

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 827**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/722** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016 PCT/FR2016/050953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170284**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016 E 16721203 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3285781**

54 Título: **Solución acuosa homogénea de quitosán inyectable que presenta un pH próximo al pH fisiológico**

30 Prioridad:

**23.04.2015 FR 1553644**

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

**15.07.2020**

73 Titular/es:

**BIOXIS PHARMACEUTICALS (100.0%)  
317 Avenue Jean Jaurès  
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**GUERRY, ALEXANDRE y  
BERTAINA, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 773 827 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 quitosán inyectable que presenta un pH próximo al pH fisiológico

**5 Sector de la técnica**

La presente invención se refiere al campo de los rellenos o biomateriales, inyectables en seres humanos o animales. En particular, la presente invención se refiere a una solución acuosa homogénea de quitosán inyectable que presenta un pH lo más cercano posible al pH fisiológico (pH=7). La presente invención se refiere también a composiciones que contienen dicha solución acuosa homogénea de quitosán. La invención también tiene por objeto dichas composiciones para usar como una composición dermatológica, cosmético o bien como un dispositivo médico, ventajosamente como un implante bioabsorbible.

**15 Estado de la técnica**

Ya se conocen diferentes productos de rellenos inyectables, en especial en seres humanos.

El colágeno ha sido durante mucho tiempo el producto elegido como un producto de relleno para la cara, en particular para rellenar arrugas y líneas de expresión o incluso para aumentar los labios. Sin embargo, desde la comercialización de los ácidos hialurónicos, estos últimos son los más usados. De hecho, a la biodegradabilidad del colágeno considerada demasiado rápida, se añaden los problemas de seguridad relacionados con el origen animal (bovino o porcino) de este.

La inyección directa de ácido hialurónico tiene dos ventajas: un efecto de relleno mecánico inmediato y una ausencia de fenómenos inflamatorios, debido a su biocompatibilidad. Sin embargo, esta biocompatibilidad va acompañada de una rápida biodegradación que hace que el producto sea insatisfactorio, incluso aunque se ha podido prolongar la vida útil del producto inyectado gracias al uso de ácido hialurónico reticulado.

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

Todavía se encuentran en el mercado productos de relleno que se pueden describir como "permanentes" en el sentido de que su biorreabsorción puede necesitar varios años. Estos productos contienen, entre otros, polímeros sintéticos o biosintéticos, tales como derivados acrílicos, poliacrilamidas, que inducen una importante encapsulación fibrosa en el comienzo de la durabilidad del relleno. Sin embargo, 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, o incluso años, después de su inyección. Otros productos constituyen hoy en día una alternativa interesante: se trata del PLA (poli(ácido láctico)), un polímero cuya biodegradación es más lenta que la de otros polímeros naturales, tales como el colágeno o el ácido hialurónico. Se estima de hecho que el relleno perdura hasta dos años después de la inyección. Estos productos se comercializan en concreto bajo el nombre de New-Fill (o Sculptra). El principal defecto de esta tecnología es que el efecto de relleno es visible solo después de un período de ocho semanas, lo que no aporta una satisfacción completa al paciente.

Además, la fibrosis observada cuando se usaban productos no degradables parece ser de gran interés en términos de efecto estético a largo plazo, y es así como se han desarrollado los productos de relleno calificados de "semipermanentes", que por su composición heterogénea de "partículas-vector", tienen un efecto pro-fibrótico mientras que siguen siendo biodegradables. Cabe mencionar, 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 hidroxapatita de calcio en un gel de carboximetilcelulosa. En todos los casos, el gel portador garantiza el efecto estético del relleno inmediato, mientras que las partículas generan gradualmente una fibrosis que garantiza el efecto a largo plazo. El interés de estos productos, además de su doble mecanismo de acción (mecánico e inductor del tejido), es que finalmente son totalmente reabsorbidos.

De forma particularmente ventajosa, el quitosán, por su estructura química única, se comporta frente al cuerpo como un "señuelo" del medio biológico (A. Montebault, K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M. Corvol, A. Domard, *Biochimie*, 88 (2006), 551-64): por un lado, es "reconocido" suficientemente como para no inducir una reacción inflamatoria peligrosa y, por otro lado, suficientemente "desconocido" para no ser degradado demasiado rápidamente. La molécula está constituida de hecho por una sucesión de fragmentos de N-acetil-D-Glucosamina y D-glucosamina, al ser el primero un constituyente de las moléculas de la matriz extracelular (se encuentra este resto en el ácido hialurónico, por ejemplo), y el último estar completamente ausente de la misma, el quitosán es por lo tanto más difícil de degradar desde el punto de vista biológico.

El concepto de usar un "señuelo" del medio biológico es totalmente nuevo en el campo de los productos inyectables, en particular en medicina estética, y hasta la fecha no se comercializa ningún producto de relleno que contenga quitosán.

Además, el quitosán es conocido en la bibliografía por estimular ciertas células del sistema inmunitario, tales como macrófagos, que producen en su presencia una mayor cantidad de factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento son mediadores biológicos que favorecen la producción de matriz extracelular y la proliferación de fibroblastos, células que producen fibras de colágeno. Así pues, el quitosán favorece la síntesis de tejido fibroso, lo que permite un relleno "biológico" a largo plazo y sin efectos secundarios indeseables, la constitución o sustitución de tejidos biológicos o el relleno de tejidos biológicos, por ejemplo, el relleno de depresión cutánea, inyección en los cartílagos óseos o en las articulaciones).

La solicitud internacional WO 2013/079646, presentada por el solicitante, propone en particular una solución acuosa homogénea de quitosán inyectable que contiene un quitosán que tiene un grado de acetilación menor de 20%, dicha solución acuosa presenta un pH inferior a 6,2. Estas formulaciones presentan muy buenos resultados y buenas propiedades de inyectabilidad a estos pH inferiores a 6,2. Sin embargo, como se explica en esta solicitud, es necesario mantener un pH inferior a 6,2 para evitar la gelificación de estas soluciones. De hecho, un quitosán que presenta un grado de acetilación menor de 20% tal como el usado en estas formulaciones inyectables es sensible al pH y tiene la particularidad de ser soluble en forma líquida en solución acuosa a pH inferiores a 6,2, pero gelifica por encima de un pH de 6,2.

Sin embargo, cuando se desea inyectar una solución de quitosán directamente en los tejidos que se encuentran a un pH fisiológico (entre 6,8 y 7,4), sería deseable usar una solución que presentara un pH lo más cercano posible al pH fisiológico con el fin de evitar la necrosis tisular debido a la acidez de la formulación inyectada.

El documento WO 2009/150651 propone formular composiciones basadas en quitosán cuyo pH es cercano al pH fisiológico combinando, en un hidrogel inyectable, un quitosán altamente acetilado soluble a pH fisiológico, con un quitosán altamente desacetilado que precipita a un pH de aproximadamente 6,5 para obtener una mezcla de quitosanos de diferentes grados de acetilación, permaneciendo dicha mezcla sin precipitar a un pH superior a 6,5. Sin embargo, estos hidrogeles de textura gelificada presentan, debido a su mayor viscosidad, malas propiedades de inyectabilidad (o jeringabilidad, es decir, facilidad de inyección debido a un flujo más o menos satisfactorio a través de una aguja en una jeringa) con respecto a composiciones en forma líquida no gelificada. Además, la mezcla de dos quitosanos de diferentes grados de acetilación no es fácil de implementar y puede presentar problemas de homogeneidad de los hidrogeles obtenidos.

La solicitud WO03/042250 propone modificar químicamente por reticulación de los quitosanos en solución que presentan un pH del orden de 6,8, dichas soluciones que se preparan y mantienen en forma líquida a temperaturas muy bajas (4°C), para permitir su gelificación a 37°C. Por lo tanto, por un lado es la modificación química del quitosán y, por otro lado, un aumento de temperatura lo que permite controlar la gelificación de las soluciones a 37°C. Sin embargo, en el contexto de esta solicitud, las soluciones neutras de quitosán solo se puede obtener manteniendo las soluciones a una temperatura muy baja (del orden de 4 a 5°C) y usando un tampón de tipo glicerofosfato, conocido por aumentar la solubilidad de los quitosanos en agua y dar a la solución de quitosán propiedades termogelificantes. Sin embargo, el glicerofosfato puede causar problemas de intolerancia, en especial cuando se inyecta en tejidos biológicos. Además, las soluciones líquidas neutras obtenidas según la solicitud WO03/042250 no se pueden ni preparar ni almacenar a temperatura ambiente, lo que genera importantes limitaciones y sobrecostes industriales.

Por lo tanto, sería deseable disponer de formulaciones basadas en quitosán que presenten un pH más cercano al pH fisiológico y que permanezcan líquidos a temperatura ambiente, en particular entre 20 y 25°C, para que sean fácilmente inyectables.

### Objeto de la invención

Por lo tanto, la presente invención tiene por objeto, según un primer aspecto, una solución acuosa homogénea de quitosán inyectable que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación menor de 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, presentando dicha solución un pH mayor o igual a 6,2, ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, no conteniendo dicha solución quitosán que tenga un grado de acetilación mayor que 20%, siendo dicha solución líquida y homogénea a temperatura ambiente.

La invención también tiene por objeto, según un segundo aspecto, una solución acuosa como se ha descrito antes, caracterizada por que se puede preparar por un procedimiento que comprende al menos las siguientes etapas:

- disolución del quitosán en agua por adición de ácido, tal como un ácido débil, para obtener una solución acuosa homogénea de quitosán que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol,, presentando dicha solución un pH inferior a 6,2,

seleccionándose ventajosamente dicho ácido débil del grupo que consiste en ácido acético, ácido glicólico, ácido

láctico, ácido glutámico y sus mezclas, y

- reajuste del pH por diálisis, preferiblemente a temperatura ambiente, para obtener una solución acuosa que presenta un pH mayor o igual a 6,2, ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1.

5 Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para preparar una solución acuosa como se ha descrito antes, que comprende al menos las siguientes etapas:

10 - disolución del quitosán en agua por adición de ácido, tal como un ácido débil, para obtener una solución acuosa homogénea de quitosán que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, presentando dicha solución un pH inferior a 6,2, seleccionándose ventajosamente dicho ácido débil del grupo que consiste en ácido acético, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glutámico y sus mezclas, y

15 - reajuste del pH por diálisis, preferiblemente a temperatura ambiente, para obtener una solución acuosa que presenta un pH mayor o igual a 6,2, ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1.

20 **Descripción detallada de la invención**

Las soluciones acuosas homogéneas de quitosán según la presente invención son estables a la temperatura, en concreto de hasta 40°C, en particular entre 20 y 30°C, y por lo tanto no son termogelificables sino que solo gelifican en el momento del aumento de pH. Por lo tanto, se distinguen también en este aspecto de las formulaciones descritas en la solicitud de patente WO03/042250. La obtención de soluciones estables a la temperatura es particularmente ventajosa para la implementación industrial de las soluciones de la invención y su almacenamiento.

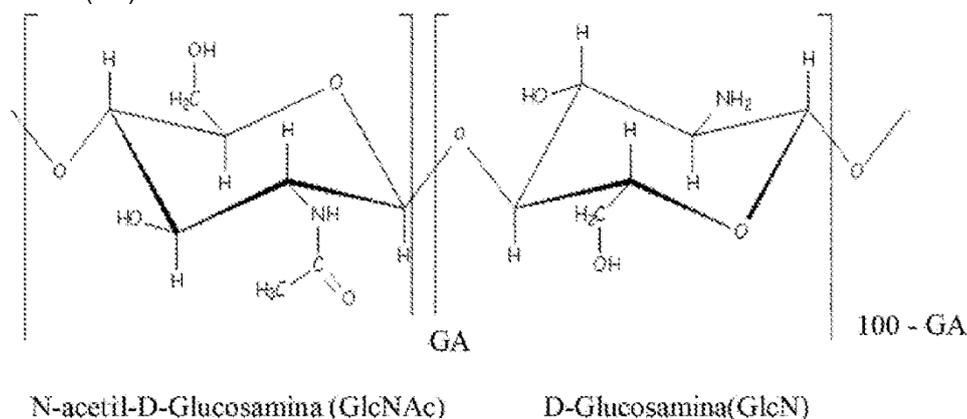
Quitósán

30 Las soluciones acuosas según la invención comprenden al menos un quitosán.

El quitosán es un amino-polisacárido obtenido en general por N-desacetilación de la quitina, polisacárido ampliamente extendido en la biomasa. La quitina está presente en concreto en las cutículas de los artrópodos, endoesqueleto de los cefalópodos, paredes celulares o incluso la matriz extracelular de hongos, levaduras o algas.

35 Ventajosamente según la presente invención, el quitosán es un producto natural que proviene de una fuente animal, por ejemplo, crustáceos de tipo cangrejos, camarones o calamares, o de una fuente vegetal, tal como hongos o algas. El quitosán y la quitina son copolímeros lineales de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa, respectivamente. Se habla más habitualmente de unidades de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y D-Glucosamina (GlcN) unidas por enlaces glucosídicos β-(1→4). La quitina y el quitosán se diferencian por la fracción molar (expresada en %) de unidades de GlcNAc presentes en el copolímero, llamado también grado de acetilación (GA).

Las estructuras químicas del quitosán y la quitina se representan esquemáticamente a continuación dependiendo del grado de acetilación (GA):



Grado de acetilación (DA):

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

con nGlcNAc = número de motivos acetilados y nGlcN = número de motivos desacetilados.

Según la presente invención, el quitosán tiene un grado de acetilación (GA) menor que 20%, preferiblemente menor que 19%, más preferiblemente menor que 17%, todavía más ventajosamente menor o igual a 15%, por ejemplo menor que 10%.

5 Típicamente, el quitosán según la invención tiene un grado de acetilación (GA) comprendido entre 0,5 y 20%, incluso preferiblemente entre 1 y 19%, incluso preferiblemente entre 1 y 17%, más preferiblemente entre 2 y 15% e incluso más preferiblemente entre 2 y 10%.

10 El grado de acetilación se mide preferiblemente según el método descrito en la publicación "Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic médium" A. Montembault, C. Viton, A. Domard, *Biomaterials*, 26(8), 933-943, 2005).

15 El quitosán usado en las soluciones de la invención tiene una masa molecular media ponderada (determinada antes de la esterilización según el método descrito en "Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic médium" A. Montembault, C. Viton, A. Domard, *Biomaterials*, 26 (8), 933-943, 2005) comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, ventajosamente entre 200.000 y 1.000.000 g/mol, más ventajosamente entre 250.000 y 800.000 g/mol, y todavía más ventajosamente entre 300.000 y 600.000 g/mol.

20 Convencionalmente, un quitosán de una masa molar comprendida entre 100.000 y 1.000.000 g.mol<sup>-1</sup> también se puede caracterizar por su viscosidad (convencionalmente en una concentración de 1% en una solución acuosa al 1% en ácido acético a 25°C). Con esta consideración, la masa molar de quitosán también se puede definir por una viscosidad comprendida entre 5 Pa.s y 20 Pa.s.

25 La viscosidad de la composición se mide a 25°C usando un reómetro DHR1 (industria TA) y una geometría plana de 40 mm en un modo dinámico con una velocidad de cizalladura aplicada de 0,01 a 1 s<sup>-1</sup>.

30 Según una realización preferida, el quitosán usado en las soluciones según la invención no está modificado químicamente y, en particular, no está injertado para favorecer su solubilidad en solución acuosa a pH próximos a la neutralidad (entre 6,2 y 7,2). Se distingue en este sentido de los quitosanos usados en la solicitud WO03/042250 o la solicitud JP-H02-69502, en la publicación "Synthesis and characterization of sugar-bearing chitosan derivatives : aqueous solubility and biodegradability", Jae Hyung Park et al., *Biomacromolecules* 2003, 4, 1087-1091, y en la publicación "Water solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH : effect of chemical composition and depolymerization" Varum K. M. et al., *Carbohydrate polymers* 25 (1994), 65-70.

35 Según una característica particular, se puede añadir otro quitosán de menor masa molecular media, ventajosamente inferior a 20.000 g/mol, al quitosán como se ha definido previamente, con la condición de que no se altere la homogeneidad de la solución así obtenida.

40 En esta realización, este otro quitosán se puede presentar en forma de partículas de quitosán reticuladas.

#### Solución

45 La solución acuosa homogénea de quitosán inyectable según la invención contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, un quitosán que tiene un grado de acetilación menor que 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, como se ha descrito previamente.

50 Por "medio fisiológicamente aceptable" se entiende, en el sentido de la presente solicitud, un medio que no presenta ningún riesgo de intolerancia o toxicidad cuando se inyecta en los tejidos biológicos la solución inyectable según la invención. Por lo tanto, el medio fisiológicamente aceptable debe ser en particular inerte y biocompatible con respecto a los tejidos biológicos, tales como músculos, articulaciones, globos oculares y, de forma más general, en tejidos blandos o duros del cuerpo, por ejemplo, los órganos (aparte digestivo o urogenital) o tejidos adiposos, membranas mucosas, encías, cartílagos, huesos ...

55 El pH de la solución acuosa según la presente invención es mayor o igual a 6,2, y ventajosamente está comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1, y más preferiblemente entre 6,3 y 7,0.

60 En el contexto de la invención, el quitosán es soluble en solución acuosa, tal como agua, en los intervalos de pH mencionados previamente, ventajosamente por protonación de los grupos amina del quitosán. Ventajosamente, la solución acuosa según la invención es estable, en particular estable (conservación de sus características reológicas, su color, transparencia y/o claridad a 25°C) en el almacenamiento a temperaturas que van de 4 a 25°C durante al menos 1 mes, preferiblemente al menos 6 meses, y más preferiblemente al menos 24 meses. En otras palabras, incluso después de un almacenamiento durante un período prolongado a temperaturas entre 4 y 25°C, se conservan las características a 25°C (reológicas, su color, transparencia y/o claridad) de la solución acuosa según la invención.

65 Se entiende por "solución" inyectable, en el sentido de la presente invención, una composición que se presenta en

forma líquida, en oposición a una composición gelificada. Por lo tanto, difiere de las composiciones en forma de hidrogeles inyectables basadas en quitosán solubilizado, tales como las descritas en la solicitud de patente WO 2009/150651. Estos hidrogeles de textura gelificada presentan, debido a su mayor viscosidad, propiedades de inyección menos buenas (o jeringabilidad, es decir, facilidad de inyección debido a un flujo más o menos satisfactorio a través de una aguja en una jeringa) que las soluciones líquidas según la invención.

Se entiende por solución "líquida" en el sentido de la presente invención, una composición que fluye bajo su propio peso, en particular después de como máximo 24 horas, preferiblemente como máximo 10 horas, a diferencia de un gel, y en particular un hidrogel.

Las soluciones líquidas según la invención tienen preferiblemente una viscosidad a 25°C menor que 1000 Pa.s, preferiblemente comprendida entre 20 y 800 Pa.s, más preferiblemente entre 50 y 600 Pa.s. A modo de comparación, las formulaciones en forma de hidrogeles en general presentan una viscosidad del orden de 4000 a 10.000 Pa.s.

La viscosidad de la composición se mide a 25°C usando un reómetro DHR1 (industria TA) y una geometría plana de 40 mm en un modo dinámico con una velocidad de cizalladura aplicada de 0,01 a 1 s<sup>-1</sup>.

La diferencia entre las soluciones según la invención y las formulaciones en forma de geles se puede poner de manifiesto en particular midiendo las propiedades reológicas de estas composiciones.

La diferencia gel/solución se realiza en un estudio reológico de oscilación de 0.1 a 100 rad.s<sup>-1</sup> a una frecuencia constante de 1 Hz a 25°C con el fin de determinar los módulos viscosos G'' y el módulo elástico G'.

De hecho, una solución líquida en el sentido de la presente invención se caracteriza en particular por el hecho de que su módulo viscoso G'' es mayor que su módulo elástico G'. En el caso de un gel, por el contrario, el módulo elástico G' es mayor que el módulo viscoso G''. Las mediciones se llevan a cabo en un reómetro DHR2 (industrias TA) y una geometría plana de 40 mm en modo dinámico (frecuencia angular: 100 a 1 rad/s, deformación 1%, 37°C). Las muestras que consisten en 2,5 ml de solución de quitosán a analizar se depositan en vasos, colocados a 37°C en medio de cultivo durante 24 horas.

Por solución "homogénea" de quitosán se entiende en el sentido de la presente invención que todo el polímero de quitosán se disuelve, y la solución no contiene partículas sólidas suspendidas en la fase líquida. La solución según la invención también es típicamente transparente. En particular, la homogeneidad de la solución de quitosán se puede caracterizar midiendo la transmitancia de la luz a través de una muestra de solución. Por lo tanto, según una realización preferida, la solución de quitosán según la presente invención tiene un valor de transmitancia de la luz, a una longitud de onda igual a 500 nm, a través de una muestra de 1 cm de espesor, mayor que 60%, preferiblemente mayor que 70%, más preferiblemente mayor que) 80%, e incluso más preferiblemente mayor que 90%). En particular, la solución acuosa homogénea según la invención presenta una transmitancia comprendida entre 60 y 100%, preferiblemente entre 80 y 99%, más preferiblemente entre 80 y 98%, y todavía más preferiblemente entre 90 y 97%.

Las soluciones líquidas homogéneas de quitosán objeto de la presente invención son preferiblemente líquidas y homogéneas a temperatura ambiente, es decir, entre 20 y 25°C, preferiblemente a 25°C. En este punto se diferencian de las soluciones intermedias descritas en el ejemplos de la solicitud WO03/042250, que son líquidas a baja temperatura (4°C) pero gelifican y se enturbian cuando aumenta la temperatura.

Las soluciones líquidas homogéneas de quitosán objeto de la presente invención son preferiblemente estables en el almacenamiento a 25°C en el tiempo. En particular, su viscosidad a 25°C y su transmitancia permanecen estables durante al menos 1 h y hasta más de 3 años para permitir el almacenamiento de las soluciones. Por lo tanto, las soluciones según la invención presentan preferiblemente una estabilidad de almacenamiento a 25°C durante un tiempo comprendido entre 1 h y 3 años, más preferiblemente entre 10 h y 2 años, todavía más preferiblemente entre 1 día y 1 año, y todavía más preferiblemente entre 1 mes y 9 meses.

Según una característica particular de la presente invención, la solución acuosa homogénea de quitosán contiene entre 0,1 y 4,5%, ventajosamente entre 1 y 3,5%, en particular entre 2 y 3,5%, en peso de quitosán, con respecto al peso total de la solución acuosa.

De manera particularmente ventajosa, la solución acuosa según la invención se formula para ser administrada o se usa por inyección intradérmica o subcutánea, intramuscular, intraarticular, intraocular y de forma más general en los tejidos blandos o duros del cuerpo, p. ej. órganos (aparato digestivo o urogenital) o tejidos adiposos, membranas mucosas, encías, cartílago, huesos, etc. Debido a su pH cercano al pH fisiológico, la solución según la invención se puede inyectar directamente en los tejidos sin riesgo de provocar su necrosis. La solución se puede acondicionar en una jeringa, tal como una jeringa estéril.

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

por autoclave.

Después de la esterilización, el quitosán típicamente tiene una masa molecular media ponderada comprendida entre 50.000 y 1.200.000 g/mol, preferiblemente entre 100.000 y 1.000.000 g/mol.

5 Después de esterilización, las soluciones líquidas según la invención presentan preferiblemente una viscosidad menor que 800 Pa.s, preferiblemente comprendida entre 5 y 800 Pa.s. La viscosidad de las soluciones después de esterilización se mide según el método descrito para medir la viscosidad de las soluciones antes de esterilización.

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

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

20 En otra realización particular de la presente invención, la solución acuosa contiene un quitosán tal como se ha definido previamente mezclado con otro quitosán, tal como un oligosacárido de quitosán también llamado quitoooligosacárido, que tiene un grado de acetilación inferior a 20%, ventajosamente inferior a 10%, incluso más ventajosamente que tiene un grado de acetilación idéntico al quitosán como se ha definido previamente, y que tiene típicamente una masa molecular media ponderada muy baja, por ejemplo, inferior a 20.000 g/mol, ventajosamente inferior a 17.000 g/mol.

25 En otra realización particular de la presente invención, la solución acuosa contiene, como polímero, un solo quitosán que tiene un grado de acetilación como se ha definido previamente, que tiene ventajosamente una masa molecular media como se ha definido previamente, ventajosamente en un contenido comprendido entre 0,1 y 4,5%, ventajosamente entre 1 y 3,5%, en particular entre 2 y 3,5% en peso de quitosán, con respecto al peso total de la solución acuosa.

30 Agente de reticulación

35 En una realización particular, el quitosán se puede reticular parcialmente 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 presentan un grupo carboxílico COO<sup>-</sup> (alginatos, pectina, xantano, ácido hialurónico), con polisacáridos que tienen un grupo sulfato, o con poli(ácido láctico) (PLA), o incluso por interacción con proteínas (colágeno), ácidos nucleicos (ADN, ARN, Si ARN, ARNm...) o polisacáridos oxidados.

40 En otra realización particular, el quitosán se puede reticular parcialmente por medio de agentes de reticulación covalentes (p. ej., genipina), excluyendo agentes conocidos por su toxicidad, tales como agentes del grupo de epoxi (por ejemplo, éter de diglicidilo de 1,4-butanodiol-BDDE) o ésteres bi o polifuncionales (por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético - EDTA), divinilsulfona, carbodiimidias y dialdehídos.

45 En una realización particular, la solución acuosa según la invención está compuesta de la combinación de una solución acuosa de quitosán no reticulado con una solución acuosa de quitosán reticulado.

Procedimiento de preparación de la solución

50 Según una característica particular, la solución acuosa según la invención se puede preparar mediante las siguientes etapas

55 - disolución del quitosán en agua por adición de ácido, tal como un ácido débil, para obtener una solución acuosa homogénea de quitosán que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, presentando dicha solución un pH inferior a 6,2, seleccionándose ventajosamente dicho ácido del grupo que consiste en ácido acético, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glutámico y sus mezclas, y

60 - reajuste del pH por diálisis, preferiblemente a temperatura ambiente, para obtener una solución acuosa que presenta un pH superior o igual a 6,2, ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1.

65 Antes de la disolución, el quitosán está típicamente en forma de polvo o escamas. Después de disolución, el quitosán está en forma protonada. Es un polielectrolito catiónico cuyo contraión procede del ácido usado para la disolución. Por ejemplo, si se añade ácido acético al agua para disolver el quitosán, el quitosán se encuentra en forma de acetato de quitosán, es decir una forma protonada NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de las funciones amina en interacción

electrostática con los iones acetato.

El quitosán se disuelve en agua usando un ácido fuerte o un ácido débil. Sin embargo, el quitosán se disuelve preferiblemente en agua usando un ácido débil para evitar su degradación por hidrólisis en solución ácida (a un pH del orden de 3 o menos obtenido durante la solubilización por el ácido fuerte). Los ácidos fuertes, aunque permiten efectivamente la solubilización del quitosán en agua, son más difíciles de implementar y requieren trabajar con estequiometría precisa.

El ácido fuerte puede ser, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido fosfórico.

El ácido débil se puede seleccionar entre ácido acético, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glutámico y sus mezclas.

En una realización particular según la invención, durante la etapa de disolución, el ácido se añade en una cantidad estrictamente necesaria a la disolución del quitosán. 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, y después el quitosán se vuelve a precipitar, usando amoníaco, por ejemplo. Después de una serie de lavados dirigidos a eliminar el exceso de amoníaco y sales, el quitosán 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, se añade el ácido en una cantidad estrictamente necesaria para la disolución de quitosán, tal como la cantidad estequiométrica estrictamente necesaria para la protonación de los sitios  $\text{NH}_2$ .

Típicamente, el número de sitios a protonar se calcula de la siguiente manera:

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

$$n_{\text{NH}_2} = \frac{m \times (1 - \text{GA}) \times (1 - \%_{\text{H}_2\text{O}})}{M_{\text{monómero}}}$$

con  $m$  = masa de materia prima introducida; %agua = contenido de agua de la materia prima, GA = grado de acetilación,  $n_{\text{NH}_2}$  = número de sitios a protonar en moles.  $M_{\text{monómero}}$  = Masa molecular media de los restos en  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

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

En el contexto de la presente invención, el ajuste del pH se hace de forma muy progresiva por diálisis.

Sin querer estar limitados por ninguna teoría, parece que ajustando el pH de manera progresiva (en particular por diálisis), en lugar de un ajuste repentino por adición de una solución tampón, se puede mantener la solución en forma líquida no gelificada mientras se alcanzan valores de pH más cercanos al pH fisiológico. Los procedimientos del estado de la técnica en los que el ajuste del pH se lleva a cabo por adición de un compuesto tal como bicarbonato de sodio o un tampón de PBS ("Phosphate Buffer Saline" - solución salina tamponada con fosfato), parece que causan un aumento brusco del pH, lo que lleva a la gelificación de la solución a partir de un pH de 6,2. Contra todo pronóstico, los autores de la invención en el origen de la presente solicitud han demostrado que al controlar el aumento del pH para hacerlo continuo y progresivo, era posible mantener la solución acuosa de quitosán en forma líquida a valores de pH superiores a 6,2, acercándose aún más al pH fisiológico.

El valor de pH se controla ventajosamente mediante un medidor de pH durante el aumento de pH para alcanzar un pH mayor o igual a 6,2 y ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1, y más preferiblemente 6,3 y 7,0.

La diálisis es un procedimiento de separación por membrana de moléculas o iones en solución. Por lo tanto, en el contexto de la presente solicitud, la solución acuosa de quitosán según la invención se puede dializar contra una solución tampón que tiene un pH igual al pH final deseado para la solución de quitosán (pH objetivo), es decir al menos mayor de 6,2, ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1. Cuando la solución tampón presenta un pH mayor que el pH de gelificación de la solución (por ejemplo 7,5), entonces se debe vigilar la diálisis para evitar la gelificación de la solución.

La solución tampón puede ser, por ejemplo, una solución salina de tampón fosfato (PBS, TBS, PBS-ácido láctico), tris(tris(hidroximetil)metilamina), ácido 4-2-hidroxi-etil-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES), Ácido 2-[[tris

(hidroximetil)metil]amino}etanosulfónico (TES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)), MES ácido (2-(N-morfolino)etanosulfónico (PIPES), cloruro de sodio (NaCl).

5 Según una realización preferida, la solución tampón es una solución de tampón de fosfato PBS ("Phosphate Buffer Saline" - solución salina tamponada con fosfato) compuesta de una sal "ácida"  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , una sal "básica"  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y NaCl.

10 Según una realización particular, el tampón es fisiológicamente aceptable, es decir que no presenta ningún riesgo de intolerancia o toxicidad durante la inyección en los tejidos de la solución inyectable según la invención. En relación con esto, el tampón es preferiblemente diferente del glicerofosfato, y en particular del  $\beta$ -glicerofosfato que, aunque irrita poco la piel, causa problemas de calcificación cuando se inyecta en los tejidos.

15 Según una realización particular de la invención, la diálisis se puede realizar de manera estática en un solo baño contra una solución tampón como se ha descrito antes.

20 En esta realización, la solución tampón puede tener un pH mayor que el pH deseado para la solución de quitosán, por ejemplo, entre 7,0 y 7,5. La diálisis se debe vigilar entonces en tiempo real para no aumentar el pH más allá del pH de gelificación. Sin embargo, el uso de una solución tampón que presenta un pH demasiado alto puede presentar el inconveniente de crear un gradiente de pH dentro de la bolsa de diálisis que comprende la solución acuosa de quitosán, en particular entre la periferia de la bolsa y su centro, lo que podría alterar la homogeneidad de la solución de quitosán. Además, si este gradiente de pH causa la gelificación de la solución acuosa de quitosán en la periferia de la membrana, esto podría reducir la eficiencia y la calidad de la diálisis al limitar los intercambios de protones, sales y disolventes entre la solución de quitosán y la solución tampón.

25 Por lo tanto, cuando la diálisis se realiza de forma estática en un solo baño contra una solución tampón, es preferible que dicha solución tampón presente un pH igual al pH final deseado para la solución de quitosán (pH objetivo), por ejemplo entre 6,5 y 6,9.

30 Según una realización más preferida, la diálisis se puede realizar de forma estática en varios baños sucesivos contra soluciones tampón que tienen diferentes pH cada vez más cercanos al pH final deseado para la solución de quitosán (pH objetivo). Por lo tanto, se puede aumentar el pH de forma más gradual en función del número de baños de tampón usados, de manera que se tienda lo más posible hacia el pH de gelificación de la solución de quitosán sin alcanzarlo nunca. Sin embargo, cada cambio de baño va acompañado de una variación repentina de pH, aunque de pequeña amplitud, que es probable que desestabilice la solución de quitosán y cause la gelifique a valores de pH del orden de 6,3-6,4. Estos pH son ciertamente más altos que los obtenidos para las composiciones de la técnica anterior que usan la adición de un tampón directamente en la solución acuosa de quitosán, pero podrían acercarse más al pH fisiológico para minimizar el riesgo de necrosis de los tejidos durante la inyección de la solución acuosa de quitosán.

40 Por lo tanto, según una realización particularmente preferida, la diálisis se realiza de forma dinámica, es decir, haciendo circular en continuo al menos una solución que permite el aumento gradual del pH a través de una o más bolsas de diálisis que consisten en una membrana de diálisis que contiene la solución acuosa de quitosán.

45 Este procedimiento de diálisis dinámica usa en particular un primer depósito A que contiene un volumen  $V_A$  de solución de ácido débil. La solución de ácido débil contenida en el depósito A circula a través de una serie de bolsas de diálisis conectadas en serie o en paralelo entre sí. La salida de la última bolsa está conectada a un segundo depósito B que contiene un volumen de base  $V_B$ , pudiendo ser dicha base la base conjugada del ácido débil usado en el primer depósito A, o una base más fuerte que esta. El contenido del segundo depósito B después se descarga al depósito A, cambiando así su composición. El sistema funciona en un circuito cerrado hasta que se alcanza el equilibrio ácido-base en los depósitos A y B, formando así una solución tampón de pH determinado en cada depósito. De esta manera, el pH de la solución de quitosán contenida en las bolsas de diálisis aumenta gradualmente hasta alcanzar el de la solución tampón elegida. Dicho dispositivo se ilustra en particular en el Figura 1.

55 Así pues, el procedimiento de diálisis dinámico según la invención lleva a cabo en particular las siguientes etapas:

- i. preparación, en un primer depósito A, de una primera solución que comprende un ácido débil, llamada "solución de ácido débil",
- 60 ii. preparación, en un segundo depósito B, de una segunda solución que comprende la base conjugada o una base más fuerte que la base conjugada del ácido débil usado en la "solución de ácido débil",
- iii. circulación de la "solución de ácido débil" a través de una o más bolsas de diálisis compuestas de una membrana de diálisis que contiene una solución acuosa de quitosán que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, presentando dicha solución un pH inferior a 6,2,

iv. introducción de dicha "solución de ácido débil" recuperada al final de la diálisis de la etapa iii) en el segundo depósito B, modificándose así la composición de dicho segundo depósito B en una mezcla de "base +  $\epsilon$  ácido débil", representando  $\epsilon$  un cantidad muy pequeña,

v. introducción de la mezcla de "base +  $\epsilon$  ácido débil" del depósito B en el depósito A para obtener una mezcla de "ácido débil +  $\epsilon$  base" en dicho depósito A,

vi. repetición de las etapas iii, iv y v hasta alcanzar el equilibrio ácido-base en los depósitos A y B, formando así en cada depósito una solución tampón de pH determinado.

La solución de ácido débil contenida en el depósito A puede comprender en particular cualquier ácido débil, preferiblemente más débil que el ácido usado para la disolución de quitosán.

Preferiblemente, el ácido débil usado en la solución del depósito A se selecciona entre dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico, ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]-etanosulfónico, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico, ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico) ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, ácidos carboxílicos tales como ácido acético, ácido glicólico. Más preferiblemente, el ácido débil usado en el depósito A es una mezcla de dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y NaCl.

Para controlar simultáneamente la osmolaridad de la solución de quitosán, el ácido débil usado en la solución del depósito A puede estar asociado con una llamada sal neutra, es decir, no interaccionar con el par ácido base contenido en los depósitos A y B, en particular uno de sal de sodio (NaCl) o potasio (KCl).

La solución básica contenida en el depósito B comprende la base conjugada o una base más fuerte que la base conjugada del ácido débil usado en la solución de ácido débil usado en la solución del depósito A. Así pues, cuando el dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) es el ácido débil usado en el depósito A, se puede usar hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) en el depósito B. El par ácido-base se selecciona de modo que su pKa sea próximo al pH deseado para la solución tampón (+/-1). En particular, el pKa del par ácido-base puede estar comprendido ventajosamente entre 5,3 y 8,2, preferiblemente entre 5,5 y 7,5.

Las bolsas de diálisis están compuestas de una membrana de diálisis que contiene la solución acuosa de quitosán. La membrana puede estar compuesta, por ejemplo, de un polímero de celulosa regenerada (celulosa natural transformada, por una serie de operaciones químicas y físicas) o de un éster de celulosa (por ejemplo, acetato de celulosa) con un corte de exclusión comprendido entre 5 kDa y 30 kDa.

En particular, un sistema de bombas puede permitir asegurar la circulación en continuo de la solución de ácido débil contenida en el depósito A y de la base conjugada contenida en el depósito B.

Se puede establecer un sistema de agitación en los dos depósitos A y B. En el depósito A, permite homogeneizar la solución y evitar las variaciones de pH relacionadas con la introducción de una parte ( $\epsilon$ ) de la solución contenida en el depósito B. En el depósito B, la agitación es particularmente útil cuando la base usada está en forma de sal. La agitación permite así solubilizar gradualmente la sal básica. El uso de una base en forma de sal permite por lo tanto todavía ralentizar el aumento de pH y por lo tanto garantizar una diálisis aún más progresiva.

Al final del procedimiento de diálisis dinámica, se alcanza el equilibrio ácido-base en los depósitos A y B, formando así, en cada depósito, una solución tampón AB de pH determinado.

El contenido de ácido débil usado en el depósito A y el contenido de base conjugada usado en el depósito B se calculan por métodos conocidos por los expertos en la técnica para obtener, después de la recuperación del equilibrio ácido-básico, una solución tampón AB que presente el pH deseado.

El volumen total de la solución tampón AB ( $V_{AB} = V_A + V_B$ ) representa preferiblemente al menos 5 veces el volumen de solución acuosa de quitosán que se va a dializar, preferiblemente al menos 10 veces.

El volumen  $V_A$  de solución de ácido débil representa preferiblemente 100 veces el volumen  $V_B$  de base conjugada o de base más fuerte que la base conjugada del ácido débil usado en el primer depósito A. De hecho, cuanto más concentrada o fuerte sea la base usada en el depósito B, más rápida es la diálisis. Para ralentizar la diálisis, se prefiere, en el contexto de la invención, aumentar el volumen  $V_B$  del depósito B con el volumen  $V_A$  del depósito A constante.

La circulación continua de las soluciones A y B, precursoras de la solución tampón AB, permite un aumento gradual del pH (y de la osmolaridad cuando se usan sales) de la solución de quitosán lo que permite acercarse a los valores fisiológicos. La cinética de ajuste del pH se puede controlar modificando la velocidad de circulación de las soluciones A y B.

El procedimiento de diálisis dinámica presenta al menos una de las siguientes ventajas:

- evitar la formación de una película de quitosán gelificado sobre la membrana de diálisis
- no provocar una rotura fisicoquímica en la solución de quitosán que pueda comprometer su estabilidad
- 5 - tender más fácilmente al pH de gelificación sin causar esta última; y acercarse lo máximo posible a esta zona
- aumentar la reproducibilidad de las pruebas
- liberarse del control permanente del pH durante la diálisis
- aumentar la homogeneidad de la solución de quitosán y, por lo tanto, de las jeringas después de la distribución, facilitando la esterilización (contenido idéntico en cada jeringa)
- 10 - limitar la manipulación de las membranas de diálisis y, por lo tanto, limitar el riesgo de contaminación
- limitar las intervenciones humanas y, por lo tanto, el coste de la diálisis.

Después de inyección, en particular en los tejidos, la solución acuosa homogénea según la presente invención va a formar ventajosamente un sistema semicristalino, en particular debido al cambio de pH asociado a la influencia de los medios tamponados del organismo.

Por "sistema semicristalino" se entiende típicamente un sistema compuesto de una fase cristalina y una fase no cristalina (amorfa).

Típicamente, los cristales de quitosán obtenidos corresponden al alomorfo hidratado de quitosán.

De manera particularmente ventajosa según la presente invención, la solución acuosa presenta una buena biocompatibilidad y es biorreabsorbible. En particular, el producto según la invención tiene un tiempo de biorreabsorción suficientemente largo, para un efecto prolongado, tal como un efecto de relleno prolongado.

Por "biorreabsorbible" o "biorreabsorción" se entiende una biodegradación que conduce a una degradación total o sustancialmente total del producto inyectado.

Según una característica particular de la presente invención, la solución de quitosán es fluida antes de la inyección, gelifica rápidamente (de unos minutos a algunas horas) *in situ*, y una vez inyectado presenta un tiempo de reabsorción largo, típicamente de unas pocas semanas a varios meses, por ejemplo del orden de 3 o 4 semanas hasta 12 a 18 meses. El producto o biomaterial compuesto de o que contiene la solución acuosa según la invención se beneficia del carácter bacteriostático y fungistático del quitosán, bien conocido en el mundo de la industria agroalimentaria y de los apósitos cicatrizantes. Estas propiedades facilitan la conservación del producto y contribuyen a limitar el riesgo de infección asociada a la inyección o fenómenos inflamatorios con efecto retardado para otros productos como los mencionados anteriormente. Frente a las moléculas naturales usadas hasta la fecha para el relleno de arrugas (colágeno, ácido hialurónico), el quitosán es el único que presenta dichas propiedades. Además, el producto o biomaterial compuesto de o que contiene la solución acuosa según la invención asegura un relleno biológico eficaz ventajosamente inmediato: el quitosán que favorece de hecho la síntesis de colágeno permite un relleno de los defectos cutáneos, tales como las arrugas, por estimulación de mecanismos naturales.

La presente invención tiene también por objeto una solución acuosa homogénea de quitosán inyectable que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, presentando dicha solución un pH superior o igual a 6,2, ventajosamente comprendida entre 6,2 y 7,2, dicha solución que no contiene quitosán tiene un grado de acetilación superior a 20%, siendo dicha solución líquida y homogénea a temperatura ambiente, para su uso en la constitución o sustitución de tejidos biológicos, por ejemplo, como un implante, o el relleno de tejidos biológicos, por ejemplo, relleno de depresión cutánea, inyección en los cartílagos óseos o en las articulaciones).

Ventajosamente, la solución y el quitosán son como se han definido anteriormente.

En particular, el quitosán tiene una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, ventajosamente entre 200.000 y 1.000.000 g/mol, más ventajosamente entre 250.000 y 800.000 g/mol, y todavía más ventajosamente entre 300.000 y 600.000 g/mol.

Típicamente, dicha solución acuosa no contiene quitosán que tenga un grado de acetilación superior a 20%.

De manera ventajosa, dicha solución acuosa se puede preparar de acuerdo con las etapas del procedimiento mencionado anteriormente.

La presente invención también tiene por objeto una composición que comprende una solución acuosa según la invención, y opcionalmente un compuesto o excipiente aceptable.

En una realización particular, la solución acuosa de quitosán según la invención comprende una sal tal como cloruro de sodio, o cualquier otro excipiente ventajosamente aceptable 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.

5 Según una característica particular de la presente invención, la composición puede comprender además al menos un compuesto que tiene una actividad terapéutica reconocida. A modo de ejemplo, se puede mencionar un compuesto analgésico, un compuesto anestésico local como lidocaína, mepivacaína, bupivacaína o ropivacaína, un compuesto angiogénico, una vacuna, una hormona o incluso un compuesto activo de tipo factor de crecimiento u oligosacárido bioactivo, por ejemplo, un oligosacárido de ácido hialurónico u oligosacárido de quitosán con grado de polimerización inferior a 20, o incluso un ácido nucleico, una proteína o un agente antineoplásico.

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

15 La presente invención tiene también por objeto el uso cosmético o 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.

20 La presente invención tiene también por objeto el uso de dicha solución acuosa como portador de principios activos, por ejemplo, como vehículo de vacunas, antineoplásicos u hormonas.

En una realización particular, la composición o la solución acuosa según la presente invención está dirigida a usarse en la reparación o reconstrucción de tejidos.

25 En particular, la composición o la solución acuosa según la presente invención se puede usar para la constitución o la sustitución de tejidos biológicos, por ejemplo como implante, o el relleno de tejidos biológicos, por ejemplo, la inyección en cartílagos óseos o en articulaciones o para rellenar cavidades del cuerpo o la cara, tales como arrugas o líneas de expresión, para crear o aumentar volúmenes de la cara o el cuerpo humano, o incluso para la cicatrización de la piel.

30 Según otras realizaciones particulares, la composición o la solución acuosa según la presente invención se pueden usar:

- en cirugía, en especial en la reparación de órganos, o en medicina o cirugía estética,
- 35 - en urología, en especial para el tratamiento de la incontinencia urinaria,
- en infectología, en especial como portador fluido para las vacunas,
- en oftalmología, en especial para la cicatrización corneal,
- 40 - en odontología, en especial para la colocación de un implante dental o para la reparación ósea,
- en ortopedia, en especial en el periostio para la creación de volumen o incluso en angiología.

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

Ventajosamente, la composición o la solución acuosa según la presente invención también se puede usar como un portador de principio activo, en especial un agente terapéutico, tal como una vacuna o una hormona de tipo insulina o estrógeno, y de forma más general para todos los principios activos cuyo suministro o liberación controlada y/o prolongada tiene una ventaja.

50 La presente invención también se refiere al uso cosmético de una solución acuosa o una composición según la invención para tratar o combatir el envejecimiento de la piel.

55 Finalmente, la presente invención también se refiere a un método para aumentar la solubilidad en agua de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol tal como se ha descrito previamente, que comprende al menos las siguientes etapas:

- 60 - disolución del quitosán en agua por adición de ácido, tal como un ácido débil, para obtener una solución acuosa homogénea de quitosán que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, conteniendo dicha solución entre 0,1 y 4,5% en peso de quitosán, presentando dicha solución un pH inferior a 6,2, seleccionándose dicho ácido ventajosamente del grupo compuesto de ácido acético, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glutámico, y sus mezclas, y

- reajuste del pH por diálisis, preferiblemente a temperatura ambiente, para obtener una solución acuosa que presenta un pH superior o igual a 6,2, ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1.

Las etapas del presente método se han descrito con detalle anteriormente.

5

Los siguientes ejemplos están dirigidos a ilustrar la invención sin limitar de ningún modo el alcance.

Ejemplo 1: Preparación de una solución acuosa de quitosán.

10 Solución ácida de quitosán :

Se preparó una solución acuosa de quitosán disolviendo quitosán sólido en agua acidificada con ácido acético.

15 El quitosán usado es un quitosán de masa molecular Mw comprendida entre 400.000 y 1.500.000 g.mol<sup>-1</sup> y grado de acetilación = 5%.

Su viscosidad, medida a una concentración del 1% en solución acuosa, con ácido acético al 1% a 25°C, es de 9,578 Pa.s.

20 Se disolvieron 1,5 g de quitosán en 500 µl de ácido acético glacial y 49,5 ml de tampón PBS ("solución salina tamponada con fosfato" - pH = 6,5) que comprende NaCl, una sal "ácida" NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y una sal "básica" Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

El pH de la solución es 5,45.

25 Material de diálisis:

La diálisis se realizó usando membranas SpectraPor 4 de celulosa regenerada con un umbral de separación de 12-14000 Da.

30 Los valores de pH se miden usando un medidor de pH portátil FiveGo FG2 (Mettler Toledo).

Se usó un tampón de fosfato de tipo PBS ("phosphate buffered saline" - pH = 6,5).

35 La diálisis se lleva a cabo contra 3 litros de tampón renovado regularmente. La diálisis se detiene ante los primeros signos de gelificación.

El pH de la solución de quitosán se mide regularmente y su evolución se representa en el Figura 2.

40 Por lo tanto, el pH de la solución de quitosán se pudo aumentar hasta un valor de 6,46 sin ningún signo de gelificación de la solución.

Ejemplo 2: comparativo

45 Los autores de la invención han intentado reproducir la solución homogénea de quitosán descrita en el ejemplo 1 de la solicitud de patente WO03/042250.

Para esto, se usó un quitosán que presentaba un grado de desacetilación de 84%.

50 Se disolvieron 2,34 g de quitosán (desacetilado en 84%) con agitación en 100 ml de una solución de HCl (0,1 M). Después de agitar durante 30 minutos, se obtiene una solución homogénea de quitosán.

La solución de quitosán se enfrió en el refrigerador a 4°C y se mantuvo en un baño de hielo.

55 Su pH se ajustó a 6,8 por adición, siempre a 4°C, de una sal disódica de αβ-glicerofosfato. 1,0 g de sal disódica de αβ-glicerofosfato ha sido suficiente para alcanzar el pH deseado de 6,8.

Sin embargo, las sales de αβ-glicerofosfato se dispersaban muy mal en soluciones de quitosán a pesar de la agitación manual y mecánica. Aparecieron incrustaciones de gel muy rápidamente alrededor de los cristales de glicerofosfato menos solubles.

60

Por lo tanto, no se pudieron obtener soluciones acuosas homogéneas de quitosán con un pH de 6,8 reproduciendo el ejemplo 1 del documento WO03/042250.

65 Con el fin de resolver este problema, los autores de la invención han reproducido esta prueba reemplazando la sal disódica de αβ-glicerofosfato por una sal disódica de β-glicerofosfato, cuyas propiedades para mejorar la solubilidad del quitosán son bien conocidas.

Para esta nueva prueba, se usó el mismo quitosán que presenta un grado de desacetilación de 84%.

Se disolvieron 2,34 g de quitosán (desacetilado en 84%) con agitación en 100 ml de una solución de HCl (0,1 M).

La solución de quitosán se enfrió en el refrigerador a 4°C y se mantuvo en un baño de hielo.

Su pH se ajustó a 6,8 por adición gradual, siempre a 4°C, de 2,84 g de una sal disódica de β-glicerofosfato dispersada por agitación manual.

Se obtuvo así una solución homogénea de quitosán a 3,4°C, que presentaba un pH de 6,8. La transmitancia de la solución antes y después de la adición de β-glicerofosfato también se midió por dispersión de la luz, a una longitud de onda igual a 500 nm, a través de una muestra de 1 cm de espesor.

Después la solución se calentó en un baño de agua hasta alcanzar una temperatura de 25°C (temperatura ambiente), y se mantuvo a esta temperatura durante 17 horas. La composición obtenida está gelificada y presenta un aspecto blanquecino pronunciado. La transmitancia ya no se puede medir teniendo en cuenta el carácter compacto del gel obtenido.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

	Sin añadir β-GP	Con adición de β-GP
4°C (T=0)	T° = 3,4°C pH = 6,02 T% = 100% Líquido	T° = 3,1°C pH = 6,81 T% = 77% Líquido
25°C (17H)	T° = 24,5°C pH = 5,60 T% = 100% Líquido	T° = 24,2 pH = 6,81 T% = gel imposible demasiado compacto. Gel compacto

Por lo tanto, la solución obtenida a partir del ejemplo 1 del documento WO03/042250, modificada por el uso de una sal disódica de β-glicerofosfato en lugar de una sal disódica de αβ-glicerofosfato, es bastante líquida y bastante homogénea (transmitancia 77%) a baja temperatura (4°C).

Sin embargo, el aumento de temperatura para alcanzar 25°C (temperatura ambiente) provoca la gelificación de la composición. En el documento WO03/042250 es el injerto químico del quitosán lo que permite obtener una solución inyectable a 25°C. Sin este injerto, las composiciones descritas en el documento WO03/042250 están en forma de gel a partir de 25°C y solo se pueden inyectar a 4°C.

En contraste, las soluciones acuosas homogéneas según la presente invención están en forma de una solución líquida inyectable incluso a temperatura ambiente (20-25°C), y solo gelifican cuando el pH aumenta in situ.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Solución acuosa homogénea de quitosán inyectable que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, presentando dicha solución un pH mayor o igual a 6,2, ventajosamente comprendida entre 6,2 y 7,2, no conteniendo dicha solución quitosán que tenga un grado de acetilación superior a 20%, siendo dicha solución líquida y homogénea a temperatura ambiente.
- 10 2. Solución acuosa según la reivindicación precedente, caracterizada por que el quitosán tiene un grado de acetilación inferior a 19%, preferiblemente inferior a 17%, más ventajosamente inferior o igual a 15%, y más preferiblemente inferior a 10%.
- 15 3. Solución acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que contiene entre 1 y 3,5% en peso de quitosán, en particular entre 2 y 3,5% en peso de quitosán, con respecto al peso total de la solución acuosa.
- 20 4. Solución acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el quitosán tiene una masa molecular media ponderada comprendida entre 200.000 y 1.000.000 g/mol, más ventajosamente entre 250.000 y 800.000 g/mol, y todavía más ventajosamente entre 300.000 y 600.000 g/mol.
- 25 5. Solución acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que presenta un pH entre 6,25 y 7,1, preferiblemente entre 6,3 y 7,0.
- 30 6. Solución acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que se puede preparar por un procedimiento que comprende al menos las siguientes etapas:
- disolución del quitosán en agua por adición de ácido, tal como un ácido débil, para obtener una solución acuosa homogénea de quitosán que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, presentando dicha solución un pH inferior a 6,2, seleccionándose dicho ácido ventajosamente del grupo compuesto de ácido acético, ácido glicólico, ácido láctico, ácido glutámico y sus mezclas, y
  - reajuste del pH por diálisis, preferiblemente a temperatura ambiente, para obtener una solución acuosa que presenta un pH superior o igual a 6,2, ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1.
- 35 7. Solución acuosa según la reivindicación 3, caracterizada por que durante la etapa de disolución, el ácido se añade en una cantidad estrictamente necesaria para disolver el quitosán.
- 40 8. Solución acuosa según una de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizada por que se dializa contra una solución tampón que presenta un pH superior a 6,2, ventajosamente comprendido entre 6,2 y 7,2, preferiblemente entre 6,25 y 7,1.
- 45 9. Solución acuosa según una de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizada por que la solución tampón es una solución salina de tampón de fosfato compuesta de una sal "ácida"  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , una sal "básica"  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaCl}$ .
- 50 10. Solución acuosa según una de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizada por que la diálisis es dinámica, llevando a cabo en particular las siguientes etapas:
- i. preparación, en un primer depósito A, de una primera solución que comprende un ácido débil, llamada "solución de ácido débil",
  - ii. preparación, en un segundo depósito B, de una segunda solución que comprende la base conjugada o una base más fuerte que la base conjugada del ácido débil usado en la "solución de ácido débil",
  - 55 iii. circulación de la "solución de ácido débil" a través de una o más bolsas de diálisis compuestas de una membrana de diálisis que contiene una solución acuosa de quitosán que contiene, en un medio fisiológicamente aceptable, entre 0,1 y 4,5% en peso de un quitosán que tiene un grado de acetilación inferior a 20% y una masa molecular media ponderada comprendida entre 100.000 y 1.500.000 g/mol, presentando dicha solución un pH inferior a 6,2,
  - 60 iv. introducción de dicha "solución de ácido débil" recuperada al final de la diálisis de la etapa iii) en el segundo depósito B, modificándose así la composición de dicho segundo depósito B en una mezcla de "base +  $\epsilon$  ácido débil", representando  $\epsilon$  un cantidad muy minoritaria,
  - v. introducción de la mezcla de "base +  $\epsilon$  ácido débil" del depósito B en el depósito A para obtener una mezcla de "ácido débil +  $\epsilon$  base" en dicho depósito A,
  - 65 vi. repetición de las etapas iii, iv y v hasta alcanzar el equilibrio ácido-base en los depósitos A y B, formando así en cada depósito una solución tampón de pH determinado.

11. Solución acuosa según la reivindicación 7, caracterizada por que el ácido débil usado en el depósito A es una mezcla de dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y NaCl y la base usada en el depósito B es hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ).
- 5 12. Solución acuosa según una de las reivindicaciones 3 a 8, caracterizada por que la membrana de diálisis está compuesta de un polímero de celulosa regenerada (celulosa natural transformada por una serie de operaciones químicas y físicas) o de un éster de celulosa (por ejemplo, acetato de celulosa) con un corte de exclusión comprendido entre 5 kDa y 30 kDa.
- 10 13. Composición que comprende una solución acuosa según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y opcionalmente un compuesto o un excipiente aceptable.
14. Composición según la reivindicación 13, que comprende al menos un compuesto activo, tal como un compuesto analgésico, anestésico local, como lidocaína, mepivacaína, bupivacaína o ropivacaína, un compuesto angiogénico, una vacuna, una hormona o incluso un compuesto activo de tipo factor de crecimiento u oligosacárido bioactivo, por ejemplo, un oligosacárido de ácido hialurónico u oligosacárido de quitosán de grado de polimerización inferior a 20, o incluso un ácido nucleico, una proteína o un agente antineoplásico.
- 15 15. Composición según la reivindicación 13 o 14, caracterizada por que está formulada para ser administrada o se usa por inyección intradérmica o subcutánea, intramuscular, intraarticular, intraocular, y de forma más general en el tejido blando o duro del cuerpo, por ejemplo, órganos (aparato digestivo o urogenital) o tejidos adiposos, mucosas, encías, cartílago, huesos.
- 20 16. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para su uso en la reparación o reconstrucción de tejidos, en particular en la constitución o sustitución de tejidos biológicos, por ejemplo, como implante, o relleno de tejidos biológicos, por ejemplo, relleno de depresión cutánea, inyección en el cartílago óseo o en las articulaciones.
- 25 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para usar como composición dermatológica, cosmética, o bien como dispositivo médico, ventajosamente como un implante biorreabsorbible.
- 30 18. Composición según la reivindicación 17, para su uso en cirugía, medicina o cirugía estética, en urología, reumatología, oftalmología, odontología, ortopedia o bien angiología.
- 35 19. Composición según la reivindicación 17, para su uso como portador de principios activos, por ejemplo como vehículo para vacunas, agentes antineoplásicos u hormonas.

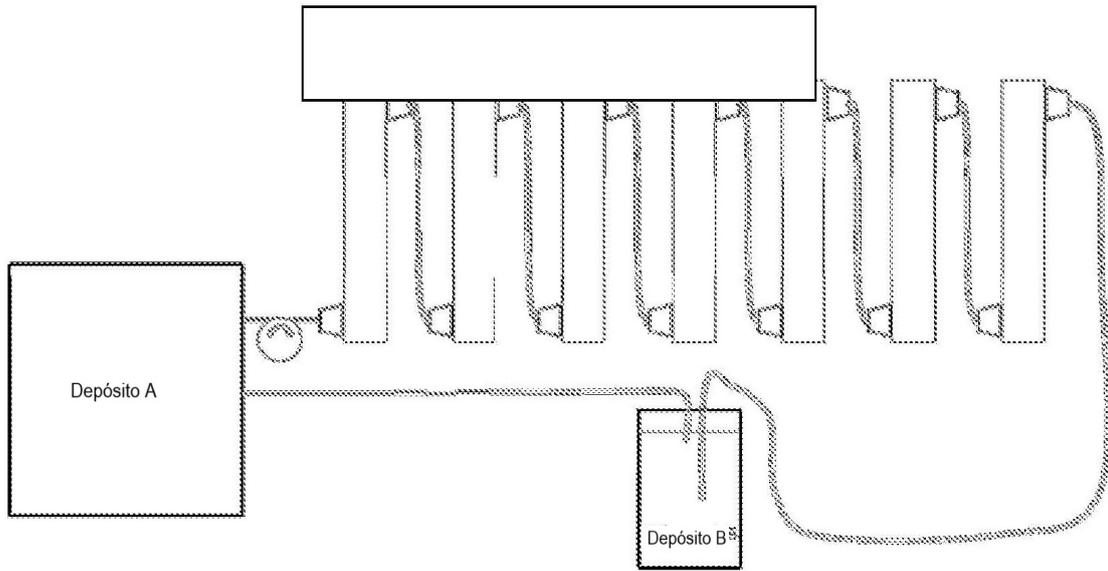


Figura 1

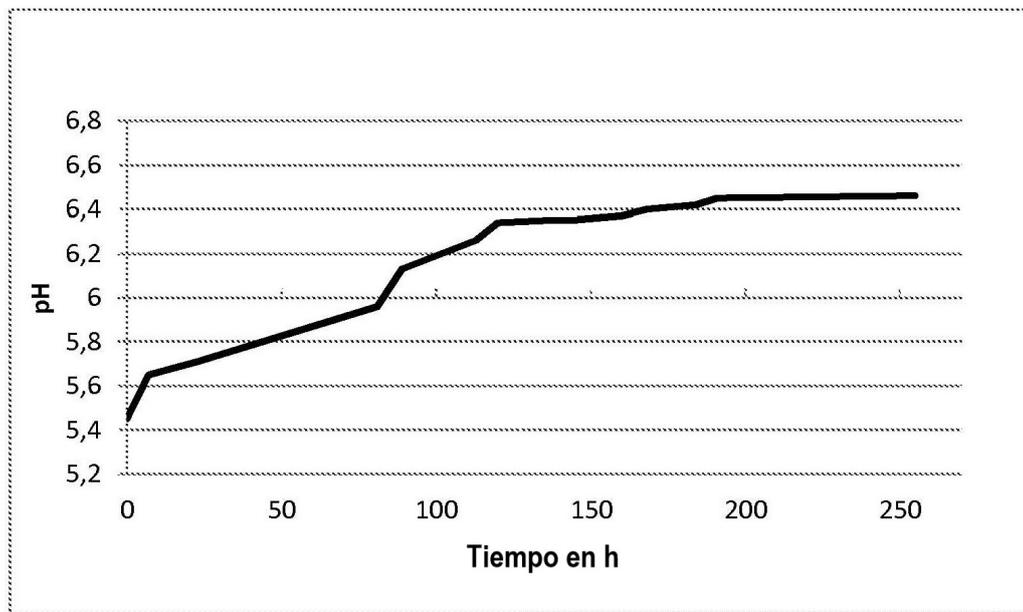


Figura 2