la naturaleza del ácido hialurónico o una sal del mismo, y más particularmente su peso molecular y su concentración, de las condiciones de operación dentro del medio acuoso y del dispositivo de homogeneización utilizado, generalmente un dispositivo que permita una agitación mecánica suave.

Preferentemente, una etapa de homogeneización puede tener lugar durante un periodo de tiempo inferior a 200 minutos, preferentemente inferior a 150 minutos, o incluso de entre 15 y 100 minutos.

35 El propósito de la reacción de reticulación es crear puentes entre las cadenas de ácido hialurónico que permitan obtener una red tridimensional sólida y densa a partir de una solución viscosa.

40 Las condiciones particulares que se van a adoptar para estimular la reacción de reticulación pueden depender del peso molecular del ácido hialurónico, del medio acuoso y de la naturaleza del agente de reticulación. En general, esta reticulación se puede lograr poniendo en contacto la mezcla que comprende el ácido hialurónico no reticulado y al menos un agente de reticulación tal como se ha mencionado anteriormente con un elemento activador, o estimulante, tal como, por ejemplo, mediante calentamiento o exposición a los rayos UV, o incluso poniendo dicha mezcla en contacto con un material de tipo catalítico.

45 La elección de un elemento activador de este tipo se encuentra dentro del conocimiento general de un experto en la técnica.

50 En el contexto de la presente invención, este elemento activador se representa ventajosamente por un aumento de la temperatura impuesta sobre la mezcla "ácido hialurónico no reticulado/medio acuoso/agente de reticulación".

Una temperatura particularmente adecuada para la reacción de reticulación es de entre 35 °C y 60 °C, preferentemente de entre 45 y 55 °C, y mejor aún de entre 48 y 52 °C.

55 El grado de reticulación también depende del tiempo de reticulación y de la temperatura impuesta a la mezcla "ácido hialurónico no reticulado/medio acuoso/agente de reticulación". Cuanto más prolongado sea el tiempo, mayor será el grado de reticulación, pero con un óptimo que no debe superarse sin correr el riesgo de degradar el ácido hialurónico.

60 Por lo tanto, a una temperatura que varía de 35 °C a 60 °C, la reacción de reticulación se puede llevar a cabo a lo largo de un periodo de tiempo que varía de 30 a 300 minutos, preferentemente de 100 a 200 minutos, y mejor aún de 150 a 190 minutos.

65 Preferentemente, las condiciones de reticulación se ajustan para obtener un grado de reticulación tal que el gel de ácido hialurónico reticulado formado sea un gel viscoso, viscoelástico, o incluso un gel sólido.

Detener la reacción de reticulación requiere exponer el gel reticulado o, durante la reticulación, incluso el recipiente que lo contiene, a condiciones propicias para detener la reticulación o también a condiciones capaces de detener la formación de enlaces entre las diversas cadenas de ácido hialurónico.

5 Por ejemplo, con respecto a las condiciones térmicas que se aplicarán para estimular el proceso de reticulación, la reticulación se puede detener:

- simplemente retirando el recipiente del baño termostatzado y enfriándolo hasta que vuelva a alcanzar la temperatura ambiente;

10 - disponiendo el recipiente en un baño de agua fría, preferentemente a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, hasta que la temperatura dentro de dicho recipiente se encuentre cerca de la temperatura ambiente; o incluso

15 - extrayendo el gel de dicho recipiente.

Según una forma de realización particular, la homogeneización y la reticulación pueden llevarse a cabo dentro de una cavidad hermética delimitada al menos parcialmente por una pared deformable, preferentemente fabricada dentro de una bolsa deformable, que puede deformarse al menos manualmente por palpación, tal como se describe, en particular, en el documento WO 2010/131175.

20 El gel obtenido al final de la etapa de reticulación no se puede inyectar, en general, directamente, en particular debido a su alta concentración de ácido hialurónico y/o la posible presencia de residuos de agente de reticulación o si no debido a sus condiciones fisiológicas y/o de pH incompatibles con su uso en los campos de aplicaciones considerados anteriormente.

Además, algunos geles pueden tener una rigidez demasiado elevada como para inyectarlos como tales en un paciente. Por lo tanto, se pueden llevar a cabo varias etapas adicionales, conocidas por los expertos en la técnica, para obtener un hidrogel inyectable. Más particularmente, se requiere una etapa de neutralización y de expansión de este gel con el fin de proporcionarle sus cualidades de implante. A continuación, las cadenas de la red de ácido hialurónico se estiran y se hidratan, mientras que el pH se lleva al de la dermis.

30 También se puede llevar a cabo una etapa de protección y de redensificación del gel para mejorar adicionalmente las cualidades del implante, según los conocimientos de un experto en la técnica. El gel debe estar formulado fisiológicamente en virtud de la presencia de sales en cantidades equivalentes a las del medio inyectado.

Para una pureza incluso mayor, también se puede llevar a cabo una etapa de purificación adicional.

40 Ventajosamente, al final de este protocolo de preparación de una forma inyectable de ácido hialurónico se añaden el clorhidrato de mepivacaína y, si surge el caso, agentes anestésicos adicionales, justo antes de la etapa de esterilización, tal como se ha definido anteriormente. .

45 Según una forma de realización particular, el hidrogel al que se ha añadido clorhidrato de mepivacaína y opcionalmente uno o más agentes anestésicos adicionales se puede utilizar para rellenar jeringas en condiciones de atmósfera controlada, sometiéndose posiblemente después dichas jeringas a una etapa de esterilización, preferentemente una etapa de esterilización térmica tal como se ha definido anteriormente.

Administración de la composición obtenida según el procedimiento de la invención

50 Una composición obtenida según el procedimiento de la invención puede inyectarse utilizando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica.

Particularmente, la composición se puede administrar por medio de un dispositivo de inyección adecuado para la administración intraepidérmica y/o intradérmica y/o subcutánea.

55 La composición también se puede administrar por medio de un dispositivo de inyección adecuado para las regiones gingival, articular y/o intraocular.

60 El dispositivo de inyección, en particular cuando la composición se administra por medio de un dispositivo de inyección adecuado para aplicaciones intraepidérmicas y/o intradérmicas y/o subcutáneas, puede seleccionarse de entre una jeringa, un conjunto de microjeringas, un dispositivo láser, un dispositivo hidráulico, una pistola de inyección, un dispositivo de inyección sin aguja, un dispositivo rodante con microagujas.

65 Preferentemente, el dispositivo de inyección puede seleccionarse de entre una jeringa o un conjunto de microjeringas.

Como alternativa, el dispositivo de inyección puede adaptarse a la técnica de mesoterapia.

La mesoterapia es una técnica de tratamiento mediante producto(s) activo(s) de uso intraepidérmico y/o intradérmico y/o subcutáneo.

5 La administración intraepidérmica y/o intradérmica y/o subcutánea consiste en inyectar la composición en una región epidérmica, dermo-epidérmica y/o dérmica.

10 El dispositivo de inyección puede comprender cualquier inyección que se utilice convencionalmente, tal como una aguja o cánula hipodérmica.

Una aguja o cánula puede tener un diámetro comprendido entre 18 y 34 G, preferentemente de 25 a 32 G, y una longitud que varía de 4 a 70 mm, preferentemente de 4 a 25 mm.

15 La aguja o cánula es preferentemente desechable.

Ventajosamente, la aguja o cánula está asociada con una jeringa u otro dispositivo capaz de suministrar a través de la aguja o cánula dicha composición inyectable. Se puede insertar un catéter entre la aguja/cánula y la jeringa.

20 De forma conocida, la jeringa puede operarse manualmente por el médico o por un soporte de jeringa tal como pistolas.

A lo largo de la descripción, incluidas las reivindicaciones, la expresión "que comprende un" debe entenderse como sinónimo de "que comprende al menos un", a menos que se indique lo contrario.

25 Debe entenderse que las expresiones "entre ... y ..." y "que varían de... a ..." significan que los límites son inclusivos, a menos que se especifique lo contrario.

30 Los ejemplos y las figuras siguientes se presentan a modo de ilustración no limitante de la invención.

#### **Ejemplos:**

Material y procedimiento:

35 El protocolo definido en el presente documento posteriormente con respecto a la medición de las propiedades viscoelásticas de una composición se aplica a los ejemplos siguientes.

40 Las propiedades viscoelásticas de una composición se miden utilizando un reómetro (Haake RS6000) con una geometría de cono/placa (ángulo de cono de 1°/placa de 35 mm de diámetro). Se realiza un barrido de tensión y se miden el módulo elástico  $G'$  (en Pa) y el ángulo de desplazamiento de fase  $\delta$  (en °) para una tensión de 5 Pa.

#### **Ejemplo 1: protocolo de preparación de una composición utilizando un ácido hialurónico no reticulado y análisis con respecto a su estabilidad a la esterilización**

45 Se mezclan 3 g de ácido hialurónico (1,5 MDa) y 197 g de un tampón de fosfato (tal como se define en el documento FR 2 979 539).

El protocolo de preparación es el siguiente:

50 1. homogeneización tridimensional de la mezcla "ácido hialurónico + tampón de fosfato" a temperatura ambiente en un recipiente hermético al aire (jarra de Nalgene) durante un mínimo de 20 horas;

2. separación del gel no reticulado obtenido en 2 fracciones equivalentes (denominadas en lo sucesivo en el presente documento fracciones A1 y A2);

55 3. con respecto a la fracción A1, adición al gel del 1% en peso de una solución de mepivacaína (30% en peso en medio de tampón de fosfato) y el 0,4% en peso de una solución de NaOH al 1%; o

60 4. con respecto a la fracción A2, adición al gel del 1% en peso de una solución de lidocaína (30% en peso en medio de tampón de fosfato) y el 0,4% en peso de una solución de NaOH al 1%; y

5. homogeneización, envasado en jeringas de 1 ml para inyección y autoclavado ( $F_0 > 15$ ).

65

Resultados:

Las tablas siguientes muestran los valores de los módulos elásticos G' (en Pa) de los hidrogeles obtenidos y de la fuerza de extrusión F(N).

5

<b>Fracción A1</b>		<b>Reología oscilatoria dinámica</b>		<b>F(N) a 12,5 mm/min</b>
		<b>F = 5 Hz</b>	<b>F = 1 Hz</b>	<b>Ser Schott 1 ml</b>
		<b>G' (Pa)</b>	<b>G' (Pa)</b>	<b>Aguja TSK HPC 30 G: 120347</b>
<b>Mepivacaína al 0,3%</b>	<b>No esterilizada</b>	103,3	36,3	9
	<b>Esterilizada</b>	45,0	9,6	9
	<b>Pérdida en la esterilización (en %)</b>	<b>56.4</b>	<b>73.5</b>	

La pérdida en la esterilización para G' a F = 5 Hz se calcula de la forma siguiente:

$$(103,3 - 45,0)/103,3 = 56,4 \text{ (en \%)}$$

10

<b>Fracción A2</b>		<b>Reología oscilatoria dinámica</b>		<b>F(N) a 12,5 mm/min</b>
		<b>F = 5 Hz</b>	<b>F = 1 Hz</b>	<b>Ser Schott 1 ml</b>
		<b>G' (Pa)</b>	<b>G' (Pa)</b>	<b>Aguja TSK HPC 30 G: 120347</b>
<b>Lidocaína al 0,3%</b>	<b>No esterilizada</b>	105,9	37,4	9
	<b>Esterilizada</b>	36,7	7,0	9
	<b>Pérdida en la esterilización (en %)</b>	<b>65.4</b>	<b>81.2</b>	

En vista de lo anterior, por lo tanto, parece que la estabilidad en la etapa de esterilización de una composición que comprende ácido hialurónico no reticulado es al menos equivalente con mepivacaína que con lidocaína.

15 Los resultados son incluso significativamente mejores con mepivacaína.

**Ejemplo 2: protocolo de preparación de una composición utilizando ácido hialurónico reticulado y no reticulado y análisis con respecto a su estabilidad a la esterilización**

20 Se utilizaron 8 g de ácido hialurónico (4 MDa), 58,7 g de hidróxido de sodio (NaOH) al 1% y 0,6 g de butanodiol-diglicidil-éter (BDDE). La reacción de reticulación se induce mediante una incubación durante 3 horas a 52 °C.

El protocolo de preparación es el siguiente:

- 25 1. Homogeneización de la mezcla "ácido hialurónico + NaOH al 1%" a temperatura ambiente en un recipiente hermético al aire y deformable (bolsa tal como se considera en la solicitud de patente WO 2010/131175) durante aproximadamente 1 h 30' para obtener una solución viscosa perfectamente homogénea;
- 30 2. Adición del agente de reticulación (BDDE) al recipiente y nueva homogeneización a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 min;
3. Incubación durante 3 horas a 52 °C del recipiente que contiene la solución viscosa de "ácido hialurónico/hidróxido de sodio al 1%/BDDE" para iniciar la etapa de reticulación;
- 35 4. Neutralización, hinchamiento y homogeneización del sólido obtenido (solución de ácido hialurónico reticulado) en un tampón de fosfato (tal como se define en el documento FR 2 979 539), y adición de un gel no reticulado que contiene 4 g de HA (ácido hialurónico) 4 MDa y 668 g de tampón de fosfato suplementado, para obtener un hidrogel que posee 11 mg/g de ácido hialurónico, a un pH aproximadamente neutro;
- 40 5. Purificación por diálisis durante 48 horas, y después recogida del gel purificado en un tanque de homogeneización;
6. Tamizado de la totalidad del gel (230 µm);

7. Separación del gel recogido en dos fracciones (Fracción B1 y B2);

8. Incorporación al gel del 1% en peso de una solución de mepivacaína (30% en peso en medio de tampón de fosfato) y del 0,4% en peso de una solución de NaOH al 1% (= Fracción B1);

9. Incorporación al gel del 1% en peso de una solución de lidocaína (30% en peso en medio de tampón de fosfato) y del 0,4% en peso de una solución de NaOH al 1% (= Fracción B2);

10. Homogeneización, envasado en jeringas de 1 ml para inyección y esterilización.

**Resultados:**

Las tablas siguientes proporcionan los valores del módulo elástico G' (en Pa) de los hidrogeles obtenidos y de la fuerza de extrusión F(N).

<b>Fracción B1</b>		<b>Reología oscilatoria dinámica</b>	
		<b>F = 1 Hz</b>	
		<b>G' (Pa)</b>	
		<b>F(N) a 12,5 mm/min</b>	
		<b>Ser Schott 1 ml</b>	
		<b>Aguja TSK HPC 30 G: 120347</b>	
<b>Mepivacaína al 0,3%</b>	<b>No esterilizada</b>	20,4	10
	<b>Esterilizada</b>	8,1	10
	<b>Pérdida en la esterilización (en %)</b>	<b>60,3</b>	

<b>Fracción B2</b>		<b>Reología oscilatoria dinámica</b>	
		<b>F = 1 Hz</b>	
		<b>G' (Pa)</b>	
		<b>F(N) a 12,5 mm/min</b>	
		<b>Ser Schott 1 ml</b>	
		<b>Aguja TSK HPC 30 G: 120347</b>	
<b>Lidocaína 0,3%</b>	<b>No esterilizada</b>	19,2	10
	<b>Esterilizada</b>	6,2	10
	<b>Pérdida en la esterilización (en %)</b>	<b>67,6</b>	

La pérdida en la esterilización se calcula tal como se muestra en el ejemplo 1.

En vista de lo anterior, por lo tanto, parece que la estabilidad en la etapa de esterilización de una composición que comprende ácido hialurónico reticulado y no reticulado es al menos equivalente con mepivacaína que con lidocaína.

Los resultados son aún mejores con mepivacaína.

**Ejemplo 3: protocolo de preparación de una composición utilizando ácido hialurónico reticulado y no reticulado y análisis con respecto a su estabilidad a lo largo del tiempo**

Se mezclan 10 g de ácido hialurónico (1,5 MDa), 73 g de hidróxido de sodio al 1% y 0,9 g de butanodiol-diglicidil-éter (BDDE). A continuación, se induce la reacción de reticulación mediante incubación durante 3 horas a 52 °C.

El procedimiento de preparación es el siguiente:

1. homogeneización de la mezcla "ácido hialurónico + hidróxido de sodio al 1%", a temperatura ambiente en un recipiente (bolsa) hermético al aire y deformable durante aproximadamente 1 h 30' para obtener una solución viscosa perfectamente homogénea;

2. adición del agente de reticulación (BDDE) al recipiente y homogeneización adicional a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos;

3. incubación durante 3 horas a 52 °C del recipiente que contiene la solución viscosa de ácido hialurónico/hidróxido de sodio al 1%/BDDE para iniciar la etapa de reticulación;

4. neutralización, hinchamiento y homogeneización del sólido obtenido (solución de ácido hialurónico reticulado) en un tampón de fosfato que contiene 2 g de ácido hialurónico no reticulado (1,5 MDa), para obtener un hidrogel a 25 mg/g de ácido hialurónico a un pH aproximadamente neutro;

5 5. purificación por diálisis (durante 48 horas) y después recogida del gel purificado en un recipiente de desgasificación/homogeneización;

6. incorporación en el gel del 1% en peso de una solución de mepivacaína (30% en peso en un medio de tampón de fosfato) y del 0,4% en peso de una solución de NaOH al 1%;

10

7. homogeneización, desgasificación, envasado en jeringas de 1 ml para inyección y esterilización ( $F_0 > 15$ ).

Resultados:

15 La tabla siguiente muestra los valores del ángulo de desplazamiento de fase  $\delta$  ( $^\circ$ ) y la fuerza de extrusión.

Análisis	Barrido de amplitud de reología (cono/placa)	Fuerza de extrusión, medida con aguja TSK 30G1 /2	pH
	Mediciones de $\delta$ ( $^\circ$ ) a 5 Pa y 1 Hz	F(N), a 12,5 mm/min	
T0	17,8 $\pm$ 2,0	24,2 $\pm$ 2,5	7,1
T0 + 19 meses	19,1 $\pm$ 2,0	23,1 $\pm$ 2,5	7,1

Los resultados obtenidos 19 meses después de la fecha de fabricación del gel son equivalentes a los obtenidos inicialmente y, por lo tanto, demuestran la estabilidad del gel.

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para preparar una composición estéril e inyectable, comprendiendo el procedimiento al menos las etapas siguientes:
- a) proporcionar al menos un gel de un ácido hialurónico o una sal del mismo, seleccionándose dicho ácido hialurónico de entre una forma reticulada de ácido hialurónico, una forma no reticulada de ácido hialurónico o una mezcla de las mismas;
  - 10 b) añadir a dicho gel de ácido hialurónico al menos clorhidrato de mepivacaína como agente anestésico; y
  - c) esterilizar la mezcla obtenida en la etapa b).
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa c) se lleva a cabo a una temperatura que varía de 120 a 140 °C.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio que varía de 50.000 a 10.000.000 daltons.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ácido hialurónico reticulado de la etapa a) se obtiene previamente a partir de la reticulación de un ácido hialurónico no reticulado con una cantidad eficaz de al menos un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en 1,4 butanodiol-diglicidil-éter (BDDE), 1,4-bis(2,3-epoxipropoxi)butano, 1,4-bis(glicidiloxi)butano, 1,2-bis(2,3-epoxipropoxi)etileno, 1-(2,3-epoxipropil)-2,3-epoxiciclohexano, pústrescina, espermidina, espermina y una mezcla de los mismos.