(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 767 307**

(51) Int. CI.:

A61K 8/73	(2006.01)	***A61L 27/20***	(2006.01)
A61K 8/24	(2006.01)	***A61L 27/52***	(2006.01)
A61K 31/728	(2006.01)		
A61Q 19/08	(2006.01)		
C08L 5/08	(2006.01)		
C08B 37/08	(2006.01)		
A61K 8/04	(2006.01)		
A61K 9/06	(2006.01)		
C08B 37/00	(2006.01)		
A61Q 11/00	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2015 PCT/EP2015/079889**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16096920**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2015 E 15817187 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3233043**

(54) Título: **Procedimiento para preparar hidrogeles**

(30) Prioridad:

15.12.2014 FR 1462401

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2020

(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

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

Procedimiento para preparar hidrogeles

La presente invención se dirige a proponer un procedimiento para preparar hidrogeles basados en un polisacárido reticulado, preferiblemente ácido hialurónico, o una de sus sales.

El ácido hialurónico, que está presente naturalmente en la piel, es conocido por sus propiedades viscoelásticas y su inmensa capacidad absorbente de agua. Sus propiedades contribuyen en gran medida a la elasticidad de la piel.

Es precisamente con respecto a estas propiedades que este compuesto se ha explotado durante más de 10 años en numerosas aplicaciones que se encuentran dentro de los campos médico y cosmético, tales como cirugía cosmética, cirugía dental, viscocomplementación articular u oftalmología.

Así, el ácido hialurónico se usa especialmente para rellenar arrugas y para atenuar, o incluso eliminar, el colapso local de la estructura de la dermis en la forma de una arruga, generalmente a través de inyección directa en la dermis, en la zona de la arruga en cuestión.

De hecho, el ácido hialurónico se usa esencialmente en la forma de un gel reticulado, dada la resistencia incrementada de esta forma particular a la degradación mediada térmicamente, y así a la esterilización.

Estos geles de ácido hialurónico reticulados se pueden obtener a través de diversos procedimientos de preparación. En general, estos procedimientos requieren dos etapas principales, consistiendo la primera en hidratar el ácido hialurónico para convertirlo en un gel acuoso y la segunda dirigida a reticular dicho gel acuoso en presencia de un agente que es capaz de inducir su reticulación (también conocido como un "agente de reticulación").

Como ilustraciones de estos procedimientos, se pueden mencionar especialmente los descritos en los documentos US 2006/0 105 022, WO 2006/056 204 o US 2007/0 036 745.

Por razones obvias, es una finalidad vigente mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles, basados en un polisacárido reticulado, siendo posible que este objetivo avance a través de la mejora de los procedimientos para preparar estos hidrogeles.

A este respecto, el documento FR 2 997 085 describe un procedimiento que incluye la presencia de una sal de haluro alcalino, especialmente de NaCl, durante la ejecución de la reacción de reticulación. Esta sal de haluro alcalino hace posible mejorar las propiedades reológicas del gel reticulado. El documento WO2013/185934 divulga un procedimiento para preparar un gel reticulado que comprende la etapa de reticular hialuronato sódico con éter diglicidílico de butanodiol (BDDE) en presencia de un tampón de fosfato.

La presente invención se dirige a proponer un procedimiento para obtener geles reticulados que tengan propiedades mecánicas aún más ventajosas.

Contrariamente a todo lo esperado, los inventores han encontrado que realizar la etapa de reticulación del polisacárido, especialmente ácido hialurónico, en presencia de un agente de reticulación convencional y también de un compuesto particular, da acceso a un gel reticulado que es particularmente ventajoso en cuanto a las propiedades mecánicas y de resistencia a la degradación mediada térmicamente (esterilización) y al estrés oxidativo (mediante incubación con H_2O_2), cuando se compara con los geles obtenidos a través de procedimientos convencionales.

Así, según el primero de sus aspectos, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un gel reticulado de al menos un polisacárido o una de sus sales, que comprende al menos las etapas que consisten en:

a) proporcionar una solución (o mezcla) formada a partir de un medio acuoso que comprende al menos dicho polisacárido o polisacáridos o una de sus sales en una forma no reticulada, al menos un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional elegido de éter diglicidílico de butanodiol, diepoxioctano o 1,2-bis-(2,3-epoxipropil)-2,3-etileno, y sus mezclas, y al menos trimetafosfato sódico;

b) reticular la solución procedente de la etapa a) y, cuando sea apropiado;

c) recuperar dicho gel reticulado formado.

Preferiblemente, la etapa de reticulación b) se realiza a temperatura ambiente.

Más precisamente, y según se deduce de los ejemplos posteriores, la invención resulta de la observación inesperada por los inventores de que la presencia de un trimetafosfato sódico, durante la ejecución de la reacción de reticulación, hace posible mejorar significativamente:

- las propiedades reológicas del gel reticulado obtenido; y

- las propiedades de resistencia a la degradación mediada térmicamente (esterilización) y al estrés oxidativo (incubación con H_2O_2) del gel reticulado obtenido.

Es más, y aún más inesperadamente, los inventores han observado que la presencia de trimetafosfato sódico conduce a la reticulación efectiva del polisacárido con cantidades muy bajas de agente de reticulación que, en ausencia de dicha sal de fosfato, no hacen posible alcanzar la reticulación efectiva del polisacárido. Esto se deduce especialmente del Ejemplo 1 posterior.

La presencia de al menos una sal de fosfato durante la reacción de reticulación conduce incluso a un efecto sinérgico, ya que las propiedades reológicas del gel reticulado obtenido no se pueden reproducir con geles reticulados cuya reticulación se realiza secuencialmente, a saber en presencia de un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional y a continuación de una sal de fosfato, o viceversa. Esto se deduce especialmente del Ejemplo 4 posterior.

A partir de esta observación, resulta que un procedimiento según la invención es ventajoso ya que puede dar acceso a un gel reticulado satisfactorio, especialmente para rellenar arrugas, al usar cantidades reducidas de agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional, pero que, por otra parte, tiene propiedades reológicas al menos equivalentes a las mostradas por un gel reticulado obtenido a través de un procedimiento de reticulación estándar que use cantidades superiores de agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional.

Un procedimiento según la invención hace posible limitar la cantidad de agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional que se vaya a introducir para realizar la reacción de reticulación, y así (1) limitar la cantidad potencial de un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional después de la reacción de reticulación, de la que un experto en la técnica está buscando ahora prescindir tanto como sea posible, especialmente por medio de etapas de purificación posteriores, y (2) reducir el grado de modificación del polisacárido reticulado, es decir llegar tan cerca como sea posible al polisacárido en su forma no reticulada natural. Esto se deduce especialmente del Ejemplo 1 posterior.

El uso de una sal de fosfato en presencia de un polisacárido ya se ha considerado con propósitos de reticular o funcionalizar dicho polisacárido (Lack y cols., 2007, Carbohydrate Research, 342: 943; Dulong y cols., 2011, Springer, Polym. Bull.; los documentos WO 2008/090 583, WO 2009/047 346 o US 5 783 691). Sin embargo, ninguno de estos documentos describe el efecto inesperado de una sal de fosfato como un "refuerzo" en el caso de la reticulación entre un polisacárido y un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional.

Todas las susodichas ventajas en relación con un procedimiento según la presente invención son todavía más inesperadas ya que no se ha mostrado una reacción para ligar la sal de fosfato al polisacárido. Esto se deduce más particularmente del Ejemplo 1 posterior.

Según una realización particular, un procedimiento de la invención también puede comprender al menos una etapa d) de homogeneizar la solución (o mezcla) procedente de la etapa a), realizándose esta etapa antes de y/o simultáneamente con la etapa de reticulación b), preferiblemente antes de la etapa de reticulación b).

Ventajosamente, el gel reticulado obtenido después de llevar a cabo un procedimiento según la invención es un gel viscoelástico predominantemente elástico, es decir que tiene una capacidad reducida, o incluso no tiene capacidad, para fluir en ausencia de restricciones distintas de su propio peso.

Según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a una composición dermatológica estéril inyectable que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención.

Según otro más de sus aspectos, la presente invención se refiere a una composición cosmética o dermatológica que comprende al menos un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención.

Según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a un estuche que comprende:

- un envase que contiene al menos una dosis de un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención o de una composición según se define anteriormente; y

- un dispositivo para la inyección en o a través de la piel o un dispositivo de microperforación de la piel, destinado a administrar dicha dosis.

Según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere al uso de un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención, para rellenar defectos del volumen de la piel, y especialmente para rellenar arrugas.

La presente invención también se refiere a un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención, para su uso para tratar deficiencias gingivales, en particular enfermedades periodontales y trastornos asociados.

La presente invención también se refiere al uso de un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención para tratar deficiencias gingivales, en particular enfermedades periodontales y trastornos asociados.

La presente invención también se refiere a un método para tratar deficiencias gingivales, en particular enfermedades periodontales y trastornos asociados, que comprende una etapa para inyectar en la encía de un paciente un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención.

El término "enfermedad periodontal" es un nombre genérico usado para describir enfermedades inflamatorias del periodonto, los tejidos circundantes y los tejidos que fijan los dientes en la mandíbula. El periodonto consiste en cemento, ligamentos periodontales y encía, que comprende hueso alveolar y los tejidos blandos que la cubren. La enfermedad periodontal es la principal causa de pérdida de dientes en la población adulta (Anderson's Pathology, página 2000, John M. Kissane ed., 9ª ed. (1992)).

La presente invención también se refiere a un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención, para su uso para la viscocomplementación articular.

La presente invención también trata del uso de un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención para tratar la viscocomplementación articular.

La presente invención también se refiere a un método para tratar la artrosis, que comprende una etapa para inyectar en la articulación de un paciente que sufre artrosis un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención.

La presente invención también se refiere a un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención, para su uso para tratar trastornos oftálmicos, especialmente para extraer cataratas y para insertar y retirar lentes intraoculares (IOL).

La presente invención también trata del uso de un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención para tratar trastornos oftálmicos, especialmente para extraer cataratas y para insertar y retirar lentes intraoculares (IOL).

La presente invención también se refiere a un método para tratar trastornos oftálmicos, especialmente para extraer cataratas y para insertar y retirar lentes intraocular (IOL), que comprende una etapa para inyectar en el ojo de un paciente un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención.

Para los propósitos de la presente invención, el término "piel" incluye la piel de la cara, el cuello, el escote, las manos, el cuero cabelludo, el abdomen y/o las piernas, pero también los labios.

Polisacárido

El término "polisacárido" significa cualquier polímero que consista en varios sacáridos ligados entre sí a través de enlaces O-ósido y que tenga la fórmula general: -[Cx(H2O)y)]n-.

Para los propósitos de la presente invención, el término "no reticulado" está destinado a indicar un gel acuoso de polisacáridos no reticulados o no convertidos, es decir una solución de polisacáridos en los que las cadenas del polímero o los polímeros no están conectadas entre sí a través de enlaces fuertes o covalentes.

Un polisacárido según la invención se selecciona más particularmente con respecto a las propiedades que se desea que sean manifestadas por el gel reticulado obtenido según la invención. Más particularmente, este polisacárido debe tener buena biocompatibilidad.

Además, un polisacárido según la invención debe tener buena estabilidad a lo largo del tiempo, especialmente después de la reticulación, dado su uso pretendido, a saber, especialmente para rellenar defectos del volumen de la piel, y especialmente para rellenar arrugas.

Así, un polisacárido o sal de polisacárido según la invención es fisiológicamente aceptable y puede ser de origen natural o sintético.

Los polisacáridos que son adecuados para el uso en la invención se pueden elegir especialmente de sulfato de condroitina, queratano, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparina, xantano, carrageninas, ácido hialurónico (HA), quitosano, celulosa y sus derivados, alginato, almidón, dextrano, pululano, galactomanano y sus sales biológicamente aceptables.

Las sales de polisacárido según la invención se eligen más particularmente de sales fisiológicamente aceptables, tales como la sal sódica, la sal potásica, la sal de cinc, la sal de plata, y sus mezclas, preferiblemente la sal sódica.

Preferiblemente, un polisacárido o una sal de polisacárido según la invención, o incluso ácido hialurónico (HA), tiene un alto peso molecular, preferiblemente un peso molecular medio de más de o igual a 50.000 Da, o incluso más de 3 MDa dependiendo de la aplicación que se considere.

Ventajosamente, un polisacárido o una sal de polisacárido según la invención, o incluso ácido hialurónico, puede tener un peso molecular medio que varía de 50.000 a 10.000.000 daltons y preferiblemente de 500.000 a 4.000.000 daltons.

Un polisacárido particularmente preferido es el ácido hialurónico (HA) o una de sus sales, preferiblemente hialuronato sódico (NaHA).

Agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional

El término "agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional" significa cualquier compuesto que sea capaz de inducir la reticulación entre las diversas cadenas de polisacárido y que comprenda al menos un grupo epoxídico difuncional o multifuncional.

La elección de este agente de reticulación con respecto al polisacárido que se va a reticular se encuentra claramente dentro de las competencias de un experto en la técnica.

Agentes de reticulación según la presente invención son agentes de reticulación epoxídicos difuncionales o multifuncionales elegidos de éter diglicidílico de butanodiol (BDDE), diepoxioctano, 1,2-bis(2,3-epoxipropil)-2,3-etileno, y sus mezclas.

Preferiblemente, un agente de reticulación según la invención es éter diglicidílico de butanodiol (BDDE).

Ajustar la cantidad de agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional para realizar la reacción de reticulación también se encuentra dentro de las competencias de un experto en la técnica.

Ventajosamente, la relación molar del "número de moles de agente o agentes de reticulación epoxídicos difuncionales o multifuncionales/número total de moles de unidades de polisacárido" en una solución según la etapa a) puede estar entre 0,005 y 1, preferiblemente entre 0,01 y 0,25.

El número total de moles de unidades de polisacárido puede ser preferiblemente el número total de moles de unidades de disacárido que forman el monómero de ácido hialurónico.

Sal de fosfato

Según se indica anteriormente, los inventores han observado, inesperadamente, que, además del agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional, la presencia adicional de al menos trimetafosfato sódico (STMP) para la realización de la etapa de reticulación conduce a una mejora significativa en las propiedades, en cuando a reología y a resistencia a la degradación mediada térmicamente (esterilización) y al estrés oxidativo (mediante incubación con H_2O_2), manifestadas por un gel reticulado obtenido después del procedimiento según la invención.

Ventajosamente, la relación molar del "número de moles de trimetafosfato sódico/número total de moles de unidades de polisacárido" en una solución según la etapa a) puede estar entre 0,005 y 1, preferiblemente entre 0,01 y 0,25.

En este caso, además, el número total de moles de unidades de polisacárido puede ser preferiblemente el número total de moles de unidades de disacárido que forman el monómero de ácido hialurónico.

Procedimiento según la invención

Un procedimiento de la invención requiere, en una primera fase, una solución formada a partir de un medio acuoso (o gel acuoso) que comprende al menos un polisacárido, o una de sus sales, en una forma no reticulada.

La solución considerada en la etapa a) de un procedimiento según la presente invención se puede obtener de antemano al poner en contacto, en un recipiente adecuado:

(i) un medio acuoso;

(ii) al menos un polisacárido, o una de sus sales, en una forma no reticulada;

(iii) al menos un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional; y

(iv) al menos trimetafosfato sódico, siendo irrelevante el orden de adición al recipiente de los compuestos (i) a (iv).

Según una primera variante de la realización, la solución considerada en la etapa a) de un procedimiento según la presente invención se obtiene de antemano al poner en contacto, en un recipiente adecuado:

(i) un medio acuoso;

(ii) al menos un polisacárido, o una de sus sales, en una forma no reticulada; seguido por la adición

(iii) de al menos un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional; y

(iv) al menos trimetafosfato sódico, siendo irrelevante el orden de adición al recipiente de los compuestos (iii) y (iv), o incluso siendo ventajosamente simultánea la adición al recipiente de los compuestos (iii) y (iv).

La adición simultánea de los compuestos (iii) y (iv) al recipiente implica una etapa previa o paralela de preparación de una solución (conocida como la solución de reticulación) que comprende al menos el agente o los agentes de reticulación epoxídicos difuncionales o multifuncionales y la sal o las sales de fosfato.

Según una segunda variante de la realización, la solución considerada en la etapa a) de un procedimiento según la presente invención se obtiene de antemano al poner en contacto, en un recipiente adecuado:

(i) un medio acuoso;

(ii) al menos un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional;

(iii) al menos trimetafosfato sódico; seguido por la adición

(iv) de al menos un polisacárido, o una de sus sales, en una forma no reticulada,

siendo irrelevante el orden de adición al recipiente de los compuestos (i), (ii) y (iii), o incluso siendo ventajosamente simultánea la adición al recipiente de los compuestos (ii) y (iii).

La adición simultánea de los compuestos (ii) y (iii) al recipiente implica una etapa previa o paralela de preparación de una solución (conocida como la solución de reticulación) que comprende al menos el agente o los agentes de reticulación epoxídicos difuncionales o multifuncionales y la sal o las sales de fosfato.

Para los propósitos de la presente invención, el término "medio acuoso" significa cualquier medio líquido que contenga agua y que tenga la propiedad de disolver un polisacárido o una de sus sales.

La naturaleza del medio acuoso está condicionada más particularmente con respecto al tipo de reticulación prevista, el tipo de agente de reticulación considerado, pero también el tipo de polisacárido usado.

A este respecto, el medio acuoso que es propenso a ser adecuado para el uso tendrá pH ajustado según el conocimiento de un experto en la técnica.

Preferiblemente, y especialmente dado el agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional, el medio acuoso es preferiblemente básico. Así, y aún más preferiblemente, el medio acuoso tiene un pH básico, preferiblemente mayor de 11, o incluso mayor de 12.

Por ejemplo, en caso de usar BDDE como agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional, un medio acuoso particularmente preferido puede ser un medio alcalino, preferiblemente hidróxido sódico (NaOH), más particularmente una solución de hidróxido sódico a un pH mayor de 12.

Ventajosamente, esta etapa de formación de una solución según la etapa a) se puede realizar a temperatura ambiente, preferiblemente a una temperatura por debajo de 35°C y mejor aún a una temperatura que varía de 15 a 25°C.

La formación de una solución según se considera en la etapa a) implica ventajosamente al menos una homogeneización, según se indica anteriormente. Esta etapa se ilustra mediante la etapa d) del procedimiento de la invención.

El propósito de esta operación es más particularmente hidratar y homogeneizar el polisacárido completamente en el medio acuoso, y así contribuir a optimizar las calidades del gel reticulado esperado.

El propósito de esta operación también es homogeneizar el agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional y la sal de fosfato en la solución procedente de la etapa a), contribuyendo además a optimizar las calidades del gel reticulado esperado.

La homogeneización se considera satisfactoria cuando la solución obtenida tiene un color homogéneo, sin aglomerados y una viscosidad uniforme. Ventajosamente, se puede realizar bajo condiciones operativas suaves para evitar la degradación de las cadenas de polisacárido.

Esta etapa es la más importante cuando el polisacárido tiene un alto peso molecular. Específicamente, la hidratación de este compuesto tiene entonces una tendencia a dar lugar a la formación de una solución de alta viscosidad dentro de la cual se observa comúnmente la aparición de aglomerados.

La etapa d) de homogeneización de la solución obtenida en la etapa a) se realiza antes de y/o simultáneamente con la etapa de reticulación b) descrita posteriormente, preferiblemente antes de la etapa de reticulación b).

La duración de esta etapa de homogeneización depende especialmente de la naturaleza del polisacárido, y más particularmente de su peso molecular, su concentración, el contenido respectivo de los diversos compuestos usados, especialmente las cantidades de polisacárido o polisacáridos empleadas, las condiciones operativas dentro del medio acuoso y el dispositivo de homogeneización usado.

Ajustar el tiempo de homogeneización apropiado para obtener un gel de polisacárido acuoso que sea suficientemente homogéneo se encuentra dentro de las competencias generales de un experto en la técnica.

La homogeneización también se puede dividir en varios ciclos, opcionalmente con tiempos de espera entre ciclos, especialmente a fin de determinar la calidad de homogeneización del polisacárido o los polisacáridos en el medio acuoso.

Preferiblemente, una etapa de homogeneización según la presente invención puede tener lugar a lo largo de un tiempo total de menos de 200 minutos, preferiblemente menos de 150 minutos, o incluso entre 5 y 100 minutes.

A continuación, la solución procedente de la etapa a) se somete a condiciones adecuadas para la reacción de reticulación.

Esta etapa se ilustra mediante la etapa b) del procedimiento de la invención.

La finalidad de la reticulación es crear puentes entre las cadenas de polisacáridos, y especialmente de ácido hialurónico, haciendo posible obtener una red tridimensional sólida y densa a partir de una solución viscosa.

La primera condición para inducir la ejecución de la reacción de reticulación en un procedimiento según la presente invención reside en la presencia, en la solución procedente de la etapa a), de al menos un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional y de al menos una sal de fosfato.

Las condiciones operativas de la reacción de reticulación pueden depender especialmente de la naturaleza del polisacárido, su peso molecular, la naturaleza del agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional y el medio acuoso.

Según una primera variante de la realización, la etapa de reticulación b) se realiza a temperatura ambiente.

Preferiblemente, y según esta variante de la realización, la etapa de reticulación b) se puede realizar a una temperatura por debajo de 35°C, preferiblemente a una temperatura que varía de 15 a 25°C y mejor aún de 19 a 23°C.

La reticulación a temperatura ambiente implica una cinética de reticulación tal que la etapa de reticulación b) pueda tener lugar preferiblemente a lo largo de un período de entre 5 horas y 336 horas (es decir, 2 semanas), preferiblemente entre 20 horas y 150 horas y mejor aún entre 40 horas y 100 horas.

Se puede conseguir una cinética de reticulación más rápida, es decir menos de 5 horas, al poner en contacto una solución procedente de la etapa a) con al menos un elemento estimulante, distinto del agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional y la sal de fosfato. El elemento estimulante se puede caracterizar, por ejemplo, por calentamiento, exposición a UV, exposición a microondas, o incluso puesta en contacto de la solución procedente de la etapa a) con un material de tipo catalítico.

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

Así, un elemento estimulante puede consistir en:

- inmersión del recipiente que comprende la solución procedente de la etapa a) en un baño que contiene un fluido caliente, por ejemplo cuya temperatura es mayor de 40°C, preferiblemente entre 45 y 60°C;

- exposición del último a radiación de ciertas longitudes de onda de tipo UV, por ejemplo, a radiación de microondas o a radiación infrarroja;

- irradiación del último usando rayos ionizantes, a la manera del procedimiento descrito en el documento US 2008/0 139 796; y

- reticulación enzimática;

- adición de un catalizador y/o de un producto intermedio de reacción, o incluso

- combinaciones entre los diversos elementos susodichos.

Preferiblemente, y según la variante de la realización en la que la etapa de reticulación b) se realiza en presencia de un elemento estimulante, dicho elemento estimulante consiste en elevar la temperatura de la solución procedente de la etapa a).

Ventajosamente, y según esta variante de la realización, la etapa de reticulación b) se realiza a una temperatura mayor de 40°C, preferiblemente mayor de 50°C, más particularmente entre 45 y 60°C y mejor aún entre 50 y 55°C.

El grado de reticulación también depende del tiempo de reticulación impuesto a los geles. Cuanto mayor sea el tiempo, mayor será la reticulación, sin embargo, con un óptimo que no debe ser superado.

Así, en el caso de una reticulación realizada en presencia de un elemento estimulante, especialmente elevación de la temperatura según se describe anteriormente, la etapa de reticulación b) se puede realizar ventajosamente a lo largo de un período que varía de 30 a 300 minutos, preferentemente de 100 a 240 minutos.

Según una realización particularmente preferida que considera el uso de un elemento estimulante, especialmente caracterizado por la elevación de la temperatura según se describe anteriormente, la etapa de reticulación b) se realiza a una temperatura de aproximadamente 50 a 55°C, durante un período de 100 a 240 minutos.

Ventajosamente, las condiciones de reticulación se ajustan para obtener un grado de reticulación tal que el gel formado sea un gel viscoelástico, o incluso predominantemente elástico.

La reticulación se puede detener antes de, simultáneamente con o posteriormente a la etapa de recuperación del gel c).

Por ejemplo, la reticulación se puede interrumpir o puede resultar de:

- la neutralización del pH;

- la dilución del gel reticulado;

- la interrupción de las condiciones operativas, por ejemplo interrupción de la radiación o el calentamiento; y/o

- el agotamiento del agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional.

Según una realización particularmente preferida, el procedimiento según la invención usa (i) hialuronato sódico como polisacárido en un medio alcalino, (ii) éter diglicidílico de butanodiol (BDDE) como agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional y (iii) trimetafosfato sódico (STMP) como sal de fosfato.

Según se indica anteriormente, el efecto ventajoso asociado con la presencia de la sal de fosfato permite el uso de una cantidad reducida de agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional, en comparación con los procedimientos convencionales, mientras que mantiene al mismo tiempo propiedades mecánicas satisfactorias y una resistencia satisfactoria a la degradación mediada térmicamente y al estrés oxidativo para los geles reticulados obtenidos después de realizar el procedimiento según la invención.

Así, según esta realización particular, el polisacárido o los polisacáridos reticulados incluidos en un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la invención pueden tener un grado de modificación de menos de 10%, preferiblemente entre 0,1% y 5%, mejor aún entre 0,4% y 2,5%, o incluso entre 0,7% y 1,6%, mientras que al mismo tiempo siguen siendo satisfactorios con respecto a la propiedades mecánicas y la resistencia a la degradación mediada térmicamente y al estrés oxidativo.

Para los propósitos de la presente invención, el término "grado de modificación" está destinado a indicar la relación entre el número de moles de agente de reticulación ligados al polisacárido y el número de moles de polisacárido que forma dicho gel reticulado. Esta magnitud se puede medir especialmente mediante análisis por 1H NMR del gel reticulado, según se describe en el Ejemplo 1 posterior.

El término "número de moles de ácido hialurónico" significa el número de moles de unidades de disacárido de ácido hialurónico repetidas, estando compuesta la unidad de disacárido por ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina conectados entre sí a través de enlaces beta-1,4 y beta-1,3-glucósido alternos.

Además, y según se deduce del Ejemplo 1 posterior, la sal de fosfato en un procedimiento según la invención también es ventajosa ya que no se ha identificado una modificación adicional del polisacárido asociado con esta sal de fosfato.

Además, un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención puede tener un módulo elástico (G') de entre 20 y 1000 Pa, preferiblemente entre 35 Pa y 400 Pa, asociado con un ángulo de fase (δ) de menos de 45°.

Estos parámetros se pueden medir especialmente por medio de los protocolos descritos posteriormente.

Según una realización particular, y a fin de mejorar adicionalmente la calidades del implante, un procedimiento según la presente invención también puede comprender una etapa e) que consiste en añadir al menos un polisacárido no reticulado, preferiblemente ácido hialurónico no reticulado, realizándose esta etapa e) antes de, simultáneamente con o posteriormente a la etapa de recuperación c), pero necesariamente después de la etapa de reticulación b).

Así, un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento según la presente invención también puede comprender un polisacárido no reticulado, preferiblemente ácido hialurónico no reticulado.

Preferiblemente, la etapa e), cuando está presente en un procedimiento según la invención, se realiza posteriormente a la etapa de recuperación c).

El polisacárido no reticulado, preferiblemente ácido hialurónico no reticulado, puede tener las susodichas características.

Según otra realización particular más, un procedimiento según la presente invención también puede comprender una etapa f) que consiste en añadir al menos un anestésico, realizándose esta etapa f) preferiblemente posteriormente a la etapa de reticulación b), o incluso posteriormente a la etapa de purificación definida posteriormente cuando se realiza dicha etapa.

La elección y la cantidad de anestésico se ajustan a fin de que no se corra ningún riesgo de incompatibilidad con los otros compuestos usados en un gel reticulado según la invención, y especialmente con el polisacárido y más particularmente con ácido hialurónico, y a fin de que sea compatible con los usos considerados.

Estos ajustes se encuentran dentro de las competencias generales de un experto en la técnica.

Un anestésico que se puede usar en la presente invención se puede elegir así de ambucaína, amolanona, amilocaína, articaína, benoxinato, benzocaína, betoxicaína, bifenamina, bupivacaína, butacaína, butambeno, butanilicaína,

butetamina, butoxicaína, carticaína, cloroprocaína, cocaetileno, cocaína, ciclometicaína, dibucaína, dimetisoquina, dimetocaína, diperodona, diciclonina, ecgonidina, ecgonina, cloruro de etilo, etidocaína, beta-eucaína, euprocina, fenalcomina, formocaína, hexilcaína, hidroxitetracaína, p-aminobenzoato de isobutilo, mesilato de leucinocaína, levoxadrol, lidocaína, mepivacaína, meprilcaína, metabutoxicaína, cloruro de metilo, mirtecaína, naepaína, octacaína, ortocaína, oxetazaína, paretoxicaína, fenacaína, fenol, piperocaína, piridocaína, polidocanol, pramoxina, prilocaína, procaína, propanocaína, proparacaína, propipocaína, propoxicaína, pseudococaína, pirrocaína, ropivacaína, alcohol salicílico, tetracaína, tolicaína, trimecaína y zolamina, o una de sus sales.

Preferiblemente, el anestésico puede ser lidocaína y/o mepivacaína, y mejor aún hidrocloruro de lidocaína.

Según otra realización particular más, un procedimiento según la presente invención también puede comprender una etapa g) que consiste en añadir al menos un agente activo adicional distinto de los compuestos descritos previamente, realizándose esta etapa g) antes de, simultáneamente con y/o posteriormente a la etapa de reticulación b), preferiblemente posteriormente a la etapa b).

La elección y la cantidad de agente activo adicional se ajustan a fin de que no se corra ningún riesgo de incompatibilidad con los otros compuestos usados en un gel reticulado según la invención, y especialmente con el polisacárido y más particularmente con ácido hialurónico, y a fin de que sea compatible con los usos considerados.

Estos ajustes se encuentran dentro de las competencias generales de un experto en la técnica.

Entre los agentes activos adicionales que se pueden usar en la presente invención, se pueden mencionar antioxidantes, aminoácidos, vitaminas, minerales, ácidos nucleicos, coenzimas, derivados de adrenalina, y una de sus mezclas, siendo diferentes dichos compuestos adicionales considerados de los indicados previamente.

Según otra realización particular más, un procedimiento de la invención se puede realizar al menos parcialmente en un recipiente específico con una pared deformable, por ejemplo en una bolsa, especialmente la definida en el documento FR 2 945 293.

El gel reticulado obtenido después del procedimiento de la invención según se describe previamente puede no ser directamente inyectable, especialmente con respecto a su concentración excesivamente alta de polisacárido y/o la posible presencia de residuos de agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional, o alternativamente de sus condiciones fisiológicas y/o de pH que sean incompatibles con el uso en los campos de aplicación considerados anteriormente.

Además, el gel obtenido después del procedimiento de la invención puede tener especialmente una rigidez que es demasiado alta para que sea inyectado en forma no modificada en un paciente.

Por consiguiente, se pueden realizar varias etapas adicionales, conocidas por los expertos en la técnica, para obtener un hidrogel inyectable.

Más particularmente, se puede requerir una etapa de neutralización y dilución de este gel a fin de dotarle de sus cualidades como implante. Estas etapas hacen posible llevar el gel reticulado hasta una concentración de sal fisiológicamente aceptable y un pH fisiológicamente aceptable.

A continuación, las cadenas de la red del polisacárido se estiran y se hidratan, mientras que el pH se lleva hasta un valor cercano a la neutralidad.

Estas etapas se encuentran claramente dentro de las competencias generales de un experto en la técnica.

Para una pureza mejorada adicionalmente, especialmente para retirar los residuos de agente o agentes de reticulación no ligados al polisacárido o los polisacáridos, también se puede realizar al menos una etapa de purificación.

Ventajosamente, esta etapa de purificación se puede realizar a través de uno o más baños de diálisis.

Finalmente, el hidrogel así obtenido se puede cargar en jeringas bajo condiciones de atmósfera controlada, sometiéndose posiblemente dichas jeringas a una etapa de esterilización, preferiblemente térmicamente.

A lo largo de la descripción, incluyendo las reivindicaciones, se debe entender que el término "que comprende un" es sinónimo a "que comprende al menos un", a menos que se especifique otra cosa.

Se debe entender que los términos "entre... y..." y "que varía de... a..." incluyen los límites, a menos que se especifique otra cosa.
Los ejemplos que siguen se presentan como ilustraciones no limitativas de la invención.

Para cada uno de los ejemplos posteriores, a menos que se indique otra cosa, los porcentajes expresados son porcentajes en masa.

PROTOCOLOS

1) Procedimiento para preparar un gel de ácido hialurónico reticulado

El procedimiento para preparar todos los geles descritos en los ejemplos posteriores es como sigue:

a) Se introducen 10 g de NaHA en una solución acuosa de hidróxido sódico al 1%, a fin de obtener una solución homogénea final (es decir después de la etapa c) posterior) que contiene 12% de NaHA,

b) la solución de reticulación (= BDDE diluido hasta 20% en solución acuosa de hidróxido sódico al 1%, cuando sea apropiado en presencia de un **compuesto A** cuya naturaleza y cantidad se especifican en cada uno de los ejemplos) se añade a la mezcla procedente de la etapa a). La cantidad de esta solución incorporada se ajusta según las relaciones molares deseadas $\mathbf{R_{BDDE} = n_{BDDE}/n_{HA}}$, y $\mathbf{R_A} = \mathbf{n_A/n_{HA}}$, según se indica en cada uno de los ejemplos,

c) la mezcla así formada (es decir obtenida después de la etapa b)) se homogeneiza hasta que el HA se haya disuelto totalmente (es decir hasta que no esté presente aglomerado y se obtenga un color uniforme),

d) la mezcla homogénea obtenida después de la etapa c) se **reticula bajo las condiciones** descritas en cada uno de los ejemplos,

e) después de la reacción de reticulación, el material obtenido se neutraliza al añadir HCl y se diluye en solución salina tamponada con fosfato de pH 7,3 a fin de obtener un hidrogel con la concentración deseada de HA (= **[HA] en mg/g,** según se especifica en cada uno de los ejemplos),

f) a continuación, el hidrogel obtenido se purifica mediante diálisis, según los conocimientos de un experto en la técnica,

g) según los ejemplos, una solución de HA no reticulado, opcionalmente, se incorpora y se homogeneiza con el hidrogel purificado de HA reticulado obtenido después de la etapa f) (expresado como **% de** $\mathbf{HA_{no\ reticulado}/HA_{no\ reticulado\ +\ reticulado}}$, según se especifica en cada uno de los ejemplos), y

h) a continuación, el hidrogel se introduce en jeringas que a continuación se esterilizan en un autoclave (calor húmedo) a T° ≥ 121°C, a fin de obtener un F0 > 15 (valor de esterilización).

2) Propiedades viscoelásticas de los geles probados (es decir módulo elástico G', ángulo de fase δ, resistencia a la compresión, fuerza de inyección y resistencia a la degradación)

Las propiedades viscoelásticas de los geles se caracterizan en reología oscilatoria con barrido de deformación, al medir su **módulo elástico G'** (en Pa) y su **ángulo de fase δ** (°), medido a 1 Hz para un estrés de 5 Pa.

Más precisamente, estas medidas se realizan a 25°C a una frecuencia 1 Hz, con un barrido de estrés usando un reómetro Thermo Haake RS6000 con una geometría de cono-placa de 1°/35 mm de diámetro. G' y δ se registran con un estrés de deformación aplicado de 5 Pa, es decir en el intervalo viscoelástico en el que G' y δ permanecen estables (es decir en el intervalo viscoelástico lineal).

El **módulo elástico G',** o módulo de almacenamiento, mide la energía restaurada por el gel cuando se somete a deformación débil. Se puede suponer que esta magnitud es la rigidez de un muelle.

El **ángulo de fase δ** caracteriza el grado de viscoelasticidad de un material: varía entre 0° para un material elástico al 100% (toda la energía de deformación es restaurada por el material, es decir recupera su conformación inicial) y 90° para un material viscoso al 100% (toda la energía de deformación es perdida por el material, es decir fluye y pierde totalmente su conformación inicial). Un gel de relleno cutáneo debe ser predominantemente elástico para asegurar sus propiedades de relleno, es decir δ debe ser < 45°.

También se mide la **resistencia a la compresión**, que corresponde a la resistencia media de un gel cuando se comprime entre dos placas. Esta magnitud se mide a 25°C, con 2,5 g del gel situados entre dos placas circulares de 35 mm de diámetro, con un hueco inicial de 10 mm. Una compresión de 70% de la altura del hueco se aplica a una velocidad de 0,1 mm/s. La resistencia a la compresión es la integración a lo largo del tiempo de la fuerza de resistencia del gel, y se expresa así en N.s.

Finalmente, la **fuerza de inyección** de los geles se mide en una jeringa (formato de 1 ml de longitud) con agujas de paredes delgadas 27G1/2, usando un banco de compresión a una velocidad de descenso de 12,5 mm/min.

La **resistencia a la degradación** se evalúa mediante la pérdida de módulo elástico G':

- entre antes y después de la esterilización: esta pérdida refleja la degradación mediada térmicamente; y

- después de la esterilización, a través de degradación mediante incubación con H_2O_2: esta pérdida refleja la degradación mediada por estrés oxidativo (adición de 67 µl de solución de H_2O_2 al 10% a 2 g de gel seguida por homogeneización del medio y a continuación incubación durante 24 horas a 37°C). Se toma una medida del G' antes de la degradación y después de la incubación durante 24 horas a 37°C en presencia de la solución de H_2O_2.

El G' se mide según el susodicho protocolo. Puesto que este G' resulta de la diferencia observada entre dos momentos diferentes, se expresa como un porcentaje (%).

Ejemplos

Ejemplo 1: efecto de una sal de fosfato (STMP)

Se preparan tres geles de ácido hialurónico reticulados 1b, 1c y 1d, reticulados en presencia de diferentes concentraciones de trimetafosfato sódico (SMTP) como compuesto A, según el susodicho procedimiento.

El gel 1a está libre de STMP y así es el control. También se prepara según el susodicho procedimiento.

La Tabla 1 posterior detalla la naturaleza y las cantidades de los compuestos usados.

Tabla 1

Parámetros	**R_A**	**R_{BDDE}**	**Reticulación (en horas y en °C)**	**[HA] (mg/g)**	$\%\frac{HA_{no\ reticulado}}{HA_{no\ reticulado-reticulado}}$
1a (comparativo)	0	0,02	72 horas a 21±2°C (BDDE + STMP)	23	10%
1b (invención)	0,03				
1c (invención)	0,06				
1d (invención)	0,09				

Las propiedades viscoelásticas de los geles 1a, 1b, 1c y 1d, medidas según los susodichos protocolos, se presentan en la Tabla 2 posteriormente.

Tabla 2

	G' (en Pa)	**δ (en °)**	**Resistencia a la compresión (en N.s.)**	**Fuerza de inyección (en N)**
1a (comparativo)	**14**	**50,9**	3,1	10,3
1b (invención)	**36**	**37,9**	6,4	12,5
1c (invención)	**49**	**33,9**	10,3	14,0
1d (invención)	**54**	**31,8**	14,8	14,8

El gel 1a (control) no es adecuado para propiedades de relleno de arrugas, puesto que su ángulo de fase δ es mayor de 45°. En otras palabras, la cantidad de agente de reticulación usada es demasiado baja para obtener un gel reticulado que sea satisfactorio en cuanto al relleno de arrugas.

Por otra parte, los geles 1b, 1c y 1d según la presente invención, aunque fabricados con la misma cantidad de BDDE, tienen un ángulo δ de menos de 45° y así son satisfactorios con respecto al relleno de arrugas.

Este efecto se asocia con la presencia de STMP en el sistema de reticulación. Es más, se observa que cuanto más se incrementa la cantidad de STMP, más se incrementa la parte de elasticidad del gel (es decir, disminución en δ), y más se incrementa el módulo elástico.

El incremento en la cantidad de STMP entre los geles 1b, 1c y 1d según la invención también está acompañado por un incremento en la resistencia a la compresión, revelando así geles que son crecientemente consistentes y resistentes a la deformación.

Las propiedades de resistencia a la degradación de los geles 1a, 1b, 1c y 1d, medida según los susodichos protocolos, se presentan en la Tabla 3 posterior.

Tabla 3

	Pérdida de G' después de la esterilización (%)	**Pérdida de G' después del estrés oxidativo (%)**
1a (comparativo)	43	89
1b (invención)	14	65
1c (invención)	9	65
1d (invención)	19	48

Grado de modificación

A continuación, los geles 1a y 1d se evalúan con respecto al grado de modificación de ácido hialurónico. A este fin, los geles 1a y 1d se lavan/precipitan usando isopropanol. Los sólidos obtenidos se secan y a continuación se disuelven en D_2O, y se tratan en presencia de hialuronidasa (tipo VI-S, Sigma, 3kU) en 1 ml de D_2O para la degradación del gel, a fin de obtener una matriz líquida para el análisis. A continuación, cada mezcla homogénea obtenida se analiza mediante ^1H NMR.

Protocolo para medir el grado de modificación

La caracterización del grado de modificación se realiza mediante espectroscopía de NMR. El grado de modificación se obtiene al aplicar el método desarrollado por L. Nord y cols. sobre muestras de HA reticulado con BDDE. El grado de modificación se obtiene al integrar la señal de 1H NMR del grupo N-acetilo (δ ≈ 2 ppm) presente en los HAs y una señal presente en el agente de reticulación (dos grupos -CH2-, δ ≈ 1,6 ppm). La relación de las integrales

$$MoD = \frac{\left[\frac{\text{Integral } \delta_H 1{,}6}{4}\right]}{\left[\frac{\text{Integral } \delta_H 2{,}0}{3}\right]}$$

de estas dos señales (agente de reticulación/NAc HA) corresponde al **grado de modificación,** después de la corrección para el número de protones asociados con cada señal.

El análisis de NMR se realiza en un espectrómetro Brüker Avance 1 que funciona a 400 MHz (^1H).

Los grados de modificación medidos según el protocolo anterior para los geles 1a y 1d se presentan en la tabla posterior.

GEL	**Grado de modificación**
1a (comparativo)	1,4%
1d (invención)	1,4%

Se realizó el mismo tipo de análisis de NMR, pero realizado mediante NMR de fósforo (^{31}P NMR). A este respecto, la referencia primaria en ^{31}P NMR es ácido fosfórico acuoso al 58% (δ = 0 ppm). Este análisis de NMR se realizó en un espectrómetro Brüker Avance 1 que funciona a 400 MHz (^1H) y 161,97 MHz (^{31}P).

Este análisis no hacía posible revelar ninguna ligazón entre el ácido hialurónico y una especie fosforilada derivada de STMP.

Así, el uso de STMP en presencia de BDDE para realizar la reacción de reticulación hace posible obtener geles reticulados con propiedades de relleno satisfactorias (propiedades mecánicas y resistencia a la degradación), no pudiendo conseguirse estas propiedades, sin embargo, a la relación molar (nBDDE/nHA) considerada.
Es más, este efecto del STMP se produce sin incrementar el grado de modificación del ácido hialurónico (HA).

Ejemplo 2: confirmación del efecto de una sal de fosfato (STMP) sobre geles más reticulados (es decir r_{BDDE} mayor que el del Ejemplo 1)

Se preparan tres geles de ácido hialurónico reticulados 3b, 3c y 3d que comprenden el uso de diferentes concentraciones de STMP como compuesto A, según el susodicho procedimiento.

El gel 3a está libre de STMP y así es el control. También se prepara según el susodicho procedimiento.

La Tabla 4 posterior detalla la naturaleza y las cantidades de los compuestos usados.

Tabla 4

Parámetros	**R_A**	**R_{BDDE}**	**Reticulación**	**[HA] (en mg/g)**	$\%\frac{HA_{no\ reticulado}}{HA_{no\ reticulado-reticulado}}$
3a (comparativo)	0	0,04	72 horas a 21±2°C (BDDE + STMP)	18	10%
3b (invención)	0,02				
3c (invención)	0,04				
3d (invención)	0,06				

Las propiedades viscoelásticas de los geles 3a, 3b, 3c y 3d, medidas según los susodichos protocolos, se presentan en la Tabla 5 posterior.

Tabla 5

	G' (en Pa)	**δ (en °)**	**Resistencia a la compresión (en N.s.)**	**Fuerza de inyección (en N)**
3a (comparativo)	**96**	**16,2**	16,4	12,4
3b (invención)	**107**	**15,3**	17,4	11,3
3c (invención)	**117**	**14,0**	18,0	10,8
3d (invención)	**197**	**10,8**	20,2	9,5

A pesar de una concentración de HA inferior a la usada en el Ejemplo 1, el gel 3a tiene propiedades satisfactorias para la función de relleno de arrugas, con un ángulo de fase δ de menos de 45° y propiedades mecánicas muy superiores. Este incremento en las propiedades mecánicas está asociado con la cantidad de BDDE usada (R_{BDDE} = 0,04) que es mayor que la del Ejemplo 1. La cantidad de agente de reticulación de BDDE usada en este gel 3a es así satisfactoria para obtener un gel que sea eficaz en cuanto al relleno de arrugas.

Los geles 3b, 3c y 3d según la presente invención tienen propiedades mecánicas superiores a las del gel 3a de control. Este efecto se asocia con la presencia de STMP en combinación con el BDDE. Cuanto más se incrementa la cantidad de STMP, mayor es el incremento en las propiedades mecánicas. Así, el gel 3d tiene un módulo elástico G' más de 2 veces superior al del gel 3a de control.

La resistencia a la compresión también se incrementa con la cantidad de STMP usada.

Finalmente, es interesante apuntar que la fuerza de inyección tiene una tendencia a disminuir con los geles 3b, 3c y 3d según la presente invención; en todos los casos, la fuerza de inyección es menor que la obtenida en el Ejemplo 1, en virtud del uso de una concentración inferior de HA. Por lo tanto, la mejora en las propiedades mecánicas de un gel reticulado según un procedimiento según la invención no tiene lugar a costa de la fuerza de inyección para un grado de reticulación habitual.

Las propiedades de resistencia a la degradación de los geles 3a, 3b, 3c y 3d, medidas según los susodichos protocolos, se presentan en la Tabla 6 posterior.

Tabla 6

	Pérdida de G' después de la esterilización (%)	Pérdida de G' después del estrés oxidativo (%)
3a (comparativo)	40	73
3b (invención)	15	47
3c (invención)	18	45
3d (invención)	15	30

Los geles 3b, 3c y 3d reticulados en presencia de STMP muestran una resistencia a la degradación muy superior que la del gel 3a reticulado sin STMP. El gel 3d es el más resistente, con una pérdida de módulo elástico G' relativa mínima.

Ejemplo 3: efecto de diferentes sales de fosfato

A diferencia del trimetafosfato sódico (STMP) que es cíclico, el trifosfato sódico (STPP) es una sal de fosfato lineal. El STMP y el STPP son ambos trifosfatos, y la cantidad probada es así R_A = 0,06, para comparación con el gel 3d del Ejemplo 2, idéntico pero sin STMP.

A diferencia del STMP y STPP que son trifosfatos, el fosfato sódico (SP) es un monofosfato. La cantidad probada es siempre R_A=0,06 para el gel 4c.

Así, se preparan tres geles de ácido hialurónico reticulados 3d, 4b y 4c que comprenden el uso de trimetafosfato sódico (STMP), trifosfato sódico (STPP) o fosfato sódico (SP) como compuesto A, según el susodicho procedimiento. Los geles 4b y 4c no son según la invención que se reivindica.

El gel 3a, que está libre de sal de fosfato, es así el control. También se prepara según el susodicho procedimiento. Los geles 3a y 3d son los del Ejemplo 2.

La Tabla 7 posterior detalla la naturaleza y las cantidades de los compuestos usados.

Tabla 7

Parámetros	A	R_A	R_{BDDE}	Reticulación	[HA] (mg/g)	$\% \frac{HA_{no\ reticulado}}{HA_{no\ reticulado-reticulado}}$
3a (comparativo)	/	0	0,04	72 horas a 21±2°C (BDDE + STMP)	18	10%
3d (invención)	STMP	0,06				
4b	STPP	0,06				
4c	SP	0,06				

Las propiedades viscoelásticas de los geles 3a, 3d, 4b y 4c, medidas según los susodichos protocolos, se presentan en la Tabla 8 posterior.

Tabla 8

	G' (Pa)	δ (°)	Resistencia a la compresión (en N.s.)	Fuerza de inyección (en N)
3a (comparativo)	**96**	**16,2**	16,4	12,4
3d (invención)	**197**	**10,8**	20,2	9,5
4b	**123**	**12,0**	16,8	10,6
4c	**106**	**16,4**	16,6	9,3

Las propiedades mecánicas de los geles 4b y 4c siguen siendo mejores que las del gel 3a de control libre de sal de fosfato. Así, el STPP y el SP también tienen un efecto ventajoso con respecto a las propiedades viscoelásticas.

Las propiedades de resistencia a la degradación de los geles 3a, 3d, 4b y 4c, medidas según los susodichos protocolos, se presentan en la Tabla 9 posterior.

Tabla 9

	Pérdida de G' después de la esterilización (%)	Pérdida de G' después del estrés oxidativo (%)
3a (comparativo)	40	73
3d (invención)	15	30
4b	16	29
4c	31	62

Como para el gel 3d reticulado en presencia de STMP, la resistencia a la degradación se mejora para los geles 4d reticulados en presencia de STPP, y para el gel 4c reticulado en presencia de SP.

El uso de STPP o SP en presencia de BDDE en el medio de reticulación también hace posible obtener un efecto ventajoso sobre las propiedades mecánicas. La resistencia a la degradación también se mejora con el uso de estas sales de fosfato STPP y SP.

Ejemplo 4: demostración de un efecto sinérgico de una sal de fosfato (STMP) usada durante la reticulación con BDDE

Se preparan cuatro geles de ácido hialurónico reticulados 5a, 5b, 5c y 5d, que comprenden el uso de BDDE y STMP como compuesto A, según el susodicho procedimiento.

El gel 5a es según la presente invención ya que se obtiene después de una etapa de reticulación en presencia simultánea de BDDE y STMP.

Los geles 5b, 5c y 5d no son según la presente invención ya que se obtienen después de una etapa de reticulación disociada. Específicamente, el BDDE y el STMP se integraban secuencialmente y con un intervalo de tiempo significativo con respecto a la reticulación.

La Tabla 10 posterior detalla la naturaleza y las cantidades de los compuestos usados.

Tabla 10

Parámetros	R_A	R_{BDDE}	**Reticulación** a 21±2°C	**[HA], mg/g**	$\%\frac{HA_{no\ reticulado}}{HA_{no\ reticulado-reticulado}}$
5a (invención)	0,06	0,04	72 horas STMP+BDDE	18	0
5b (comparativo)			72 horas STMP y a continuación 72 horas BDDE		
5c (comparativo)			24 horas STMP y a continuación 72 horas BDDE		
5d (comparativo)			72 horas BDDE y a continuación STMP añadido después de la reticulación		

Las propiedades viscoelásticas de los geles 5a, 5b, 5c y 5d, medidas según los susodichos protocolos, se presentan en la Tabla 11 posterior.

Tabla 11

	G' (Pa)	δ (°)	Resistencia a la compresión (N.s.)	Fuerza de inyección (N)
5a (invención)	**136**	**9,6**	22,6	38,0
5b (comparativo)	**17**	**18,5**	3,2	11,5
5c (comparativo)	**87**	**13,5**	17,7	31,8
5d (comparativo)	**76**	**13,7**	17,8	34,9

El gel 5a según la invención tiene propiedades reológicas óptimas, en virtud de la reticulación realizada con BDDE en presencia de STMP.

Si se incorpora la misma cantidad de STMP después de la reticulación con BDDE, ya no se observa el efecto sobre las propiedades mecánicas: así, el gel 5d tiene propiedades mecánicas significativamente inferiores.

Adicionalmente, no hay mejora en las propiedades mecánicas del gel si se incorpora STMP en el HA 24 horas antes de la adición de BDDE (gel 5c), e incluso hay una degradación de las propiedades mecánicas del gel si se añade STMP 72 horas antes de la adición de BDDE (gel 5b).

En otras palabras, estos resultados demuestran que el efecto de la reacción {STMP + BDDE} no es equivalente a {STMP} + {BDDE}; así, hay un efecto sinérgico cuando la reacción de reticulación de HA se efectúa a través de una combinación no disociada entre el BDDE y el STMP.

Ejemplo 5: Efecto de STMP con condiciones de reticulación más rápidas

Se preparan tres geles de ácido hialurónico 6a, 6b y 6c que comprenden el uso de BDDE solo (es decir 6a) o con STMP como compuesto A (es decir 6b y 6c), según el susodicho procedimiento.

La Tabla 12 posterior detalla la naturaleza y las cantidades de los compuestos usados.

Tabla 12

Parámetros	**R_A**	**R_{BDDE}**	**Reticulación**	**[HA], mg/g**	$\%\frac{HA_{no\ reticulado}}{HA_{no\ reticulado-reticulado}}$
6a (comparativo)	0	0,15	3 horas at 52±2°C (BDDE + STMP)	20	10%
6b (invención)	0,06				
6c (invención)	0,15				

Este modo de reticulación mediada térmicamente (52°C) es interesante ya que es más rápida que a temperatura ambiente.

Las propiedades viscoelásticas de los geles 6a, 6b y 6c, medidas según los susodichos protocolos, se presentan en la Tabla 13 posterior.

Tabla 13

	G' (Pa)	**δ (°)**	**Resistencia a la compresión (N.s.)**	**Fuerza de inyección (N)**
6a (comparativo)	**217**	**10,5**	18,1	10,1
6b (invención)	**299**	**10,2**	19,0	11,1
6c (invención)	**426**	**9,5**	18,9	10,2

También en este caso, se observa un incremento en el módulo elástico G' cuando la reticulación se realiza en presencia de la sal de fosfato (STMP).

Ejemplo 6: Comparación de STMP frente a NaCl

Se prepararon cuatro geles reticulados de ácido hialurónico 7a, 7b, 7c y 7d que comprenden el uso de BDDE solo (es decir 7a), con STMP como compuesto A (es decir 7b), o con NaCl como compuesto A (es decir 7c y 7d), según el protocolo anterior.

El gel 7a carece de STMP y NaCl y por lo tanto es la referencia.

Tabla 14

Parámetros	**A**	**R_A**	**R_{BDDE}**	**Reticulación**	**[HA], mg/g**	$\%\frac{HA_{no\ reticulado}}{HA_{no\ reticulado-reticulado}}$
7a (referencia)	/	0	0,02	72 H at 21±2°C (BDDE + A)	23	10 %
7b (invención)	STMP	0,06				
7c (comparativo)	NaCl	0,18				
7d (comparativo)	NaCl	1,5				

Puesto que el SMTP es una sal trivalente y el NaCl una sal monovalente, el gel 7c se elaboró con una cantidad de NaCl correspondiente a 3 veces la del gel 7b. El gel 7d se fabrica con una cantidad mayor de NaCl (R_A = 1,5),

correspondiente a una concentración másica de NaCl en el medio de reticulación de 3%, según se describe en el documento FR 2 997 085.

Las propiedades viscoelásticas de los geles 7a, 7b, 7c et 7d, medidas según los protocolos descritos anteriormente, se dan en la Tabla 15.

Tabla 15

	G' (en Pa)	δ (en °)	Resistencia a la compresión (N.s.)	Fuerza de inyección (N)
7a (referencia)	**14**	**50,9**	3,1	10,3
7b (invención)	**49**	**33,9**	10,3	14,0
7c (comparativo)	**23**	**45,7**	3,2	9,4
7d (comparativo)	**6,3**	**63,0**	1,1	8,3

Al contrario que el gel 7b según la invención, el gel 7a de referencia y los geles 7c y 7d comparativos no eran adecuados para rellenar arrugas debido a que su ángulo de fase δ es mayor de 45°.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar un gel reticulado de al menos un polisacárido o una de sus sales, que comprende al menos las etapas que consisten en:

a) proporcionar una solución formada a partir de un medio acuoso que comprende al menos dicho polisacárido o polisacáridos o una de sus sales en una forma no reticulada, al menos un agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional elegido de éter diglicidílico de butanodiol, diepoxioctano o 1,2-bis-(2,3-epoxipropil)-2,3-etileno, y sus mezclas, y al menos trimetafosfato sódico;

b) reticular la solución procedente de la etapa a) y, cuando sea apropiado;

c) recuperar dicho gel reticulado formado.

2. Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por que también comprende al menos una etapa d) de homogeneización de la solución procedente de la etapa a), realizándose esta etapa antes de y/o simultáneamente con la etapa de reticulación b), preferiblemente antes de la etapa de reticulación b).

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la etapa de reticulación b) se realiza a una temperatura por debajo de 35°C, preferiblemente a una temperatura que varía de 15 a 25°C y mejor aún de 19 a 23°C.

4. Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por que la etapa de reticulación b) se realiza a lo largo de un período de entre 5 horas y 336 horas, preferiblemente entre 20 horas y 150 horas y mejor aún entre 40 horas y 100 horas.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el agente de reticulación epoxídico difuncional o multifuncional es éter diglicidílico de butanodiol.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el polisacárido es ácido hialurónico o una de sus sales, preferiblemente hialuronato sódico.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la sal de ácido hialurónico se elige de la sal sódica, la sal potásica, la sal de cinc, la sal de plata y sus mezclas, preferiblemente la sal sódica.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la solución procedente de la etapa a) comprende una relación de "número de moles de sal o sales de fosfato/número total de moles de unidades de polisacárido" de entre 0,005 y 1, preferiblemente entre 0,01 y 0,25.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la solución procedente de la etapa a) comprende una relación molar de "número de moles de agente o agentes de reticulación epoxídicos difuncionales o multifuncionales/número total de moles de unidades de polisacárido" de entre 0,005 y 1, preferiblemente entre 0,01 y 0,25.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicho procedimiento también comprende una etapa e) que consiste en añadir al menos un polisacárido no reticulado, preferiblemente ácido hialurónico no reticulado, realizándose esta etapa e) antes de, simultáneamente con o posteriormente a la etapa de recuperación c), pero necesariamente después de la etapa b).

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el polisacárido o los polisacáridos reticulados incluidos en el gel reticulado tienen un grado de modificación de menos de 10%, preferiblemente entre 0,1% y 5%, mejor aún entre 0,4% y 2,5%, o incluso entre 0,7% y 1,6%.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el gel reticulado tiene un módulo elástico (G') de entre 20 y 1000 Pa, preferiblemente entre 35 Pa y 400 Pa, asociado con un ángulo de fase (δ) de menos de 45°.

13. Composición dermatológica inyectable y estéril que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento que se define según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Composición cosmética o dermatológica que comprende al menos un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento que se define según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Estuche que comprende:

- un envase que contiene al menos una dosis de un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento que se define según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una composición que se define en la reivindicación 13 o 14; y

- un dispositivo para inyección en o a través de la piel o un dispositivo de microperforación de la piel, destinado a administrar dicha dosis.

16. Uso de un gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento como el definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para rellenar defectos del volumen de la piel, y especialmente rellenar arrugas.

17. Gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento como el definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso para tratar deficiencias gingivales, en particular enfermedades periodontales y trastornos asociados.

18. Gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento como el definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso para viscocomplementación articular.

19. Gel reticulado obtenido al realizar un procedimiento como el definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso para tratar trastornos oftálmicos, especialmente para extraer cataratas y para insertar y retirar lentes intraoculares (IOL).