

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 252**

51 Int. Cl.:

A61L 27/54	(2006.01)
A61L 27/58	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01)
A61L 27/08	(2006.01)
A61L 27/20	(2006.01)
A61L 31/04	(2006.01)
A61L 24/08	(2006.01)
A61Q 19/08	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2012 PCT/EP2012/074059**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079646**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2012 E 12791802 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2849810**

54 Título: **Solución acuosa homogénea de quitosano inyectable**

30 Prioridad:

30.11.2011 FR 1160988

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2020

73 Titular/es:

BIOXIS PHARMACEUTICALS (20.0%)
317 Avenue Jean Jaurès
69007 Lyon, FR;
UNIVERSITÉ JEAN-MONNET (20.0%);
INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES
APPLIQUÉES DE LYON (20.0%);
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (20.0%)
y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%)

72 Inventor/es:

DUPASQUIER, FLORENCE;
DAVID, LAURENT y
DELAIR, THIERRY

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 746 252 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

Solución acuosa homogénea de quitosano inyectable

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere al campo técnico de los productos de relleno o de los biomateriales, inyectables en seres humanos o animales. En particular, la presente invención se refiere a una solución acuosa homogénea de quitosano inyectable capaz de formar partículas cristalinas de quitosano después de la inyección. La presente invención también se refiere a composiciones que contienen una solución acuosa homogénea de quitosano. La invención tiene también como objeto tales composiciones para su uso como composición dermatológica, cosmética o como dispositivo médico, ventajosamente como implante biorreabsorbible.

15 **Estado de la técnica**

Ya se conocen varios productos de relleno inyectables, especialmente en seres humanos.

El colágeno ha sido durante mucho tiempo el producto elegido como producto de relleno para la cara, en particular, para el relleno de arrugas y líneas de expresión o para volver a perfilar los labios. Sin embargo, desde la comercialización de los ácidos hialurónicos, estos son los más utilizados. En efecto, la biodegradabilidad del colágeno se considera demasiado rápida. Además, existen problemas de seguridad relacionados con el origen animal (bovino o porcino) del animal.

La inyección directa de ácido hialurónico tiene dos ventajas: un efecto de relleno mecánico inmediato y la ausencia de fenómenos inflamatorios, debido a su biocompatibilidad. No obstante, esta biocompatibilidad va de la mano con una rápida biodegradación que hace que el producto sea insatisfactorio, incluso si la vida del producto inyectado pudiera prolongarse usando ácido hialurónico reticulado.

Sin embargo, los productos más utilizados hoy en día en medicina y cirugía estética son productos reabsorbibles cuya vida útil generalmente es inferior a 12 meses.

Todavía encontramos en el mercado productos de relleno que pueden calificarse como "permanentes", en el sentido de que su biorreabsorción puede llevar varios años. Estos productos contienen, entre otros, polímeros sintéticos o biosintéticos, tales como derivados acrílicos, poli(acrilamidas), que inducen una importante encapsulación fibrosa en el origen de la longevidad del relleno. No obstante, la persistencia del producto inyectado en los tejidos presenta un riesgo de complicaciones a largo plazo o fenómenos inflamatorios retardados, por ejemplo, la formación de granulomas inflamatorios, quistes... varios meses, incluso varios años, después de su inyección.

Otros productos actuales constituyen una alternativa interesante: se trata del PLA (ácido poliláctico), un polímero cuya biodegradación es más lenta que la de otros polímeros naturales, como el colágeno o el ácido hialurónico. De hecho, se estima que el relleno persiste hasta dos años después de la inyección. Estos productos se comercializan en particular bajo el nombre de New-Fill (o Sculptra). El principal inconveniente de esta tecnología es que el efecto de relleno solo es visible después de ocho semanas, lo que no aporta una completa satisfacción al paciente.

Por otro lado, la fibrosis observada durante el uso de productos no degradables parecía de gran interés en términos de efecto estético a largo plazo, y así es como se desarrollaron los productos de relleno "semipermanentes" que, por su composición heterogénea de "partículas portadoras" tienen un efecto profibrótico sin dejar de ser biodegradables. Por ejemplo, el producto Atlean que propone una dispersión de partículas de TCP (fosfato tricálcico) en ácido hialurónico y el producto Radiesse que propone una dispersión de partículas de hidroxiapatita de calcio en un gel de carboximetilcelulosa. En todos los casos, el gel portador garantiza el efecto estético de relleno inmediato, mientras que las partículas generan gradualmente una fibrosis que garantiza el efecto a largo plazo. El interés de estos productos, además de este doble mecanismo de acción (mecánico e inductivo de tejido), es que finalmente son totalmente reabsorbidos.

De una manera particularmente ventajosa, el quitosano, debido a su estructura química única, se comporta frente al organismo como un "señuelo" del entorno biológico (A. Montebault, K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M. Corvol, A. Domard, Biochimie, 88 (2006), 551-64): por un lado, está suficientemente "reconocido" por no inducir una reacción inflamatoria peligrosa y, por otro lado, suficientemente "desconocido" por no degradarse demasiado rápido.

La molécula consiste en una sucesión de fragmentos de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, el primero es un componente de las moléculas de la matriz extracelular (este residuo se encuentra en el ácido hialurónico, por ejemplo), y el segundo carece completamente de esta, por lo tanto, el quitosano es más difícil de degradar desde un punto de vista biológico.

El concepto de usar un "señuelo" del entorno biológico es bastante nuevo en el campo de los inyectables, particularmente en medicina estética, y hasta la fecha no se comercializa ningún producto de relleno que contenga

quitosano.

Por otro lado, el quitosano es conocido en la bibliografía por estimular ciertas células de inmunidad, como los macrófagos, que producen en su presencia una mayor cantidad de factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento son mediadores biológicos que promueven la producción de matriz extracelular y la proliferación de fibroblastos, células que producen fibras de colágeno. De esta manera, el quitosano promueve la síntesis de tejido fibroso, lo que permite un relleno "biológico" a largo plazo y sin efectos secundarios indeseables, en particular, un relleno de los defectos cutáneos o de las cavidades del cuerpo humano o de la cara, como las arrugas.

10 **Objeto de la invención**

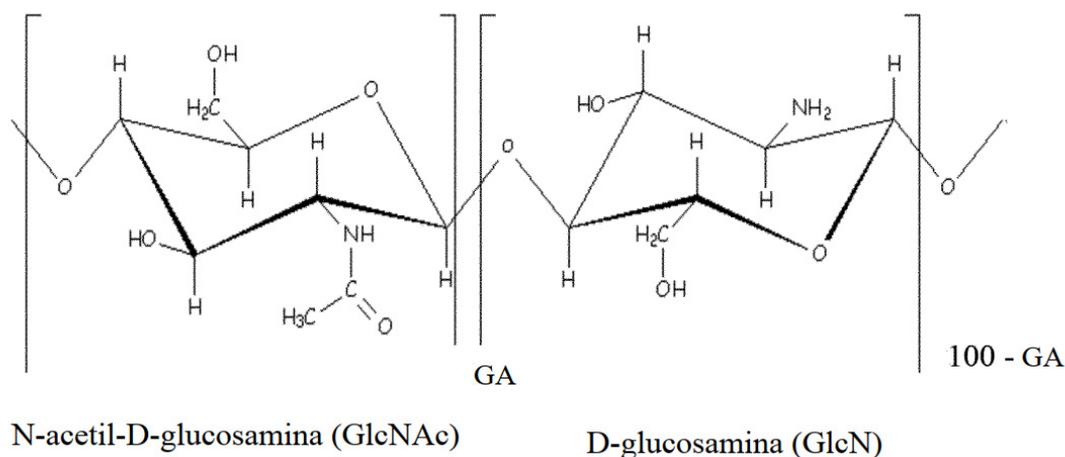
La presente invención tiene, por lo tanto, como objeto una solución acuosa homogénea de quitosano inyectable que contiene un quitosano que tiene un grado de acetilación inferior al 20 %, ventajosamente inferior al 10 % y un peso molecular promedio en peso comprendido entre 100.000 y 1.000.000 g/mol, dicha solución contiene entre el 0,1 y el 3,5 %, ventajosamente entre el 1 y el 2,5 %, en peso de quitosano, dicha solución tiene un pH inferior a 6,2, ventajosamente comprendido entre 5 y 6,2, dicha solución no contiene quitosano con un grado de acetilación superior al 20 %, dicha solución no contiene otro quitosano de peso molecular medio inferior y dicha solución acuosa puede formar partículas cristalinas de quitosano después de la inyección.

20 El quitosano es un aminopolisacárido generalmente obtenido por N-desacetilación de la quitina, polisacárido tan extendido en la biomasa como la celulosa. La quitina está particularmente presente en las cutículas de los artrópodos, el endoesqueleto de los cefalópodos, las paredes celulares o incluso la matriz extracelular de hongos, levaduras o algas.

25 Ventajosamente según la presente invención, el quitosano es un producto natural que proviene de una fuente animal, por ejemplo, de crustáceos del tipo de los cangrejos, gambas o calamares, o de una fuente vegetal, como los hongos o las algas.

30 El quitosano y la quitina son copolímeros lineales de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucano y de 2-amino-2-desoxi-D-glucano, respectivamente. Se habla más comúnmente de unidades N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y D-Glucosamina (GlcN), unidas por enlaces glucosídicos β-(1→4). La quitina y el quitosano se diferencian por la fracción molar (expresada en %) de las unidades de GlcNAc presentes en el copolímero, también llamada grado de acetilación (GA).

35 Las estructuras químicas del quitosano y la quitina se muestran esquemáticamente a continuación dependiendo del grado de acetilación (GA):



40 Grado de acetilación (GA):

$$GA(\%) = \frac{nGlcNAc}{nGlcNAc + nGlcN} \times 100$$

con nGlcNAc = número de unidades acetiladas y nGlcN = número de unidades desacetiladas.

45 Ventajosamente según la presente invención, el quitosano tiene un grado de acetilación (GA) inferior al 20 %, incluso más ventajosamente inferior o igual al 15 %, por ejemplo, inferior al 10 %. Normalmente, el quitosano según la invención tiene un grado de acetilación (GA) comprendido entre el 0,5 y el 20 %, normalmente entre el 1 y el 15 %,

por ejemplo, entre el 2 y el 10 %.

Normalmente, el quitosano tiene un peso molecular promedio en peso (determinado como se describe en "Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic médium" A. MONTEBAULT, C. VITON, A. DOMARD Biomaterials, 26(8), 933-943, 2005) comprendido entre 100.000 y 1.000.000 g/mol, ventajosamente entre 250.000 y 1.000.000 g/mol, por ejemplo, entre 250.000 y 500.000 g/mol, por ejemplo, entre 250.000 y 400.000 g/mol.

De una manera particularmente ventajosa, el pH de la solución acuosa según la presente invención es inferior a 6,2, y normalmente está comprendido entre 5 y 6,2. En el marco de la invención, el quitosano es soluble en solución acuosa, como el agua, en un ambiente ácido en los rangos de pH mencionados anteriormente, ventajosamente por protonación de los grupos amina del quitosano. Ventajosamente, la solución acuosa según la invención es estable.

Por solución "homogénea" de quitosano, para los fines de la presente invención, se entiende que se solubiliza todo el polímero quitosano, sin contener partículas sólidas en suspensión en la fase líquida. La solución según la invención, por lo tanto, no está gelificada. La solución según la invención es, por lo tanto, normalmente transparente.

Según una característica particular de la presente invención, la solución acuosa homogénea de quitosano contiene entre el 0,1 y el 3,5 %, ventajosamente entre el 0,5 y el 3,5 %, en particular, entre el 1 y el 2,5 %, en peso de quitosano, con respecto al peso total de la solución acuosa.

De una manera particularmente ventajosa, la solución acuosa según la invención es inyectable en el cuerpo humano o animal, normalmente por vía intradérmica o subcutánea. La solución se puede envasar en una jeringa, como una jeringa estéril.

Ventajosamente, la solución acuosa tiene una viscosidad adecuada para garantizar una buena capacidad de inyección (flujo satisfactorio a través de una aguja en una jeringa) y facilidad de inyección.

En una realización particular, la solución acuosa según la invención se esteriliza antes de la inyección, por ejemplo, en autoclave.

Después de la esterilización, el quitosano normalmente tiene un peso molecular promedio en peso comprendido entre 120.000 y 400.000 g/mol, y preferiblemente entre 120.000 y 300.000 g/mol.

De una manera particularmente ventajosa, la solución acuosa según la presente invención antes de la inyección no contiene quitosano que tenga un grado de acetilación superior al 20 %. De esta manera, el quitosano según la invención no se mezcla con un quitosano que tenga un grado de acetilación comprendido entre el 30 y el 60 %, como se describe en las solicitudes de patente WO 2008/072230 y WO 2009/150651.

En una realización particular según la presente invención, la solución acuosa contiene varios quitosanos, pero con un solo grado de acetilación (GA), dicho grado de acetilación es inferior al 20 %, ventajosamente inferior al 10 %.

En otra realización particular de la presente invención, la solución acuosa contiene como polímero un solo quitosano que tiene un grado de acetilación como se definió anteriormente, preferiblemente que tiene un peso molecular promedio como se definió anteriormente, ventajosamente con un contenido comprendido entre el 0,1 y el 3,5 %, ventajosamente entre el 0,5 y el 3,5 %, en particular, entre el 1 y el 2,5 %, en peso de quitosano, con respecto al peso total de la solución acuosa.

En una realización particular, la solución acuosa según la invención puede estar parcialmente reticulada por interacciones iónicas inducidas, por ejemplo, por la adición de sulfato, citrato, aniones metálicos o incluso moléculas aniónicas, en particular, por la formación de complejos de polielectrolitos con polisacáridos que tienen un grupo carboxílico COO⁻ (alginatos, pectina, xantana, ácido hialurónico), con polisacáridos que tienen un grupo sulfato, o con ácido poliláctico (PLA), o por interacción con proteínas (colágeno), ácidos nucleicos (ADN, ARN, los Si ARN, los ARNm...) o polisacáridos oxidados.

En otra realización particular, la solución acuosa según la invención está parcialmente reticulada con agentes de reticulación covalentes (por ejemplo, genipina), excluyendo agentes conocidos por su toxicidad, tales como agentes del grupo epoxi o ésteres bi o polifuncionales, divinilsulfona, carbodiimidias y dialdehídos.

Ventajosamente, el agente de reticulación, ya sea de tipo iónico o covalente, se introduce de modo que el grado de reticulación sea suficientemente bajo para no alterar la capacidad de la solución acuosa de formar partículas cristalinas de quitosano después de la inyección.

En una realización particular, la solución acuosa según la invención está compuesta de la combinación de una solución acuosa de quitosano no reticulada con una solución acuosa de quitosano reticulada.

Según una característica particular, la solución acuosa según la invención puede prepararse mediante las siguientes

etapas:

- disolver el quitosano en agua agregando ácido orgánico como un ácido débil, dicho ácido débil se selecciona ventajosamente del grupo que consiste en ácido acético, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glutámico y sus mezclas,
- y opcionalmente reajustar el pH para obtener una solución acuosa que tenga un pH comprendido entre 5 y 6,2, normalmente entre 5 y 5,5.

Antes de la disolución, el quitosano está normalmente en forma de polvo. Después de la disolución, el quitosano está en forma protonada. Es un polielectrolito catiónico cuyo contraión se deriva del ácido utilizado para la disolución. Por ejemplo, si se agrega ácido acético al agua para disolver el quitosano, encontramos el quitosano en forma de acetato de quitosano, es decir, una forma protonada NH_3^+ de las funciones amina en interacción electrostática con los iones acetato.

El control del pH de las soluciones es muy importante para prevenir la necrosis ácida de los tejidos después de la inyección y también para proteger las soluciones de la hidrólisis y la degradación del quitosano si se lleva a cabo una esterilización (por ejemplo, en autoclave a 121 °C durante 15 minutos).

El pH se reajusta si es necesario con un compuesto como el bicarbonato de sodio o un tampón PBS ("Phosphate Buffer Saline" - solución salina de tampón fosfato), normalmente en cantidades reducidas. El valor de pH se controla ventajosamente por un medidor de pH durante el aumento de pH para permanecer a un pH inferior a 6,2 y evitar la gelificación de la solución.

En una realización particular según la invención, el quitosano se disuelve en agua usando un ácido fuerte del tipo de ácido clorhídrico. En este caso, el pH se reajusta con un compuesto de tipo de bicarbonato de sodio o de amonio o PBS, por ejemplo, y/o una base de tipo NaOH o KOH, por ejemplo, (siempre controlando el pH para que permanezca inferior a 6,2).

En una realización particular según la invención, durante la etapa de disolución, el ácido se agrega en una cantidad necesaria para la disolución del quitosano. Por lo tanto, se puede usar un exceso de ácido para ciertos quitosanos, por ejemplo, los quitosanos difíciles de solubilizar con la cantidad estrictamente necesaria de ácido, después se vuelve a precipitar el quitosano, usando amoníaco por ejemplo. Después de una serie de lavados para eliminar el exceso de amoníaco y las sales, el quitosano se puede liofilizar para recuperar la materia seca. Esta será entonces más fácil de solubilizar.

En otra realización particular según la invención, durante la etapa de disolución, el ácido se agrega en una cantidad estrictamente necesaria para la disolución del quitosano, tal como la cantidad estequiométrica estrictamente necesaria para la protonación de los sitios NH_2 .

Normalmente, el número de sitios por protonar se calcula de la siguiente manera:

$$M_{\text{monómero}} = 203 \times GA + 161 \times (1 - GA)$$

$$N_{\text{NH}_2} = \frac{m \times (1 - GA) \times (1 - \% \text{agua})}{M_{\text{monómero}}}$$

con m = peso de materia prima introducida, % de agua = contenido de agua de la materia prima, GA = grado de acetilación.

Después de la inyección, especialmente en la dermis o por vía subcutánea, la solución acuosa homogénea según la presente invención formará ventajosamente un sistema semicristalino, en particular, debido al cambio de pH relacionado con la influencia de los medios tamponados del organismo.

Por "sistema semicristalino", se entiende normalmente un sistema constituido por una fase cristalina y una fase no cristalina (amorfa).

Normalmente, los cristales de quitosano obtenidos corresponden al alomorfo hidratado del quitosano.

De una manera particularmente ventajosa según la presente invención, la solución acuosa tiene buena biocompatibilidad y es biorreabsorbible. En particular, el producto según la invención tiene una duración de biorreabsorción más larga que los productos basados en ácido hialurónico del tipo de ácido hialurónico reticulado, para un efecto prolongado, como un efecto de relleno prolongado.

Por "biorreabsorbible" o "biorreabsorción", se entiende una biodegradación que da como resultado la degradación total o esencialmente total del producto inyectado.

Según una característica particular de la presente invención, la solución de quitosano es líquida antes de la inyección y presenta un largo tiempo de reabsorción una vez inyectada, normalmente de unas pocas semanas a varios meses, por ejemplo, del orden de 3 o 4 semanas hasta 12 a 18 meses.

5 El producto o biomaterial que consiste o contiene la solución acuosa según la invención se beneficia del carácter bacteriológico y fungistático del quitosano, bien conocido en el mundo de la industria alimentaria y de los apósitos cicatrizantes. Estas propiedades facilitan la conservación del producto y ayudan a reducir los riesgos de infección relacionados con la inyección o los fenómenos inflamatorios retardados para otros productos como se mencionó anteriormente. Frente a las moléculas naturales utilizadas hasta la fecha para el relleno de arrugas (colágeno, ácido hialurónico), el quitosano es el único que tiene tales propiedades.

10 Por otro lado, el producto o biomaterial que consiste o contiene la solución acuosa según la invención asegura un relleno biológico eficaz ventajosamente inmediato: el quitosano que favorece de hecho la síntesis de colágeno permite un relleno de los defectos cutáneos, como las arrugas, por estimulación de mecanismos naturales.

15 La presente invención también tiene como objeto el uso de una solución acuosa homogénea de quitosano inyectable que contiene un quitosano que tiene un grado de acetilación inferior al 20 %, ventajosamente inferior al 10 % y un peso molecular promedio en peso comprendido entre 100.000 y 1.000.000 g/mol, dicha solución contiene entre el 0,1 y el 3,5 %, ventajosamente entre el 1 y el 2,5 %, en peso de quitosano, dicha solución tiene un pH inferior a 6,2, ventajosamente comprendido entre 5 y 6,2, dicha solución no contiene quitosano que tenga un grado de acetilación superior al 20 % y no contiene otro quitosano de peso molecular medio inferior para formar partículas cristalinas de quitosano después de la inyección.

20 Ventajosamente, el quitosano es como se definió anteriormente.

25 En particular, el quitosano tiene un peso molecular promedio en peso comprendido entre 100.000 y 1.000.000 g/mol, por ejemplo, entre 250.000 y 1.000.000 g/mol, normalmente entre 250.000 y 500.000 g/mol. Normalmente, dicha solución acuosa no contiene quitosano que tenga un grado de acetilación superior al 20 %.

30 De manera ventajosa, dicha solución acuosa se puede preparar según las etapas del proceso mencionado anteriormente.

35 El objeto de la presente invención es también una composición que comprenda una solución acuosa según la invención, y opcionalmente un compuesto o excipiente aceptable, como un compuesto o excipiente para promover la cristalinidad de la solución después de la inyección.

40 En una realización particular, la composición según la invención comprende una sal tal como cloruro de sodio, o cualquier otro excipiente aceptable ventajosamente para ajustar la osmolaridad de la composición. La adición de una sal como el cloruro de sodio puede ser interesante para obtener una solución isotónica.

45 Según una característica particular de la presente invención, la composición puede comprender además al menos un compuesto que tenga una actividad terapéutica reconocida. A modo de ejemplo, se puede mencionar un compuesto analgésico, un compuesto anestésico local como la lidocaína, mepivacaína, bupivacaína o ropivacaína, un compuesto angiogénico, una vacuna, una hormona, o un compuesto activo del tipo de factor de crecimiento u oligosacárido bioactivo, por ejemplo, un oligosacárido de ácido hialurónico, o incluso un ácido nucleico o una proteína.

Ventajosamente según la presente invención, la composición está formulada para ser administrada o se usa por inyección intradérmica o subcutánea.

50 La presente invención también tiene como objeto una composición o una solución acuosa según la invención para su uso como composición dermatológica, cosmética o como dispositivo médico, ventajosamente como implante biorreabsorbible.

55 La presente invención también se refiere al uso cosmético o a un método de tratamiento cosmético o estético del cuerpo o la cara humana que comprende la inyección de una composición o una solución acuosa según la invención.

En una realización particular, la composición o la solución acuosa según la presente invención está destinada a ser utilizada en la reparación o reconstrucción de los tejidos de la piel de la cara o del cuerpo.

60 En particular, la composición o la solución acuosa según la presente invención se puede usar para rellenar las cavidades del cuerpo o de la cara, como las arrugas o líneas de expresión, para la creación o aumento de volúmenes de la cara o del cuerpo humano, o para la cicatrización de la piel.

65 Según otras realizaciones particulares, se puede utilizar la composición o la solución acuosa según la presente invención:

- en cirugía, especialmente en la reparación de órganos, o en medicina o cirugía estética,
- en urología, especialmente para el tratamiento de la incontinencia urinaria,
- en infectología, especialmente como fluido portador para vacunas,
- en oftalmología, especialmente para la cicatrización corneal,
- 5 - en odontología, especialmente para la colocación de un implante dental o para la reparación ósea,
- o incluso en angiología.

La composición o la solución acuosa según la presente invención también se puede usar en reumatología.

- 10 Ventajosamente, la composición o la solución acuosa según la presente invención también se puede usar como portador de principio activo, en particular terapéutico, tal como una vacuna o una hormona similar a la insulina o al estrógeno, y más generalmente para todos los principios activos cuyo suministro o liberación controlada y/o prolongada presenta una ventaja.
- 15 Finalmente, la presente invención se refiere al uso cosmético de una solución acuosa o una composición según la invención para tratar o combatir el envejecimiento de la piel.

Descripción detallada de la invención

- 20 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención sin limitar de ningún modo su alcance.

Ejemplo 1: Estudio de la cristalización de soluciones de quitosano según la invención *in vitro* en PBS:

- 25 En el marco de este experimento *in vitro*, se eligió PBS ("Phosphate Buffer Saline" - solución salina de tampón fosfato) para simular el medio fisiológico. De hecho, se trata de un medio tampón isotónico de pH 7,2-7,4, de uso general en biología.

- 30 Las soluciones probadas son soluciones de quitosano de diferentes grados de acetilación (GA), de concentración C = 3 % en peso de quitosano con respecto al peso de la solución, y de pH entre 5 y 5,5.

- 35 El quitosano utilizado es un quitosano derivado de la quitina de calamar (Mahtani Chitosan Veraval, India) y tiene un peso molecular promedio en peso de 400.000 g/mol, evaluado por un protocolo descrito en "hysico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium" A. MONTEBAULT, C. VITON, A. DOMARD Biomaterials, 26(8), 933-943, 2005. Las soluciones se prepararon usando ácido acético.

- 40 Las diferentes soluciones de quitosano probadas tienen un GA del 2 %, 3,5 %, 15 %, 40 %, 55 %, todas estas soluciones tienen un contenido de quitosano del 3 % en peso.

- 45 También se probó una mezcla de soluciones de quitosano de GA del 15 % y del 40 %, de concentraciones respectivas del 0,5 y 2 % en peso de quitosano, así como una mezcla de soluciones de quitosano de GA del 15 % y del 55 %, de concentraciones respectivas del 0,5 y 2 % en peso de quitosano, con el fin de comparar los productos según la invención y los productos descritos en las solicitudes de patente de la técnica anterior WO 2008/072230 y WO 2009/150651.

- 50 Los diferentes GA se obtienen por reacetilación de un quitosano de calamar (Mahtani Chitosan Veraval, India) de GA del 3,5 %, Mw aproximadamente 400.000 g.mol⁻¹, purificado por filtración de una solución de acetato de quitosano a una concentración del 0,5 % en peso de polímero mediante un filtro de 0,45 µm. La solución luego se liofiliza.

- 55 En un reactor, y con agitación mecánica (aproximadamente 50 rpm), el liofilizado de quitosano se disuelve en agua desionizada utilizando la cantidad estequiométrica de ácido acético necesaria para la protonación de los sitios de NH₂. Se estudiaron diferentes concentraciones (0,5 % en peso al 3 % en peso).

- 60 El pH de cada solución ha sido controlado, y en todos los casos está entre 5 y 5,5 (dependiendo de la concentración de quitosano).

- 65 Se introdujeron 0,30 ml de cada solución de quitosano en 30 ml de PBS y se dejaron en este medio durante 24 h y 72 h. Las muestras fueron retiradas del PBS, se colocaron en capilares rellenos de agua pura estéril y se analizaron bajo haz sincrotrón en difracción de rayos X, utilizando un haz monocromático de 16 keV ($\lambda = 0,7749 \text{ \AA}$) en la línea D2AM, ESRF, Grenoble. La intensidad difractada por las muestras se da en función del vector de difusión $q = (4\pi \sin\theta)/\lambda$, donde 2θ es el ángulo de difracción (entre el haz incidente y el haz difractado) y después de restar la intensidad difractada por el capilar relleno solo de agua, para restar lo mejor posible la contribución a la difracción del agua y del recipiente.

Los resultados de este estudio *in vitro* se muestran en las Figuras 1 a 3.

Las Figuras 1a, 1b y 1c muestran los resultados de las soluciones de quitosano según la invención, con un GA

bajo (inferior o igual al 15 %).

La Figura 1a muestra la intensidad difractada por una solución de quitosano de GA del 2 %, C=3 % en peso, después de 24 h en un tampón PBS.

5 La Figura 1b muestra la intensidad difractada por una solución de quitosano de GA del 3,5 %, C=3 % en peso, después de 24 h en un tampón PBS.

La Figura 1c muestra la intensidad difractada por una solución de quitosano de GA del 15 %, C=3 % en peso, después de 24 h en un tampón PBS.

10 Las Figuras 2a y 2b muestran los resultados de soluciones de quitosano que no están dentro del alcance de la presente invención, con un alto GA (del 40 al 55 %), que se usan como productos comparativos con los productos según la presente invención.

La Figura 2a muestra la intensidad difractada por una solución de quitosano de GA del 40 %, C=3 % en peso, después de 24 h en un tampón PBS.

La Figura 2b muestra la intensidad difractada por una solución de quitosano de GA del 55 %, C=3 % en peso, después de 24 h en un tampón PBS.

15 Las Figuras 3a y 3b muestran los resultados de soluciones de quitosano que no están dentro del alcance de la presente invención, con una mezcla de bajo GA y alto GA, que se usan como productos comparativos con los productos según la presente invención.

La Figura 3a muestra la intensidad difractada por una mezcla de soluciones de quitosano de GA del 15 % y 40 %, de concentraciones respectivas C=0,5 % en peso y 2 % en peso, después de 72 h en un tampón PBS.

20 La Figura 3b muestra la intensidad difractada por una mezcla de soluciones de quitosano de GA del 15 % y 55 %, de concentraciones respectivas C=0,5 % en peso y 2 % en peso, después de 72 h en un tampón PBS.

25 Se observa un pico de cristalinidad representativo de la línea (200) del quitosano hidratado (véase, por ejemplo, Osorio-Madrado et al., *Biomacromolecules* 2010, 11, 1376-1386) hacia $1,40 \text{ \AA}^{-1}$ después de 24 h en PBS para una solución según la presente invención de bajo GA (2, 3,5 % y 15 %), de concentración 3 % en peso (véanse las figuras 1a, 1b y 1c).

30 Por otro lado, para los GA más altos (40 % y 55 %), que se han probado a título comparativo con la invención, no se observa cristalinidad a las 24 h ni tampoco a las 72 h; en tiempos más largos porque las muestras se solubilizan en el medio PBS y no cristalizan (véanse Figuras 2a y 2b).

35 Las soluciones de bajo GA según la invención, debido a su mayor capacidad para cristalizar, por lo tanto, se pueden distinguir por un comportamiento de difracción específico, a pesar del contenido muy bajo de polímero de las soluciones constituidas en más del 97 % de agua.

40 Después de una permanencia en el PBS, las soluciones de bajo GA se convierten por tanto en sistemas semicristalinos. Las soluciones de bajo GA según la invención tendrán por tanto un efecto de relleno más prolongado gracias a la presencia de esta cristalinidad, mientras que los productos con alto GA tenderán a solubilizarse y degradarse más rápido en los tejidos.

45 Las soluciones constituidas de quitosano de mezclas de GA como se describe en las solicitudes de patente de la técnica anterior WO 2008/072230 y WO 2009/150651 (véanse las Figuras 3a y 3b que muestran resultados relativos a los sistemas de mezclas de GA del 15 % y del 40 %; y 15 % 55 % respectivamente) dan resultados similares a las soluciones que contienen quitosano solo de GA del 40 % o 55 % (véanse las Figuras 2a y 2b). Estas soluciones no cristalizan en condiciones fisiológicas y se solubilizan completamente en el medio PBS después de 4 días.

Ejemplo 2: Estudio *in vivo*: evaluación del rendimiento y de la tolerancia local de las soluciones inyectables de quitosano, implantadas por vía intradérmica en conejos:

50 El objetivo del presente estudio es la evaluación de la tolerancia macroscópica local (mediante la evaluación del eritema, edema, necrosis y ulceración) y del rendimiento (según los criterios de dureza y diámetro) de 6 formulaciones de prueba, en comparación con 3 productos de referencia, después de la implantación intradérmica en conejos.

Elementos de ensayo:

55 Se probaron las siguientes composiciones: soluciones acuosas de quitosano, con un contenido del 3 % en peso mezclado con NaCl al 9‰ + lidocaína al 0,3 %, esterilizada en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

60 Los diferentes GA se obtienen por reacetilación de un quitosano de calamar (Mahtani Chitosan Veraval, India) de GA del 3,5 %, Mw aproximadamente $400.000 \text{ g.mol}^{-1}$, purificado por filtración de una solución de acetato de quitosano a una concentración del 0,5 % en peso de polímero mediante un filtro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. La solución luego se liofiliza.

65 En un reactor, y con agitación mecánica (50 rpm), el liofilizado de quitosano se disuelve en agua desionizada utilizando la cantidad estequiométrica de ácido acético necesaria para la protonación de los sitios de NH_2 . Se estudiaron diferentes concentraciones (0,5 % en peso al 3 % en peso).

El pH de cada solución ha sido controlado, y en todos los casos está entre 5 y 5,5 (dependiendo de la concentración de quitosano).

- 5 Prueba 1: quitosano C=3 % en peso, GA = 5 %
Prueba 2: quitosano C=3 % en peso, GA = 15 %
Prueba 3: quitosano C=3 % en peso, GA = 40 %
Prueba 4: quitosano C=3 % en peso, GA = 55 %
Prueba 5: quitosano C=3 % en peso, GA = 5 % + 40 %
10 Prueba 6: quitosano C=3 % en peso, GA = 15 % + 55 %

Elementos de referencia:

- 15 Ref. 1: Restylane® Perlane Lidocaine (aguja 29G) identificado por la referencia: ref 1-Restylane
Ref. 2: Juvederm® Ultra 4 (aguja 27G) identificado por la referencia: ref 2-Juvederm
Ref. 3: New Fill® / Sculptra (aguja 26G) identificado por la referencia: ref 3-NewFill.

Sistema de ensayo:

- 20 Especie: conejo
Raza: New Zealand White
Procedencia: Charles River Laboratories
Estado de salud: IOPS (SPF)
Número de animales: 8 + 1 reserva
Sexo: hembra
25 Edad a la llegada: 18 semanas Implantaciones:

Procedimientos de preimplantación:

- 30 En D0, los animales fueron pesados, examinados y luego anestesiados, según el siguiente protocolo:
- Ketamina (Ketamina 1000® - VIRBAC) 30 mg/kg, es decir, 0,3 ml/kg
 - + Medetomidina (Domitor® - Janssen Santé Animale) 0,1 mg/kg, es decir, 0,1 ml/kg
 - Inyección intramuscular (IM) en un muslo.
 - La zona dorsal se cortó cuidadosamente (se cortó nuevamente cuando fue necesario más tarde para observaciones)
- 35

Procedimiento de implantación:

- 40 Se hicieron seis inyecciones por animal, en la zona dorsal. Se tuvo cuidado de no inyectar demasiado cerca de la zona del cuello y de los hombros, para que la manipulación del animal no conduzca a la degradación de los sitios.
- Cada sitio se localizó por un tatuaje, luego se inyectó con 200 µl de producto.

Seguimiento de animales después de la implantación:

- 45 *Observaciones diarias*

Se realizaron diariamente por el personal a cargo del cuidado diario (alimentos, abrevado, limpieza...).

- 50 Incluyeron pesar al animal, un examen físico completo y una observación rápida del comportamiento durante las manipulaciones.

Exámenes clínicos en profundidad

- 55 Se realizaron por el veterinario sanitario, el director del estudio o su adjunto, generalmente cuando se observó una anomalía constante durante una observación diaria o un examen clínico simple.

Incluyeron un pesaje, así como la medición de los ritmos respiratorio y cardíaco, y la toma de la temperatura rectal.

- 60 Los sistemas linfático, circulatorio, respiratorio, digestivo, músculo-esquelético, nervioso, así como la piel y las membranas mucosas fueron examinadas.

Observaciones macroscópicas

- 65 Las observaciones tuvieron lugar en los siguientes horarios:
D0 (postimplantación), T+24 h, T+48 h, D4.

- El animal fue fotografiado visto desde arriba, asegurándose de que el tatuaje y todos los sitios sean visibles.
- Los sitios de implantación se evaluaron visual o manualmente usando una cuadrícula de puntuaciones.
- El diámetro de los sitios se midió en el calibrador.

5 Los parámetros evaluados fueron: la formación de edema y eritema, los fenómenos de ulceración localizada y de necrosis en los sitios de implantación, así como la dureza y el diámetro de los sitios.

Escala de nota para edema/eritema/úlceras/necrosis:

10 (0) ausente / (1) leve / (2) moderado / (3) marcado / (4) severo

Eutanasia y toma de muestras:

15 En D2, cinco de los ocho animales fueron anestesiados, luego recibieron una inyección por vía intracardiaca de pentobarbital sódico (Dolethal® - VETOQUINOL).

Los sitios de implantación fueron extraídos y colocados en histocassettes identificados.

20 Las tomas de muestras de los conejos 1 a 3 se conservaron en formol antes del tratamiento para el estudio histológico.

Las tomas de muestras de los conejos 4 y 5 se mantuvieron en agua pura estéril. Unas horas después, se procedió a la extracción del implante en los tejidos, para análisis bajo haz sincrotrón (técnica WAXS, ESRF Grenoble, línea D2AM). Se coloca un fragmento de explante en un capilar relleno de agua y luego se observa bajo un haz sincrotrón en difracción de rayos X, utilizando un haz monocromático a 16 keV ($\lambda=0,7749 \text{ \AA}$).

25 En D4, los tres animales restantes fueron anestesiados, luego recibieron una inyección por vía intracardiaca de pentobarbital sódico (Dolethal® - VETOQUINOL).

30 Los sitios de implantación fueron extraídos y colocados en histocassettes identificados. Estas tomas de muestras se conservaron en formol antes del tratamiento para el estudio histológico.

Resultados:

35 *Observaciones clínicas:*

En todos los casos, durante los primeros 4 días, el edema y el eritema son aún más importantes cuando el GA es elevado. Las soluciones de GA del 5 % y 15 % inducen en algunos animales un edema y un eritema puntuados a 0, mientras que las soluciones de $GA \geq 40$ % inducen un edema y un eritema con una puntuación de 3 o 4. Las soluciones de GA del 5 % y 15 % según la presente invención son las únicas que no indujeron necrosis sistemática de los sitios implantados.

40 Es importante tener en cuenta que el implante que consiste en quitosano de GA del 55 % ya no es palpable después de 4 días, y que después de 2 días, no fue posible eliminarlo de los tejidos para el análisis de difracción de rayos X.

45 El ejemplo de dos conejos (L4 y L5) que recibieron las formulaciones de "prueba" se muestran en las Figuras 4a y 4b.

Las figuras 4a y 4b muestran la fotografía de los sitios de inyección respectivamente de los conejos 4 y 5, 24 h después de la implantación:

- 50
- A: Prueba 1: quitosano C=3 % en peso, GA = 5 %
 - B: Prueba 2: quitosano C=3 % en peso, GA = 15 %
 - C: Prueba 3: quitosano C=3 % en peso, GA = 40 %
 - D: Prueba 4: quitosano C=3 % en peso, GA = 55 %
 - 55 E: Prueba 5: quitosano C=3 % en peso, GA = 5 % + 40 %
 - F: Prueba 6: quitosano C=3 % en peso, GA = 15 % + 55 %

60 Las soluciones preparadas según la presente invención inducen una respuesta inflamatoria limitada en comparación con las soluciones que contienen quitosanos de alto GA o mezclas de quitosano que contienen en particular un quitosano de alto GA como se describe en las solicitudes de patente WO 2008/072230 y WO 2009/150651. Además, como lo sugiere la desaparición completa del implante de grado de acetilación igual al 55 % después de solo 4 días, el uso de un quitosano de alto GA no confiere una duración de biorreabsorción satisfactoria para las aplicaciones específicas.

65 Estudio de los explantes bajo haz sincrotrón

Las Figuras 5 a 7 representan los resultados del estudio bajo haz sincrotrón de difracción de rayos X de explantes de quitosano 24 h después de la implantación de las soluciones por vía intradérmica.

Las Figuras 5a y 5b representan los resultados de una solución de quitosano según la invención (sitio A, prueba 1), con un bajo GA igual al 5 %, después de la implantación de la solución respectivamente en el Conejo 4 y el Conejo 5.

Las Figuras 5c y 5d representan los resultados de una solución de quitosano según la invención (sitio B, prueba 2), con un bajo GA igual al 15 %, después de la implantación de la solución respectivamente en el Conejo 4 y el Conejo 5.

Las Figuras 6a y 6b representan los resultados de una solución comparativa de quitosano (sitio C, prueba 3), con un alto GA igual al 40 %, después de la implantación de la solución respectivamente en el Conejo 4 y el Conejo 5.

Las Figuras 7a y 7b representan los resultados de una solución comparativa de quitosano (sitio E, prueba 5), con una mezcla de bajo GA y de alto GA: 5 + 40 %, después de la implantación de la solución respectivamente en el Conejo 4 y el Conejo 5.

Las Figuras 7c y 7d representan los resultados de una solución comparativa de quitosano (sitio F, prueba 6), con una mezcla de bajo GA y de alto GA: 15 + 55 %, después de la implantación de la solución respectivamente en el Conejo 4 y el Conejo 5.

La intensidad difractada por los explantes se da en función del vector de difusión $q = (4\pi \sin\theta)/\lambda$, donde 2θ es el ángulo de difracción (entre el haz incidente y el haz difractado) y después de restar la intensidad difractada por el capilar relleno solo de agua, para restar lo mejor posible la contribución a la difracción del agua y del recipiente.

Observamos, además del residuo de halo amorfo debido al agua, un pico de cristalinidad bien definido representativo de la línea 200 de quitosano hidratado a $1,40 \text{ \AA}^{-1}$ para los explantes de bajo GA (5 % y 15 %), mientras que este es muy poco notable (GA del 40 %, mezcla de GA del 5 % + 40 %) o completamente ausente (GA del 15 % + 55 %). Las soluciones de bajo GA, debido a su capacidad para cristalizar más fuerte, por lo tanto, se pueden distinguir por un comportamiento de difracción específico, a pesar del contenido muy bajo de polímero de las soluciones constituidas en más del 97 % de agua.

Después de la inyección en la dermis, por lo tanto, estas soluciones de bajo GA se convierten en sistemas semicristalinos. Por lo tanto, podemos esperar un efecto de relleno más prolongado gracias a la presencia de esta cristalinidad, mientras que los productos de alto GA tienden a solubilizarse y a degradarse más rápido en los tejidos.

Las soluciones de quitosano de mezclas de GA como se describe en las solicitudes de patente de la técnica anterior WO 2008/072230 y WO 2009/150651 dan resultados similares a las soluciones que contienen quitosano solo de GA del 40 % o 55 %: estas soluciones no cristalizan o muy poco en los tejidos y, para el GA del 55 %, ya no son macroscópicamente observables en cuatro días.

La cristalinidad desarrollada in situ permite extender el tiempo de biorreabsorción y, por lo tanto, es de gran interés para las aplicaciones específicas.

Ejemplo 3: Estudio *in vivo*: evaluación del rendimiento y de la tolerancia local de las soluciones inyectables de quitosano, implantadas por vía subcutánea en ratas:

El objetivo del presente estudio es la evaluación de la tolerancia macroscópica local (mediante la evaluación del eritema, edema, necrosis y ulceración) y del rendimiento (según los criterios de dureza) de 2 formulaciones de prueba, en comparación con 1 producto de referencia, después de la inyección subcutánea en la rata.

Elementos de ensayo:

Se probaron las siguientes composiciones: soluciones acuosas de quitosano, con un contenido del 3 % en peso mezclado con NaCl al 9% + lidocaína al 0,3 %, esterilizada en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

El quitosano utilizado es un quitosano de calamar (Mahtani Chitosan Veraval, India) de GA del 2 %, Mw (peso molar) aproximadamente $400.000 \text{ g.mol}^{-1}$, purificado por filtración de una solución de acetato de quitosano con la concentración del 0,5 % en peso de polímero mediante un filtro de $0,45 \text{ \mu m}$. La solución luego se liofiliza.

En un reactor, y con agitación mecánica (50 rpm), el liofilizado de quitosano se disuelve en agua para la preparación inyectable con la ayuda de la cantidad estequiométrica de ácido acético necesaria para la protonación de los sitios de NH_2 . Se ha estudiado la concentración del 3 % en peso.

Se ha controlado el pH de cada solución, y en todos los casos está entre 5 y 6,2.

Prueba 1: quitosano C=3 % en peso, GA = 2 %, pH = 5.

Prueba 2: quitosano C=3 % en peso, GA = 2 %, pH = 6.

Elementos de referencia:

Ref. 1: Restylane® Perlane Lidocaine (aguja 29G)

Sistema de ensayo:

- 5
Especie: rata
Raza: Sprague Dawley
Número de animales: 6
Sexo: macho
10 Edad a la llegada: entre 7 y 8 semanas
Peso a la llegada: entre 200 y 220 gramos

Implantaciones:

15 *Procedimientos de preimplantación:*

En D0, los animales fueron pesados, examinados y luego anestesiados, según el siguiente protocolo:
Inyección intraperitoneal (1 ml/100 g de peso animal) de una dilución de pentobarbital sódico (CEVA SANTE ANIMALE - 100 ml a 54,7 mg/ml) a 6 ml por 44 ml de solución salina.

- 20 La zona dorsal se cortó cuidadosamente (se cortó nuevamente cuando fue necesario).

No se ha implementado ningún tratamiento con antibióticos.

25 *Procedimiento de implantación:*

Se realizaron por cada animal cuatro inyecciones por vía subcutánea con jeringas de vidrio estériles con aguja estéril, en la zona dorsal.

- 30 Cada sitio de implantación se localizó por tatuajes, luego se inyectó con 100 µl de producto.

Los sitios de inyección fueron aleatorizados, con el criterio de que cada animal reciba al menos una inyección por formulación (prueba 1, prueba 2 y Ref. 1).

35 Seguimiento de animales después de la implantación:

Observaciones diarias

Se realizaron diariamente por el personal a cargo del cuidado diario (alimentos, abrevado, limpieza...).

- 40 Incluyeron pesar al animal, un examen físico completo y una observación rápida del comportamiento durante las manipulaciones.

Observaciones macroscópicas

- 45 Las observaciones tuvieron lugar en los siguientes horarios:
D0 (postimplantación), D2 (T+48h), D4 (T+96h).

Los sitios de implantación se evaluaron visual o manualmente usando una cuadrícula de puntuación.

- 50 Los parámetros evaluados fueron: la formación de edema y eritema, los fenómenos de ulceración localizada y de necrosis en los sitios de implantación, así como la dureza.

Escala de nota para edema/eritema/úlceras/necrosis:

- 55 (0) ausente / (1) leve / (2) moderado / (3) marcado / (4) severo

Eutanasia y toma de muestras:

- 60 En D4, los animales fueron anestesiados, luego recibieron una inyección de pentobarbital sódico (2 ml sin diluir por vía IP). Los sitios de implantación se tomaron para cubrir la lesión y un área adyacente no lesionada, cada toma de muestra comprende todas las capas de la piel hasta el músculo. Las tomas de muestras se fijaron en una solución acuosa de formaldehído al 4 % durante 48 h.

65 Resultados:

Observaciones clínicas:

Todos los animales mostraron una apariencia y comportamiento normales durante todo el período de observación y su peso se mantuvo estable.

5 La evaluación visual y manual de los sitios implantados no reveló ninguna diferencia en las formulaciones probadas.

No se observaron eritemas inducidos por las soluciones según la presente invención por vía subcutánea.

10 Los volúmenes observados no están relacionados con un efecto irritante de las soluciones probadas, pero son de origen mecánico (implante no reabsorbido).

En las condiciones experimentales adoptadas, las 2 formulaciones de solución según la presente invención fueron bien toleradas localmente.

15 La evaluación de la tolerancia local macroscópica y el rendimiento de las formulaciones Prueba 1 y Prueba 2 fue comparable a la de la formulación de referencia Ref 1.

20 No se observó ninguna reacción adversa significativa como necrosis significativa y ulceración de la piel. Las soluciones preparadas según la presente invención inducen por tanto una respuesta inflamatoria limitada.

Examen histológico de los implantes

Las muestras se fijaron al menos 24 h antes de que pudieran deshidratarse.

25 Se realizó un corte (espesor de 3 a 5 μm) por bloque. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Se analizaron veinticuatro portaobjetos virtuales.

30 El aspecto histológico de los implantes es muy diferente entre el implante de referencia (Restylane/Perlane/lidocaína) y los implantes probados (prueba 1 y prueba 2). Si bien el implante de referencia fue homogéneo, los implantes probados tenían un aspecto microscópico (diámetro variable, más a menudo entre 5 y 15 μm - Prueba 1), sea de tipo coágulo (Prueba 2).

35 La reacción del huésped a las formulaciones Prueba 1 y Prueba 2 a menudo se limitó a la hipodermis debajo del músculo cutáneo, que consiste en una fibroplasia/tejido de granulación e inflamación leve a moderada que rodea el implante. Esta reacción consistió en un tejido de granulación rico en fibras de colágeno en vías de maduración y una infiltración por células mononucleares que consistía principalmente en monocitos / histiocitos y linfocitos, con ocasionalmente células plasmáticas, pero la mayoría de las veces sin granulocitos.

40 Con base en estos criterios, se observó una clasificación de baja reacción del huésped (puntuación 1) para el artículo de referencia, una reacción intermedia (puntuación 2) para las formulaciones Prueba 1 y Prueba 2, sin embargo, con una reacción del huésped más pronunciada en el caso del artículo Prueba 1.

45 Las soluciones constituidas por quitosano según la invención dan resultados similares a la solución de referencia en términos de tolerancia. Por el contrario, como en el ejemplo 2, después de la inyección subcutánea, estas soluciones de bajo GA se convierten en sistemas semicristalinos. Por lo tanto, podemos esperar un efecto de relleno más prolongado gracias a la presencia de esta cristalinidad.

REIVINDICACIONES

1. Solución acuosa homogénea de quitosano inyectable que contiene un quitosano que tiene un grado de acetilación inferior al 20 %, ventajosamente inferior al 10 % y un peso molecular promedio en peso comprendido entre 100.000 y 1.000.000 g/mol, dicha solución contiene entre el 0,1 y el 3,5 %, ventajosamente entre el 1 y el 2,5 %, en peso de quitosano, dicha solución tiene un pH inferior a 6,2, ventajosamente comprendido entre 5 y 6,2, dicha solución no contiene quitosano con un grado de acetilación superior al 20 %, dicha solución no contiene otro quitosano de peso molecular medio inferior y dicha solución acuosa puede formar partículas cristalinas de quitosano después de la inyección.
2. Solución acuosa según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el quitosano tiene un peso molecular promedio en peso comprendido entre 250.000 y 1.000.000 g/mol.
3. Solución acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** es capaz de prepararse mediante las siguientes etapas:
- disolver el quitosano en agua agregando ácido como un ácido débil, dicho ácido débil se selecciona ventajosamente del grupo que consiste en ácido acético, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glutámico y sus mezclas,
 - y opcionalmente reajustar el pH para obtener una solución acuosa que presenta un pH comprendido entre 5 y 6,2.
4. Solución acuosa según la reivindicación 3, **caracterizada por que**, durante la etapa de disolución, el ácido se agrega en una cantidad estrictamente necesaria para la disolución del quitosano.
5. Una composición que comprende una solución acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y opcionalmente un compuesto o un excipiente aceptable, como un compuesto o excipiente para favorecer la cristalinidad de la solución después de la inyección, por ejemplo, una cadena corta de quitosano con un grado de acetilación inferior al 20 % y un peso molecular promedio en peso inferior a 20.000 g/mol o un quitooligosacárido con un grado de polimerización comprendido entre 3 y 30.
6. Composición según la reivindicación 5, que comprende además al menos un compuesto activo tal como un compuesto analgésico, anestésico local, como la lidocaína, mepivacaína, bupivacaína o ropivacaína, un compuesto angiogénico, una vacuna, o un compuesto activo del tipo de factor de crecimiento u oligosacárido bioactivo.
7. Composición según la reivindicación 5 o 6, **caracterizada por que** está formulada para ser administrada por inyección intradérmica o subcutánea.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para su uso como composición dermatológica, cosmética o como dispositivo médico, ventajosamente como implante biorreabsorbible.
9. Composición según la reivindicación 8, para su uso en la reparación o reconstrucción de tejidos de la piel de la cara o del cuerpo.
10. Composición según la reivindicación 8 o 9, para su uso para rellenar las cavidades de la cara, como las arrugas o líneas de expresión, para la creación o aumento de volúmenes de la cara o del cuerpo humano, o para la cicatrización de la piel.
11. Composición según la reivindicación 8, para su uso en cirugía, en medicina o cirugía estética, en urología, reumatología, oftalmología, odontología, o incluso en angiología.
12. Composición según la reivindicación 8, para su uso como portador de principios activos, por ejemplo como vehículo para vacunas u hormonas.
13. Uso cosmético de una solución acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición según la reivindicación 5 para tratar o combatir el envejecimiento de la piel.
14. Uso cosmético de una solución acuosa homogénea de quitosano inyectable que contiene un quitosano que tiene un grado de acetilación inferior al 20 %, ventajosamente inferior al 10 % y un peso molecular promedio en peso comprendido entre 100.000 y 1.000.000 g/mol, dicha solución contiene entre el 0,1 y el 3,5 %, ventajosamente entre el 1 y el 2,5 %, en peso de quitosano, dicha solución tiene un pH inferior a 6,2, ventajosamente comprendido entre 5 y 6,2, dicha solución no contiene quitosano que tenga un grado de acetilación superior al 20 % y no contiene otro quitosano de peso molecular medio inferior para formar partículas cristalinas de quitosano después de la inyección.
15. Uso cosmético según la reivindicación 14, **caracterizado por que** el quitosano tiene un peso molecular promedio en peso comprendido entre 250.000 y 1.000.000 g/mol.

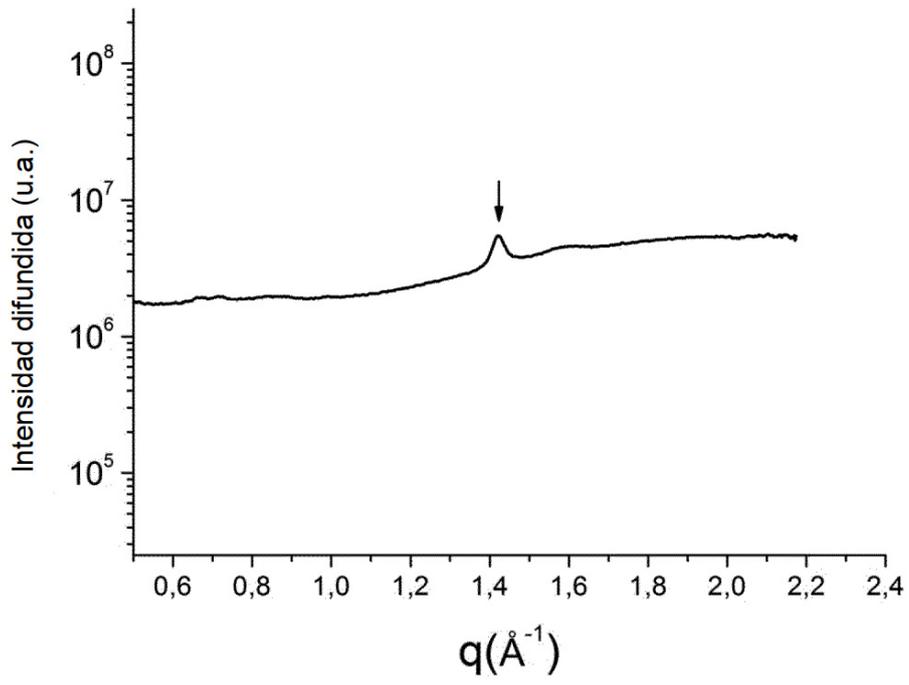


Figura 1a

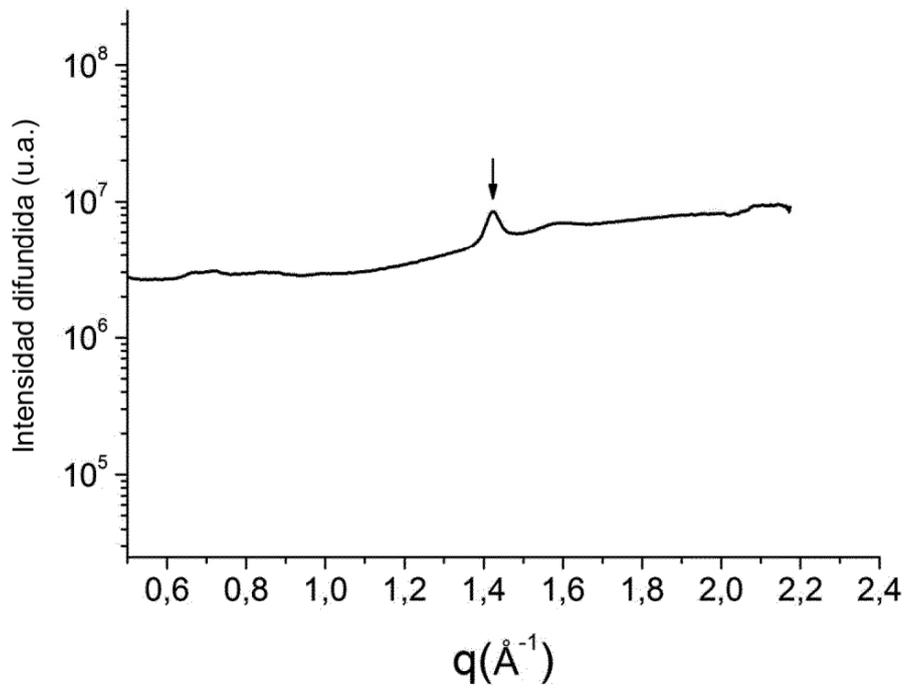


Figura 1b

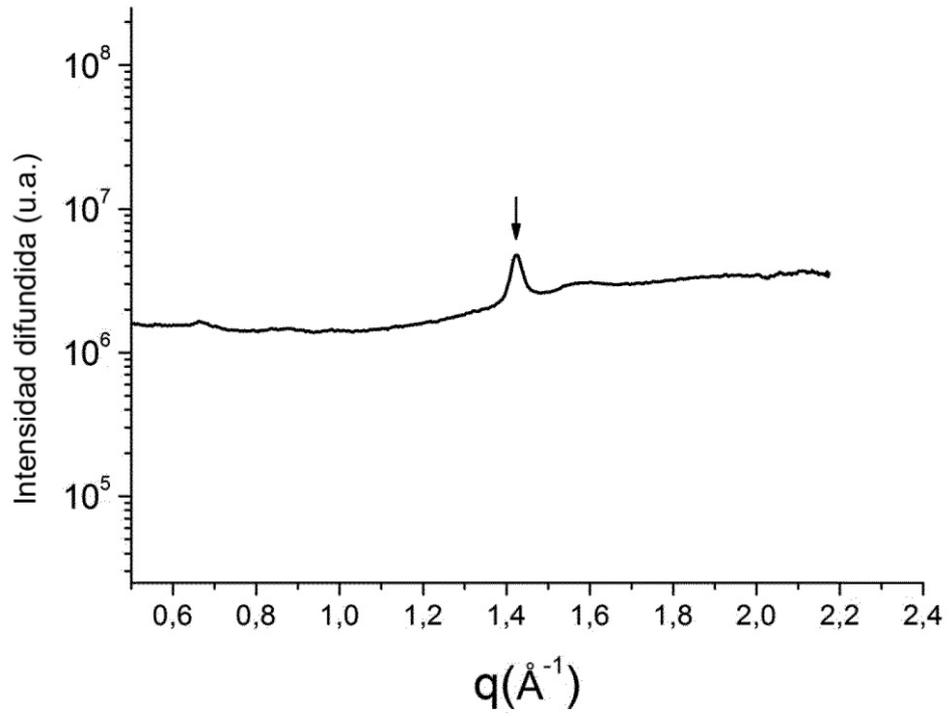


Figura 1c

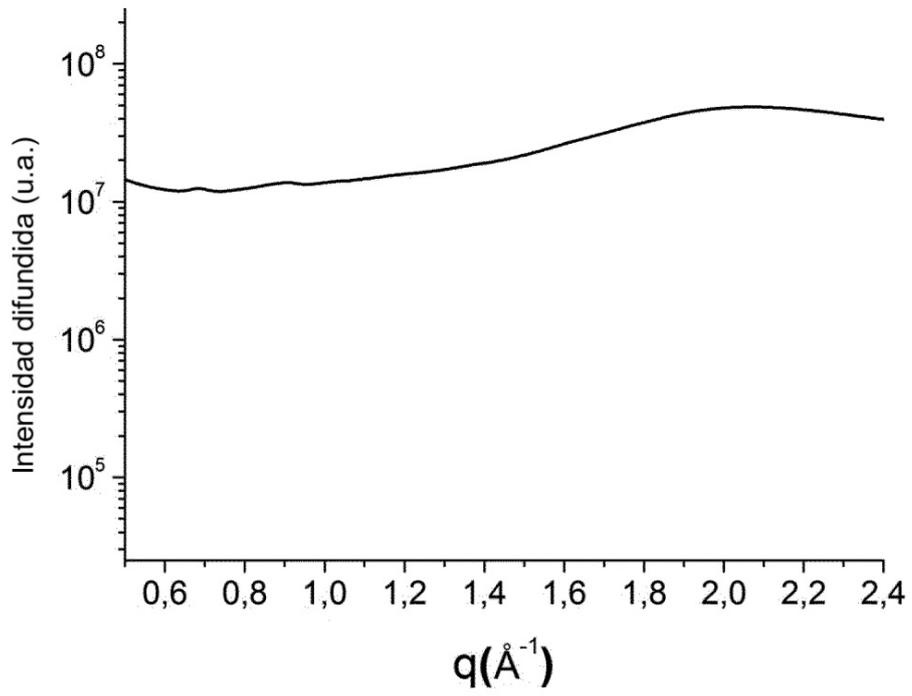


Figura 2a

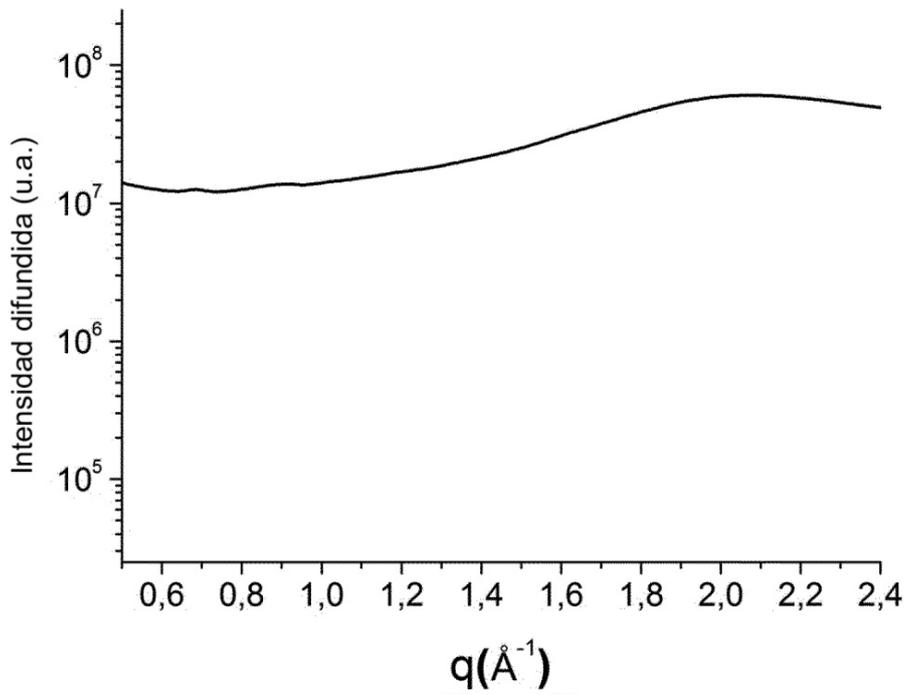


Figura 2b

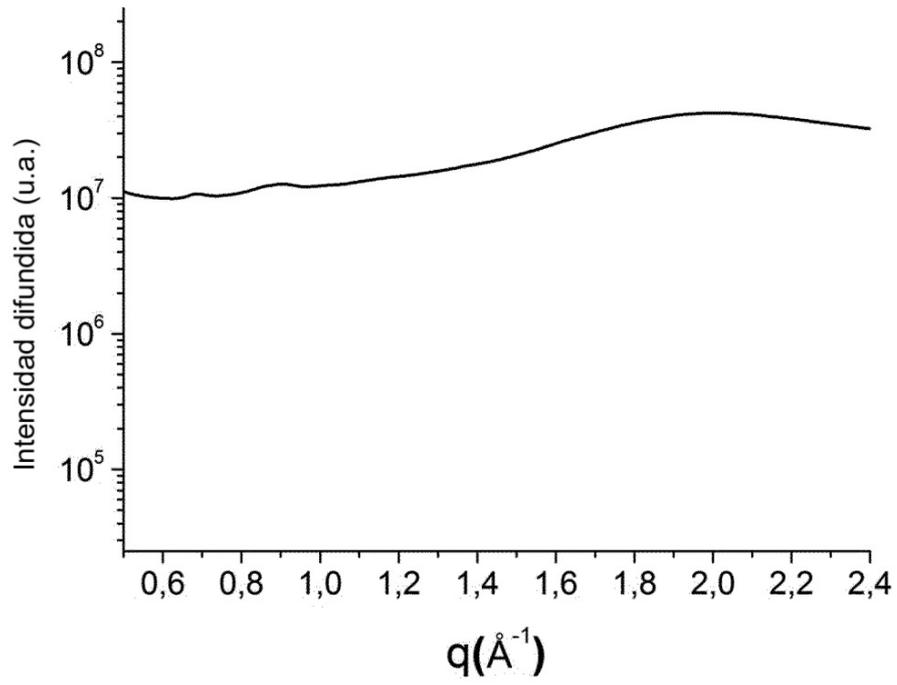


Figura 3a

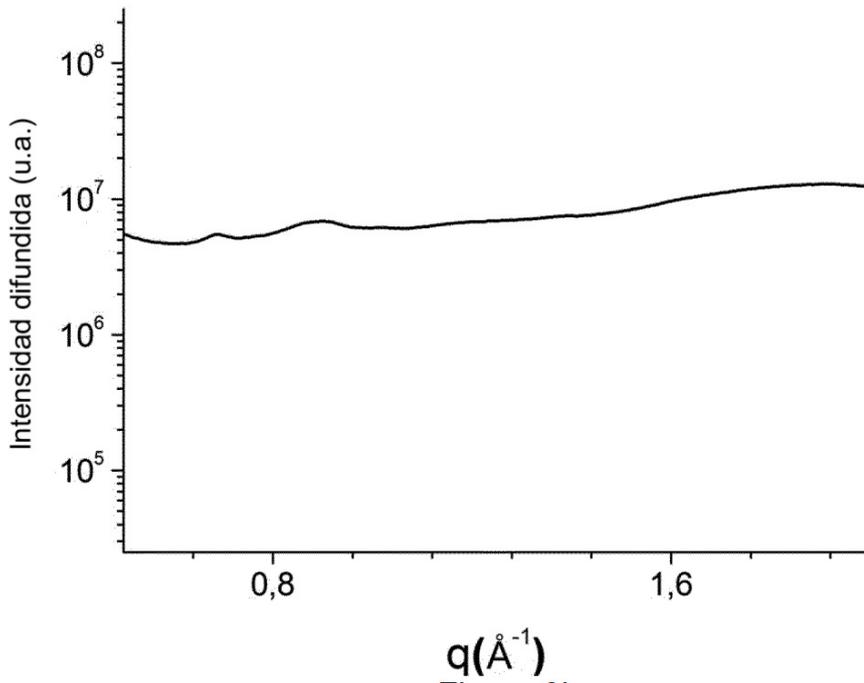


Figura 3b

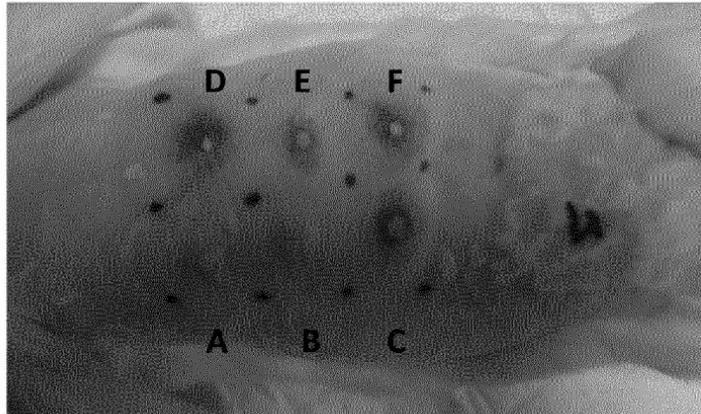


Figura 4a

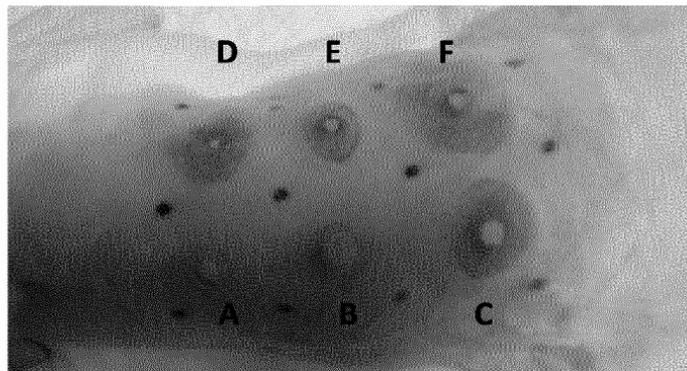


Figura 4b

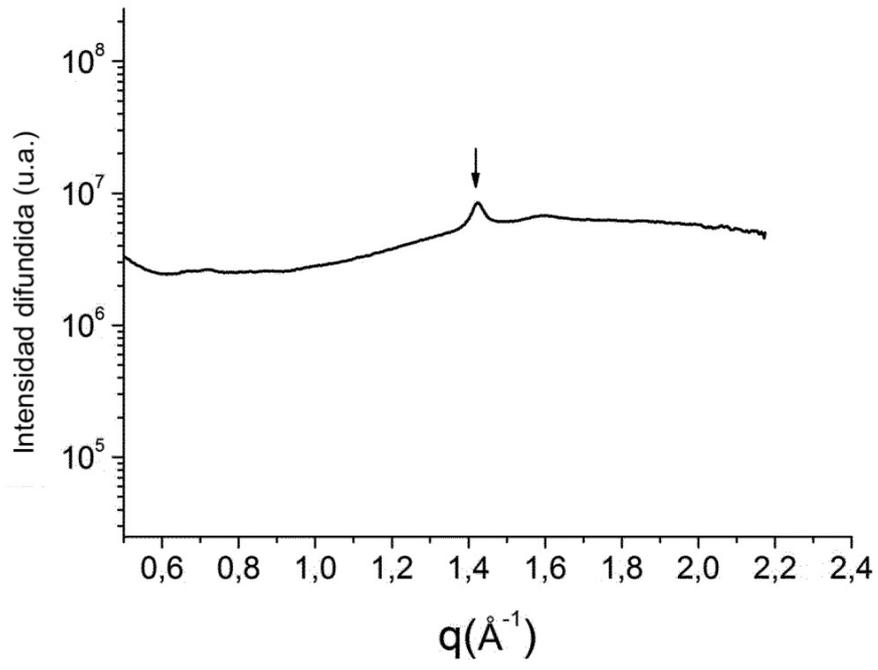


Figura 5a

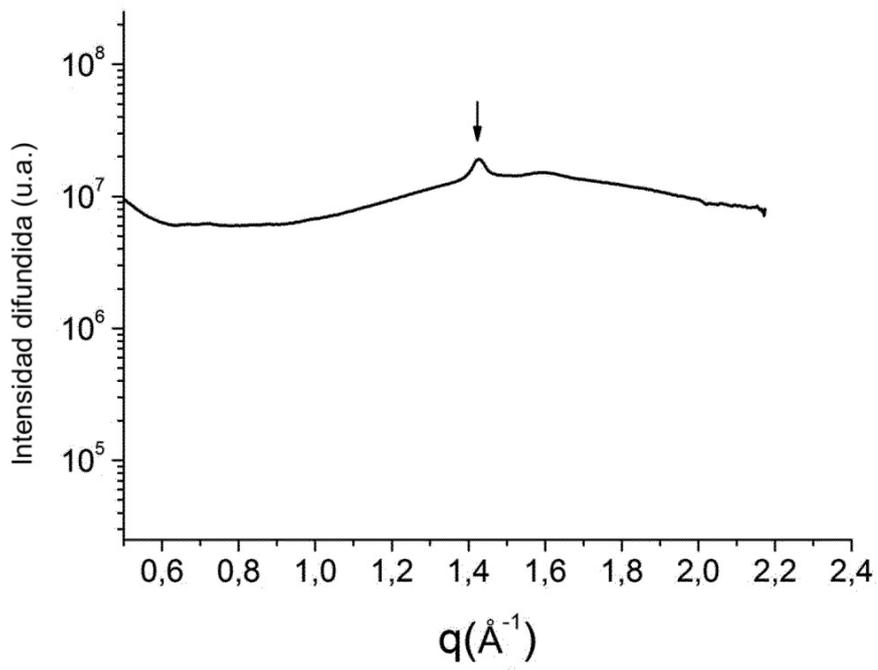


Figura 5b

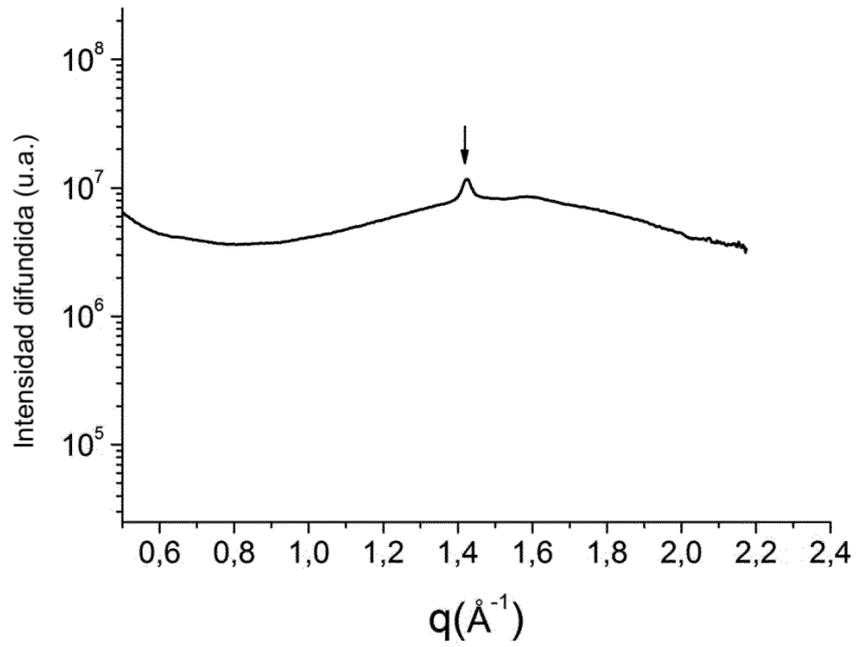


Figura 5c

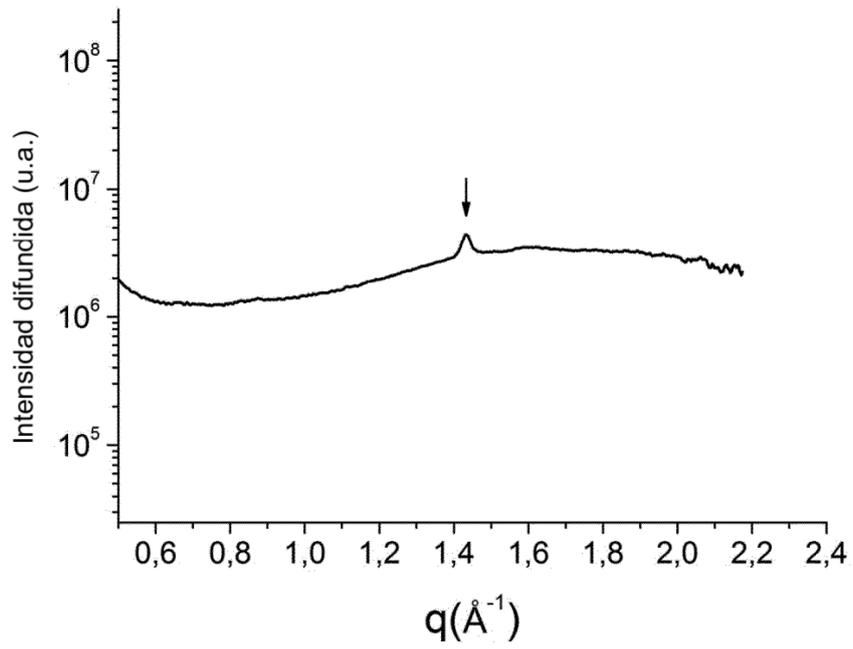


Figura 5d

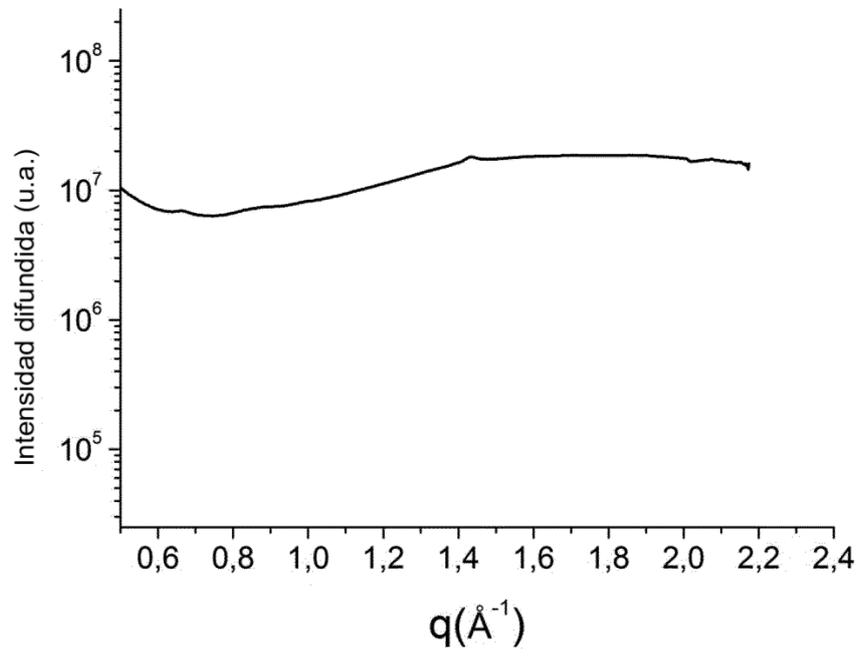


Figura 6a

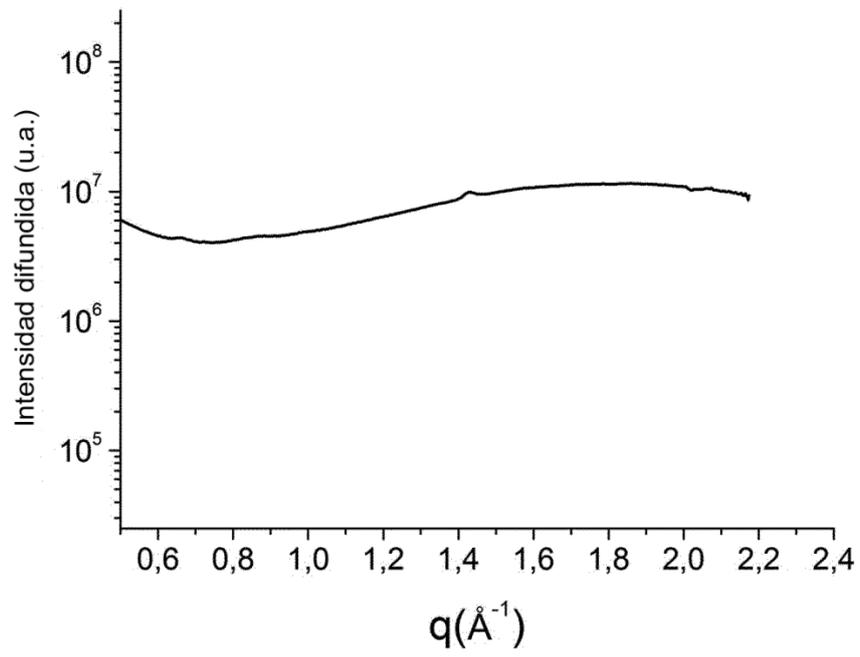


Figura 6b

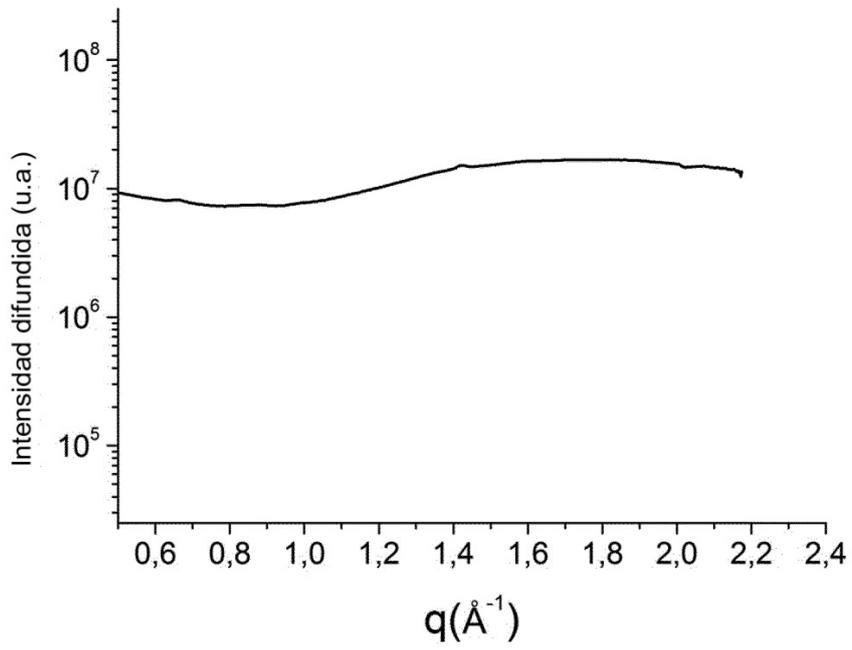


Figura 7a

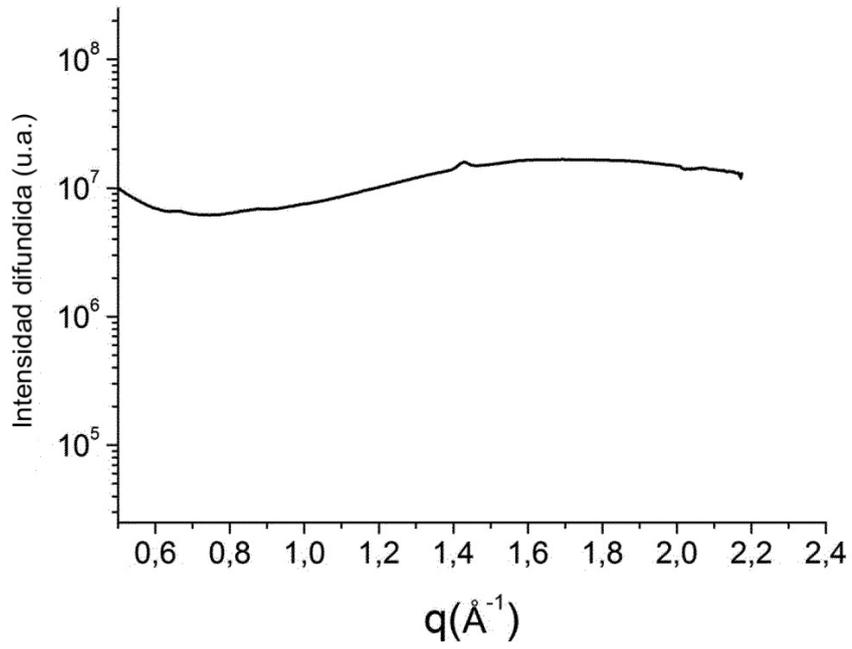


Figura 7b

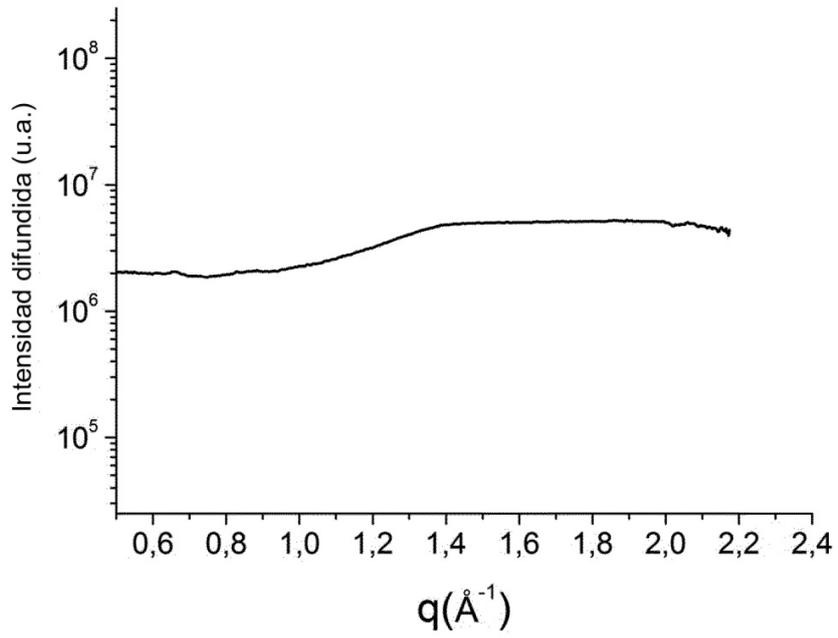


Figura 7c

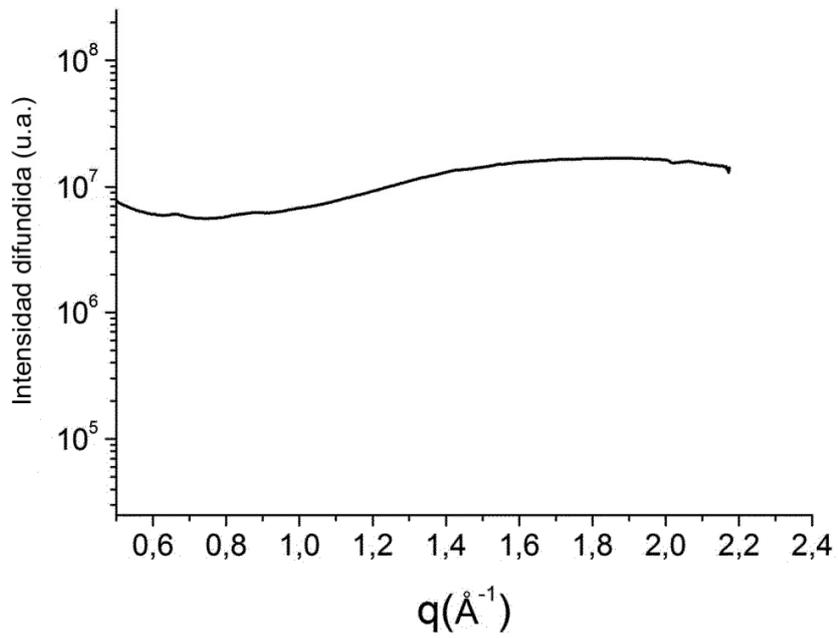


Figura 7d