

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3027186

DAL TITOLO:

“PROCESSO PER LA PREPARAZIONE DI COMPOSIZIONI
COMPREDENTI ACIDO IALURONICO E MEPIVACAINA
CLORIDRATO”

*** **

Descrizione

La presente invenzione si riferisce al campo delle composizioni sterili e iniettabili comprendenti acido ialuronico o un relativo sale, e specialmente a composizioni di riempitivo di tessuto molle, in particolare per l'aumento e/o la riparazione di un tessuto molle, incluso un tessuto parodontale, e specialmente per il trattamento di difetti e imperfezioni di materiali cheratinici, come la pelle. L'invenzione riguarda un metodo per preparare tali composizioni.

DESCRIZIONE DELL'ARTE CORRELATA

Vi sono stati tentativi per sviluppare composizioni utili per correggere difetti nella pelle come cicatrici e rughe o per aumentare il tessuto di un soggetto al fine di migliorare l'aspetto della pelle, in particolare la pelle del viso. Il principale metodo impiegato per correggere tali difetti prevede iniettare una composizione di riempitivo nello strato dermico della pelle in prossimità dell'effetto o dell'aumento di tessuto desiderato.

L'acido ialuronico è il principale componente della matrice extracellulare (MEC). Esso si trova pertanto in grosse quantità

principalmente nella pelle. È anche il principale componente fisiologico della matrice cartilaginea articolare ed è particolarmente abbondante nel liquido sinoviale.

Di conseguenza, l'acido ialuronico, nella sua forma di acido o sale, è un biomateriale ampiamente usato come materiale riempitivo iniettabile per l'applicazione in ingegneria tissutale e specialmente per un aumento del tessuto dermico o di un altro tessuto molle come il tessuto gengivale.

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano non solforato lineare composto da unità ripetute di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina (Tammi R., Agren UM., Tuhkanen AL., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry 29 (2): 1. -81, 1994).

Nella pelle, l'acido ialuronico viene principalmente sintetizzato dai fibroblasti dermici e dai cheratinociti epidermici (Tammi R., citato sopra). Attraverso i suoi residui recanti una carica negativa, l'acido ialuronico agisce come una pompa idrica per mantenere l'elasticità della pelle.

In aggiunta, la MEC è una struttura dinamica con un ruolo strutturale e regolatorio per i tessuti. La MEC è composta da collagene ed elastina e anche dalla sostanza fondamentale, principalmente acqua, minerali e proteoglicani. Questa matrice conferisce alla pelle il suo turgore e le proprietà meccaniche di fermezza, elasticità e tono.

Per quanto riguarda la pelle, va notato che, con l'età, la quantità di acido ialuronico e il suo grado di polimerizzazione diminuiscono, con conseguente diminuzione nella quantità di acqua trattenuta nel tessuto connettivo.

Al contempo, i componenti della MEC vengono degradati, principalmente da enzimi di tipo endopeptidasico denominati metalloproteinasi della matrice o MMP.

Infine, le diminuzioni delle difese cellulari aumentano i danni e i disturbi indotti da stress esterni come lo stress ossidativo.

La pelle è quindi soggetta a un processo di invecchiamento che porta alla comparsa di difetti e imperfezioni delle sostanze cheratinose, in particolare della pelle.

Nel campo dei riempitivi antirughe, gel costituiti principalmente da acido ialuronico, se del caso chimicamente reticolato, vengono iniettati per via intradermica per riempire la depressione scavata dalle rughe.

La reticolazione può aumentare la persistenza del prodotto all'interno del derma. Tali gel a base di acido ialuronico, se necessario reticolato, consentono una riduzione delle rughe attraverso l'effetto meccanico del riempitivo risultante dalla ruga cutanea sottovuoto.

Tuttavia, è noto che l'iniezione di tali gel spesso produce una sensazione dolorosa per il paziente, questa sensazione essendo ulteriormente esacerbata quanto più il gel è altamente viscoso e/o elastico.

Al presente, in modo da superare questo problema tecnico, i principali riempitivi a base di acido ialuronico sono disponibili con un agente anestetico locale per assicurare un maggiore conforto per il paziente. Questo agente anestetico locale è soltanto lidocaina, con un dosaggio pari a circa lo 0,3%.

Tuttavia, è noto che la lidocaina può presentare lo svantaggio, con riferimento alle sue proprietà vasodilatatorie, di implicare un assorbimento troppo rapido da parte del corpo del paziente e talvolta un'occorrenza esacerbata di ematoma che, per ovvie ragioni estetiche, deve essere evitata quanto più possibile. Una soluzione per superare i suddetti problemi può consistere nell'implementare la lidocaina in associazione a un vasocostrittore, in particolare epinefrina (J. Endod. maggio 2013; 39(5):597-9). Tuttavia, la presenza di un vasocostrittore come l'epinefrina può richiedere l'aggiunta di un conservante che non è sempre inerte rispetto al paziente e può condurre ad allergie.

Pertanto, rimane una necessità di sviluppare gel costituiti principalmente da acido ialuronico, se del caso chimicamente reticolato, che superino i suddetti problemi tecnici relativi alla sensazione dolorosa per il paziente durante l'iniezione e che inoltre non implichino alcun problema di allergie né di un'occorrenza esacerbata di ematoma.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

L'invenzione si riferisce a un metodo per preparare una composizione sterile e iniettabile, più in particolare una composizione di riempitivo di tessuto molle, il metodo comprendendo almeno le fasi di:

a) fornire almeno un gel di un acido ialuronico o un relativo sale, detto acido ialuronico essendo selezionato tra una forma di acido ialuronico reticolato, una forma di acido ialuronico non reticolato o una relativa miscela;

b) aggiungere a detto gel di acido ialuronico almeno mepivacaina cloridrato come agente anestetico; e

c) sterilizzare la miscela ottenuta nella fase b).

FR 2 979 539 descrive una composizione sterile e iniettabile a base di acido ialuronico per il trattamento di difetti cutanei ma contenente soltanto lidocaina cloridrato come agente anestetico. WO 2012/104419 divulga composizioni sterili e iniettabili comprendenti un gel di acido ialuronico, un agente anestetico e acido ascorbico. Non viene proposta mepivacaina cloridrato come agente anestetico locale. WO 2004/032943 riguarda una composizione comprendente acido ialuronico non reticolato e almeno un agente anestetico per il trattamento di malattie degenerative e traumatiche di tutte le articolazioni e anche per il trattamento di cambiamenti di pelle e mucose. Non viene proposta mepivacaina cloridrato come agente anestetico. WO 2005/067994 verte più in particolare sull'idratazione di particelle di acido ialuronico con una soluzione acquosa contenente un agente bioattivo diverso da mepivacaina cloridrato. EP 2404619 suggerisce di combinare a un farmaco come, in particolare, un agente anestetico, un componente di gel per migliorarne l'efficienza. Gli agenti anestetici locali elencati in questo primo documento sono tutti diversi da

mepivacaina cloridrato. WO 2013/186493 divulga composizioni utili per l'aumento delle rughe e che comprendono acido ialuronico e almeno un saccarosio octasolfato idrosolubile ([00035]). Al suo interno non è descritta né proposta mepivacaina cloridrato.

Il documento J. Oral Maxillofac Surg. 2008, 66, 286 e WO 2013/092860 considerano l'uso di mepivacaina cloridrato ma non secondo il metodo rivendicato della presente invenzione. Pertanto, il documento J. Oral Maxillofac Surg. 2008, 66, 286 discute solo l'effetto della combinazione di un'iniezione di ialuronidasi sulla durata d'azione della mepivacaina.

In particolare, la mepivacaina cloridrato viene usata in combinazione con epinefrina.

Tuttavia, esso non divulga alcun metodo per la preparazione di una composizione iniettabile e sterile comprendente un gel di acido ialuronico. Per quanto riguarda WO 2013/092860, il suo esempio 1 divulga un metodo per preparare una soluzione acquosa iniettabile realizzata da una soluzione acquosa di acido ialuronico e da una soluzione di scandicaina (mepivacaina cloridrato).

Tuttavia, non specifica se l'acido ialuronico è rigonfiato e pertanto sotto forma di un gel quando miscelato con la scandicaina e non vi è alcuna divulgazione riguardante una fase di sterilizzazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

In primo luogo, a differenza della lidocaina, la mepivacaina non presenta significative proprietà vasodilatatorie rispetto alla lidocaina.

Inoltre, la mepivacaina ha un pKa di 7,6 mentre la lidocaina ha un pKa di 7,9.

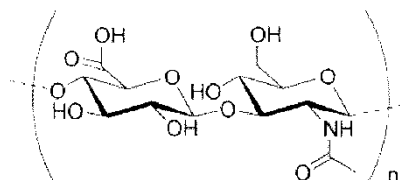
Pertanto, avendo un pKa inferiore a quello della lidocaina, la mepivacaina presenta una migliore liposolubilità che ne migliora la diffusione attraverso le barriere lipidiche. Pertanto, grazie al fatto che la mepivacaina può essere assorbita più rapidamente della lidocaina, la mepivacaina è pertanto appropriata per prevenire meglio una sensazione dolorosa durante l'iniezione.

Soprattutto, gli inventori hanno inaspettatamente osservato che le composizioni di riempitivo ottenute secondo il metodo dell'invenzione, vale a dire includendo mepivacaina cloridrato come agente anestetico, possono essere sterilizzate senza influenzare in misura significativa la stabilità del gel di acido ialuronico.

È infatti noto che i gel di acido ialuronico sono particolarmente sensibili al trattamento termico come quello richiesto per la loro sterilizzazione e che questa stabilità ridotta può essere aumentata attraverso la presenza di ulteriori materiali come l'agente anestetico. Inaspettatamente, questo fenomeno indesiderabile viene significativamente diminuito con mepivacaina cloridrato rispetto alla lidocaina, come mostrato nei seguenti esempi 1 e 2. In aggiunta, gli inventori hanno mostrato che una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione è inoltre conforme ai requisiti in termini di stabilità nel tempo, come di seguito mostrato nell'esempio 3.

Secondo gli inventori, la manifestazione di questi suddetti effetti vantaggiosi all'interno di composizioni di riempitivo di tessuto molle comprendenti acido ialuronico non era nota.

Acido ialuronico



Come menzionato sopra, l'acido ialuronico (denominato anche ialuronano o ialuronato) è un glicosamminoglicano non solforato lineare composto da unità ripetute di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosamina (Tammi R., Agren UM., Tuhkanen AL., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry 29 (2): 1. -81, 1994).

Nella pelle, l'acido ialuronico viene principalmente sintetizzato dai fibroblasti dermici e dai cheratinociti epidermici (Tammi R., citato sopra). Attraverso i suoi residui recanti una carica negativa, l'acido ialuronico agisce come una pompa idrica per mantenere l'elasticità della pelle.

Come menzionato sopra, la presente invenzione considera l'implementazione dell'acido ialuronico in quanto tale ma anche di un relativo sale.

Pertanto, l'acido ialuronico secondo l'invenzione può essere più in particolare selezionato tra sali fisiologicamente accettabili come sale

sodico, sale di potassio, sale di zinco, sale di argento e relative miscele, preferibilmente sale sodico.

Preferibilmente, l'acido ialuronico secondo l'invenzione ha un peso molecolare medio elevato, preferibilmente che varia da 50 000 a 10 000 000 Dalton, preferibilmente da 500 000 a 4 000 000 dalton.

Un sale particolarmente preferito dell'acido ialuronico è lo ialuronato sodico (NaHA).

Come menzionato sopra, l'acido ialuronico viene somministrato mediante iniezione in una quantità efficace.

Una "quantità efficace" di acido ialuronico è una quantità appropriata per ottenere l'effetto tecnico desiderato, in particolare per avere un risultato visibile sull'aspetto superficiale della pelle. In particolare, una quantità efficace di acido ialuronico è una quantità appropriata di acido ialuronico per un buon riempimento dei difetti di volume della pelle, e in particolare per il riempimento delle rughe.

La regolazione della quantità di acido ialuronico rientra nelle competenze di un tecnico del ramo.

Vantaggiosamente, l'acido ialuronico o un relativo sale in un metodo secondo l'invenzione è presente in una soluzione.

A tal riguardo, una quantità efficace di acido ialuronico può variare dallo 0,1 al 5% in peso, preferibilmente dall'1 al 3% in peso, rispetto al peso totale di detta soluzione comprendente l'acido ialuronico o un relativo sale.

Secondo una forma di realizzazione particolare, l'acido ialuronico può essere presente in una forma non reticolata.

Ai fini della presente invenzione, il termine "non reticolato" nel contesto della presente invenzione è inteso indicare un gel di acido ialuronico che non è reticolato o è leggermente reticolato, in altri termini un gel avente un angolo di transizione di fase δ , misurato in condizioni reologiche dinamiche a 1 Hz, che è superiore a 40° quando sottoposto a una sollecitazione superiore a 1 Pa.

Secondo un'altra forma di realizzazione particolare, l'acido ialuronico può essere presente in una forma reticolata.

Secondo un'altra forma di realizzazione particolare, l'acido ialuronico può essere presente in forme reticolate e non reticolate.

A tal riguardo, il rapporto in peso "acido ialuronico reticolato/acido ialuronico non reticolato" è preferibilmente maggiore di 1.

Quando l'acido ialuronico è reticolato, detto acido ialuronico reticolato ha preferibilmente un grado di modifica che varia dallo 0,1 al 20%, preferibilmente dallo 0,4 al 10%.

Con "grado di modifica" si indica, nel senso della presente invenzione, il rapporto tra il numero di moli di agente reticolante legato all'acido ialuronico e il numero di moli di acido ialuronico che formano detto gel di acido ialuronico reticolato.

Questo valore può essere misurato mediante un'analisi NMR 1D 1H del gel reticolato.

Con "numero di moli di acido ialuronico" si indica il numero di moli di unità disaccaridiche ripetute dell'acido ialuronico, un'unità disaccaridica essendo composta da acido D-glucuronico e D-N-acetilglucosammina legati insieme da legami beta-1,4 e beta-1,3 glicosidici alternati.

Questo grado di modifica può essere specialmente apprezzato come divulgato di seguito nella presente.

Pertanto, la caratterizzazione del grado di modifica dell'acido ialuronico viene eseguita mediante spettroscopia tramite NMR (spettrometro Bruker Avance 1 operante a 400 MHz (^1H)).

Per il BDDE, il grado di modifica viene ottenuto integrando il segnale del gruppo N-acetile nella ^1H NMR ($\delta \approx 2$ ppm) presente nell'acido ialuronico e un segnale presente nell'agente reticolante (due gruppi $-\text{CH}_2-$, $\delta \approx 1,6$ ppm). Il rapporto di integrali di questi due segnali (agente reticolante/NaHA) è correlato al grado di modifica, dopo la correzione del numero di protoni legati a ciascun segnale:

$$\text{Degree of modification} = \frac{\left[\frac{\text{Integral } \delta_{\text{H}1.6}}{4} \right]}{\left[\frac{\text{Integral } \delta_{\text{H}2.0}}{3} \right]}$$

"Degree of modification" = Grado di modifica

"Integral" = Integrale

Agente reticolante

Il termine "agente reticolante" è inteso indicare un qualsiasi composto in grado di indurre una reticolazione tra le varie catene dell'acido ialuronico.

La scelta di questo agente reticolante rientra chiaramente nelle competenze di un tecnico del ramo.

Un agente reticolante secondo l'invenzione può essere selezionato tra agenti reticolanti epossidici bifunzionali o multifunzionali ma anche poliammine come per esempio esametildiammina (HMDA) o poliammine endogene.

Con "poliammina endogena", nell'accezione della presente invenzione, si indica una poliammina naturalmente presente negli organismi viventi e in modo particolare nel corpo umano. Come rappresentanti delle poliammine endogene possono essere in particolare menzionate quelle citate negli animali eucariotici, come la putrescina (o 1,4-diamminobutano), la spermidina (o 1,8-diammino-5-azaottano) e la spermina (1,12-diammino-5,9-diazadodecano), preferibilmente la spermina.

Più in particolare, un agente reticolante secondo la presente invenzione può essere preferibilmente selezionato dal gruppo costituito da 1,4-butandiolo diglicidil etere (BDDE), 1,4-bis(2,3-epossipropossi)butano, 1,4-bis(glicidilossibutano), 1,2-bis(2,3-epossipropossi)etilene e 1-(2,3-epossipropil)-2,3-epossicicloesano, una poliammina endogena e relative miscele.

Preferibilmente, un agente reticolante secondo l'invenzione è 1,4-butandiolo diglicidil etere (BDDE).

Nella forma di realizzazione particolare in cui l'agente reticolante è una poliammina e, più in particolare, una poliammina

endogena, la reazione di accoppiamento con l'acido ialuronico può essere condotta in presenza di almeno un attivatore e, se del caso, associato ad almeno un accoppiamento ausiliario.

A tal riguardo, l'attivatore può essere selezionato tra carbodiimmidi idrosolubili come 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (EDC), 1-etil-3-(3-(25-trimetilamminopropil)carbodiimmide cloridrato (ETC), 1-cicloesil-3-(2-morfilinoetil)carbodiimmide (CMC) e un relativo sale, nonché relative miscele, e preferibilmente è rappresentato da EDC.

Per quanto riguarda l'ausiliario di accoppiamento, quando è presente, esso può essere selezionato tra N-idrossi succinimide (NHS), N-idrossibenzotriazolo (HOBt), 3,4-diidro-3-idrossi-4-osso-1,2,3-benzotriazolo (HOOBt), 1-idrossi-7-azabenzotriazolo (HAt) e N-idrossisolfosuccinimide (solfo-NHS), nonché relative miscele, e preferibilmente è rappresentato da HOBt.

L'agente reticolante viene implementato in una quantità efficace.

Una "quantità efficace" di agente reticolante è una quantità appropriata per ottenere un grado appropriato di reticolazione dell'acido ialuronico.

La regolazione della quantità di agente reticolante rientra nelle competenze di un tecnico del ramo.

Vantaggiosamente, una quantità efficace di agente reticolante può variare dallo 0,05 al 15% in peso rispetto al peso totale dell'acido ialuronico o di un relativo sale.

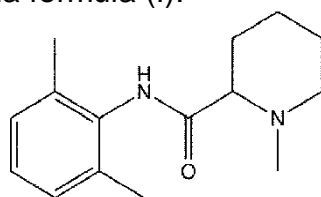
Vantaggiosamente, quando l'acido ialuronico è reticolato, e quando l'agente reticolante è BDDE, la quantità in rapporto molare di nBDDE/n acido ialuronico può variare tra 0,01 e 0,5, preferibilmente tra 0,04 e 0,25.

Agente anestetico

L'agente anestetico secondo la presente invenzione ha il particolare vantaggio di ridurre o eliminare la sensazione di dolore riscontrata dal paziente durante e/o a seguito dell'iniezione.

Inoltre, l'agente anestetico secondo la presente invenzione viene selezionato tra composti che non fanno sorgere un rischio di incompatibilità con altri composti usati in una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione, specialmente con l'acido ialuronico, ed è almeno mepivacaina cloridrato.

La mepivacaina è un anestetico locale della famiglia delle amminoammidi della formula (I):



(I)

La mepivacaina è notoriamente venduta con il nome Carbocaina® dalla società Cook-Waite.

La mepivacaina è una molecola avente una buona stabilità. Il suo principale prodotto di degradazione è 2,6-dimetilanilina. La mepivacaina è una molecola contenente un centro chirale (carbonio asimmetrico). Pertanto, sono presenti gli enantiomeri R e S. Negli esempi seguenti, viene considerata la miscela racemica delle due forme di mepivacaina.

Vantaggiosamente, la mepivacaina cloridrato in un metodo secondo l'invenzione è presente in una soluzione.

A tal riguardo, una quantità efficace di mepivacaina cloridrato può variare dallo 0,05 al 3% in peso rispetto al peso della soluzione comprendente detta mepivacaina cloridrato.

Composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione La composizione sterile e iniettabile, in particolare una composizione di riempitivo soffice ottenuta secondo il metodo rivendicato, comprende una quantità efficace almeno di acido ialuronico o di un relativo sale e includente una quantità efficace almeno di mepivacaina cloridrato come agente anestetico.

Con "sterile", nel senso della presente invenzione, si indica un ambiente in grado di garantire ai composti considerati in una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione requisiti di sicurezza per le vie di somministrazione come menzionato sopra, in particolare nella o attraverso la pelle. Infatti, per ovvie ragioni, è essenziale che una composizione ottenuta secondo il metodo

dell'invenzione sia priva di qualsiasi corpo contaminante in grado di avviare una reazione parassita indesiderabile nell'organismo ospite.

L'acido ialuronico, l'agente reticolante e l'uno o più agenti anestetici sono come menzionato sopra.

Per quanto riguarda l'acido ialuronico, una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può comprendere dallo 0,1 al 5% in peso, preferibilmente dall'1 al 3% in peso di acido ialuronico, rispetto al peso totale di detta composizione.

Come menzionato sopra, l'acido ialuronico può essere presente in forme reticolate e non reticolate.

A tal riguardo, il rapporto "acido ialuronico reticolato/acido ialuronico non reticolato" è preferibilmente maggiore di 1.

Più in particolare, la composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può comprendere:

- dal 50% al 99% in peso, più preferibilmente dal 70% al 95% in peso di acido ialuronico presente sotto forma di un gel reticolato,

- dall'1% al 50% in peso, preferibilmente dal 5% al 30% in peso di acido ialuronico presente in una forma non reticolata,

il rapporto tra il peso del gel di acido ialuronico reticolato e il peso dell'acido ialuronico non reticolato essendo tra 1:1 e 1:0,02.

Per quanto riguarda l'uno o più agenti anestetici, una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può comprendere dallo 0,01% al 5% in peso, preferibilmente dallo 0,05% al

3% in peso di uno o più agenti anestetici, in base al peso totale di detta composizione.

In virtù del suo carattere iniettabile, una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione comprende necessariamente un mezzo fisiologicamente accettabile.

Un "mezzo fisiologicamente accettabile" indica un mezzo privo di tossicità e compatibile con l'iniezione e/o l'applicazione della composizione come considerato nella presente.

La composizione può comprendere un solvente o una miscela di solventi fisiologicamente accettabili.

La composizione può comprendere un mezzo acquoso fisiologicamente accettabile.

Come mezzo acquoso idoneo per l'invenzione può essere per esempio menzionata l'acqua.

Come agenti isotonici idonei per la preparazione di una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione possono essere menzionati zuccheri e cloruro di sodio.

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può comprendere inoltre almeno una soluzione salina bilanciata.

L'implementazione di questa soluzione salina bilanciata è particolarmente interessante in quanto consente di ridurre ulteriormente il dolore da iniezione (si veda Farley J.S. et al., *Regional Anesthesia A.*, 1994, Vol. 19: 48).

Preferibilmente, detta soluzione salina bilanciata è una soluzione salina tamponata con fosfato e, più specificamente, è una soluzione salina tamponata con fosfato e in particolare una soluzione salina tamponata con $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$.

Detta soluzione salina bilanciata può comprendere inoltre almeno un composto selezionato dal gruppo costituito da un acido alfa lipoico; N-acetil-L-cisteina; glutatione ridotto; un amminoacido come L-arginina, L-iso-leucina, L-leucina, L-lisina monoidrata, glicina, L-valina, L-treonina, L-prolina; piridossina cloridrato; acetato di zinco disidratato; solfato di rame pentaidrato e una relativa miscela.

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può comprendere inoltre almeno un composto selezionato dal gruppo costituito da un acido alfa lipoico; N-acetil-L-cisteina; glutatione ridotto; un amminoacido come L-arginina, L-iso-leucina, L-leucina, L-lisina monoidrata, glicina, L-valina, L-treonina, L-prolina; piridossina cloridrato; acetato di zinco disidratato; solfato di rame pentaidrato e una relativa miscela.

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può comprendere, in aggiunta ai suddetti composti, almeno un composto aggiuntivo compatibile con l'uso nel campo delle composizioni di riempitivo di tessuto molle.

A tal riguardo, i composti aggiuntivi che possono essere implementati in una composizione ottenuta secondo il metodo

dell'invenzione possono essere selezionati tra sale di rame, acido alfa lipoico, un derivato acetilato della cisteina o una relativa miscela.

Le quantità di questi composti aggiuntivi dipendono dalla natura del composto in questione, dall'effetto desiderato e dalla destinazione della composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione.

Questi parametri appartengono alle competenze generali del ramo.

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione comprendente inoltre almeno un sale di rame può preferibilmente comprendere detto sale di rame in una quantità che varia da 0,1 a 50 ppm in base al peso totale di detta composizione.

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione comprendente inoltre almeno un acido alfa lipoico preferibilmente comprende detto acido alfa lipoico in una quantità che varia da 0,5 a 10 000 ppm, preferibilmente da 5 a 100 ppm di acido alfa lipoico, in base al peso totale di detta composizione.

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione comprendente inoltre almeno un derivato acetilato della cisteina preferibilmente comprende detto derivato acetilato della cisteina in una quantità che varia da 0,5 a 10 000 ppm in base al peso totale di detta composizione.

Tra gli altri composti aggiuntivi che possono essere usati nella presente invenzione possono essere menzionati antiossidanti, amminoacidi, vitamine, minerali, acidi nucleici, coenzimi, derivati di

adrenalina e relative miscele, detti composti aggiuntivi essendo distinti da quelli indicati sopra.

Come antiossidante, possono essere menzionati glutatione, acido ellagico, spermina, resveratrolo, retinolo, L-carnitina, polioli, polifenoli, flavonoli, teaflavine, catechine, caffeina, ubichinolo, ubichinone e una relativa miscela.

Come amminoacido possono essere menzionati arginina, isoleucina, leucina, lisina, glicina, valina, treonina, prolina, metionina, istidina, fenilalanina, triptofano e una relativa miscela.

Come vitamine e loro derivati possono essere menzionate le vitamine E, A, C, B, specialmente le vitamine B6, B8, B4, B5, B9, B7, B12, e meglio la piridossina.

Come minerali possono essere menzionati in particolare sali di zinco, sali di magnesio, sali di calcio, sali di potassio, sali di manganese, sali di sodio e relative miscele.

Come acidi nucleici possono essere menzionati in particolare i derivati di adenosina, citidina, guanosina, timidina, la citodina e una relativa miscela.

Come coenzimi possono essere citati coenzima Q10, CoA, NAD, NADP e relative miscele. Come derivati di adrenalina possono essere menzionate adrenalina e noradrenalina.

In aggiunta, una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può comprendere inoltre qualsiasi eccipiente d'uso comune nel campo tecnico, come per esempio diidrogenofosfato di

sodio e cloruro di sodio mono-e/o di-idrati, in concentrazioni fisiologiche.

Le quantità di principi attivi aggiuntivi e/o eccipienti dipendono naturalmente dalla natura del composto in questione, dall'effetto desiderato e dalla destinazione della composizione come descritto nella presente.

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può avere una viscosità complessa η^* tra circa 5 Pa*s e circa 450 Pa*s quando misurata a circa 1 Hz.

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione costituita da acido ialuronico reticolato può avere una viscosità tra 200 e 2000 Pa.s, preferibilmente tra 1000 e 1800 Pa.s.

Le proprietà viscoelastiche di una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione possono essere misurate usando un reometro (in particolare Haake RS6000) con una geometria di cono/piastra (angolo di cono 1°/diametro di piastra 35 mm). Viene eseguita una scansione di deformazione e vengono misurati il modulo elastico G' (in Pa) e l'angolo di transizione di fase δ (in °) per una sollecitazione di 5 Pa.

Metodo per preparare una composizione sterile e iniettabile, secondo l'invenzione

Come menzionato sopra, la presente invenzione si riferisce a un metodo per preparare una composizione sterile e iniettabile, più in

particolare una composizione di riempitivo di tessuto molle, il metodo comprendendo almeno le fasi di:

a) fornire almeno un gel di un acido ialuronico o un relativo sale, detto acido ialuronico essendo selezionato tra una forma di acido ialuronico reticolato, una forma di acido ialuronico non reticolato o una relativa miscela;

b) aggiungere a detto gel di acido ialuronico almeno mepivacaina cloridrato come agente anestetico; e

c) sterilizzare la miscela ottenuta nella fase b).

Secondo una forma di realizzazione preferita, la mepivacaina cloridrato viene aggiunta a una forma iniettabile di acido ialuronico.

In altre parole, il gel di acido ialuronico considerato nella fase a) presenta già una concentrazione di acido ialuronico, di residui di agente reticolante, se presente, e condizioni fisiologiche e/o di pH che sono compatibili con un uso iniettabile, in particolare nei campi delle applicazioni considerate sopra.

In questo modo, i rischi di influenzare la stabilità dell'acido ialuronico nella miscela di acido ialuronico e mepivacaina cloridrato imponendo fasi di purificazione aggiuntive, come definito sopra, vengono significativamente ridotti.

La miscela vantaggiosamente subisce soltanto una fase di sterilizzazione. Questa fase viene preferibilmente condotta sulla miscela già impaccata nel suo dispositivo di distribuzione, solitamente una siringa, come definito di seguito nella presente.

Vantaggiosamente, la fase di sterilizzazione può essere effettuata mediante mezzi termici.

Vantaggiosamente, la sterilizzazione viene condotta a una temperatura che varia da 120 a 140 °C.

In particolare, la fase di sterilizzazione può essere effettuata in un'autoclave (calore umido) $T \text{ } ^\circ\text{C} \geq 121 \text{ } ^\circ\text{C}$, per ottenere un $F_0 > 15$ (valore di sterilizzazione).

A tal riguardo, e come menzionato sopra, una composizione ottenuta secondo l'invenzione è particolarmente vantaggiosa in quanto presenta una resistenza elevata molto interessante a questa fase di sterilizzazione.

Infatti, come mostrato negli esempi 1 e 2, la perdita di G' generata dalla sterilizzazione per una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione è inferiore rispetto a quella per una composizione comprendente lidocaina anziché mepivacaina.

Secondo una forma di realizzazione particolare, il metodo per preparare un gel di acido ialuronico secondo l'invenzione può comprendere inoltre una fase d) consistente nell'aggiungere un ulteriore agente anestetico o un relativo sale, diverso dalla mepivacaina cloridrato, detta fase d) essendo condotta prima, contemporaneamente e/o dopo la fase b).

Questo ulteriore agente anestetico può essere in particolare selezionato tra ambucaina, amolanone, amilocaina, benoxinato, benzocaina, betossicaina, bifenamina, bupivacaina, butacaina,

butambene, butanilcaina, butetamina, butossicaina, carticaina, cloroprocaina, cocaetilene, cocaina, ciclometricaina, dibucaina, dimetisochina, dimetocaina, diperodone, diciclonina, ecgonidina, ecgonina, cloruro di etile, etidocaina, beta-eucaina, euprocina, fenalcomina, formocaina, esilcaina, idrossitetracaina, isobutil p-amminobenzoato, leucinocaina mesilato, levoxadrol, lidocaina, meprilcaina, metabutossicaina, cloruro di metile, mirtecaina, naepaina, ottacaina, ortocaina, oxetazaina, paretossicaina, fenacaina, fenolo, piperocaina, piridocaina, polidocanolo, pramoxina, prilocaina, procaina, propanocaina, proparacaina, propipocaina, propossicaina, pseudococaina, pirrocaina, ropivacaina, alcol salicilico, tetracaina, tolicaina, trimecaina, zolamina, o un relativo sale, e una relativa miscela.

Quando il gel considerato nella fase a) comprende una forma reticolata di acido ialuronico, quest'ultima può essere ottenuta preliminarmente da una forma non reticolata di acido ialuronico.

La reticolazione può essere effettuata mediante una modalità convenzionale con almeno un agente reticolante, come menzionato sopra.

La miscela acquosa comprendente l'agente reticolante e l'acido ialuronico da reticolare viene vantaggiosamente omogeneizzata prima di effettuare la reticolazione.

Lo scopo di questa operazione è più specificamente quello di idratare e omogeneizzare perfettamente l'acido ialuronico o un relativo

sale nel mezzo acquoso e in tal modo aiutare a ottimizzare le proprietà del gel di acido ialuronico previste. Questa fase di omogeneizzazione è più importante quando l'acido ialuronico ha un peso molecolare elevato, poiché l'idratazione di tale composto tende a comportare la formazione di una soluzione con viscosità elevata all'interno della quale è comunemente osservata una comparsa di agglomerati.

Lo scopo di questa operazione è anche destinato a omogeneizzare perfettamente l'agente reticolante all'interno della miscela in modo da assicurare successivamente una reazione di reticolazione omogenea.

L'omogeneizzazione è ritenuta soddisfacente quando la soluzione ottenuta viene colorata uniformemente, senza agglomerati, e presenta una viscosità uniforme. L'omogeneizzazione può vantaggiosamente essere condotta in condizioni operative moderate in modo tale da evitare la degradazione delle catene di acido ialuronico.

La durata di questa fase di omogeneizzazione dipende dalla natura dell'acido ialuronico o di un relativo sale e, più in particolare, dal peso molecolare e dalla relativa concentrazione, dalle condizioni operative all'interno del mezzo acquoso e dal dispositivo di omogeneizzazione usato, generalmente un dispositivo che consente un'agitazione meccanica moderata.

Preferibilmente, una fase di omogeneizzazione può svolgersi per un tempo inferiore a 200 minuti, preferibilmente inferiore a 150 minuti o anche tra 15 e 100 minuti.

Lo scopo della reazione di reticolazione è quello di creare ponti tra le catene di acido ialuronico rendendo possibile ottenere un reticolo tridimensionale solido denso da una soluzione viscosa.

Le particolari condizioni da adottare al fine di stimolare la reazione di reticolazione possono dipendere dal peso molecolare dell'acido ialuronico, dal mezzo acquoso e dalla natura dell'agente reticolante. In generale, questa reticolazione può essere ottenuta portando la miscela comprendente l'acido ialuronico non reticolato e almeno un agente reticolante come menzionato sopra a contatto con un elemento di innesco, o stimolante, come, per esempio, mediante riscaldamento o esposizione a UV, oppure anche portando detta miscela a contatto con un materiale di tipo catalitico.

La scelta di tale elemento di innesco rientra nelle conoscenze generali di un tecnico del ramo.

Nel contesto della presente invenzione, questo elemento di innesco è vantaggiosamente rappresentato da un aumento nella temperatura imposto alla miscela "acido ialuronico non reticolato/mezzo acquoso/agente reticolante".

Una temperatura particolarmente idonea per la reazione di reticolazione è compresa tra 35 °C e 60 °C, preferibilmente tra 45 e 55 °C e ancora meglio tra 48 e 52 °C.

Il grado di reticolazione dipende anche dal tempo di reticolazione e dalla temperatura imposta alla miscela "acido ialuronico non reticolato/mezzo acquoso/agente reticolante". Più il tempo è lungo,

più sarà elevato il grado di reticolazione, con tuttavia un punto ottimale da non superare senza correre il rischio di degradare l'acido ialuronico.

Pertanto, a una temperatura che varia tra 35 °C e 60 °C, la reazione di reticolazione può essere condotta per un tempo che varia da 30 a 300 minuti, preferibilmente da 100 a 200 minuti e ancora meglio da 150 a 190 minuti.

Preferibilmente, le condizioni di reticolazione vengono regolate per ottenere un grado di reticolazione tale per cui il gel di acido ialuronico reticolato formato sia un gel viscoelastico viscoso, o anche un gel solido.

Arrestare la reazione di reticolazione richiede esporre il gel reticolato o, durante la reticolazione, anche il contenitore che lo contiene, a condizioni propizie per arrestare la reticolazione o altrimenti a condizioni in grado di arrestare la formazione di legami tra le varie catene di acido ialuronico.

Per esempio, in relazione alle condizioni termiche che saranno applicate per stimolare il processo di reticolazione, la reticolazione può essere arrestata:

- semplicemente rimuovendo il contenitore dal bagno termostato e raffreddandolo finché non ritorna a temperatura ambiente;
- ponendo il contenitore in un bagno di acqua fredda, preferibilmente a una temperatura inferiore alla temperatura ambiente,

finché la temperatura all'interno di detto contenitore non è prossima alla temperatura ambiente; o anche

- estraendo il gel da detto contenitore.

Secondo una forma di realizzazione particolare, l'omogeneizzazione e la reticolazione possono essere condotte all'interno di una cavità ermetica delimitata almeno parzialmente da una parete deformabile, preferibilmente formata all'interno di una sacca deformabile, che può essere deformata almeno manualmente mediante palpazione, come descritto in particolare in WO 2010/131175.

Il gel ottenuto al termine della fase di reticolazione in generale non può essere iniettato direttamente, in particolare per via della sua elevata concentrazione di acido ialuronico e/o della possibile presenza di residui di agente reticolante oppure diversamente per via delle sue condizioni fisiologiche e/o di pH incompatibili con l'uso nei campi delle applicazioni considerate sopra.

Inoltre, alcuni gel possono in particolare avere una rigidità troppo elevata per essere iniettati come tali in un paziente. Pertanto, è possibile eseguire diverse fasi aggiuntive, note ai tecnici del ramo, per ottenere un idrogel iniettabile. Più in particolare, è richiesta una fase di neutralizzazione ed espansione di questo gel al fine di conferirgli le sue qualità di impianto. Le catene del reticolo di acido ialuronico vengono successivamente stirate e idratate, mentre il pH viene portato a livello di quello del derma.

Può anche essere eseguita una fase di protezione e ridensificazione del gel per migliorare ulteriormente le qualità dell'impianto, secondo le conoscenze di un tecnico del ramo. Il gel deve essere formulato fisiologicamente in virtù della presenza di sali in quantità equivalenti a quelle del mezzo iniettato.

Per una purezza ancora superiore, è anche possibile eseguire una fase di purificazione aggiuntiva.

Vantaggiosamente, la mepivacaina cloridrato e, se del caso, uno o più agenti anestetici aggiuntivi, è/vengono aggiunti al termine di questo protocollo di preparazione di una forma iniettabile di acido ialuronico, appena prima della fase di sterilizzazione, come definito sopra.

Secondo una forma di realizzazione particolare, l'idrogel aggiunto di mepivacaina cloridrato e facoltativamente di uno o più agenti anestetici aggiuntivi può essere usato per riempire siringhe in condizioni ad atmosfera controllata, dette siringhe essendo successivamente sottoposte a una fase di sterilizzazione, preferibilmente una fase di sterilizzazione termica come definito sopra.

Somministrazione della composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione

Una composizione ottenuta secondo il metodo dell'invenzione può essere iniettata usando uno qualsiasi dei metodi noti nel ramo.

In particolare, la composizione può essere somministrata per mezzo di un dispositivo di iniezione idoneo alla somministrazione per via intraepidermica e/o intradermica e/o sottocutanea.

La composizione può anche essere somministrata per mezzo di un dispositivo di iniezione idoneo per le regioni gengivali, articolari e/o intraoculari.

Il dispositivo di iniezione, in particolare quando la composizione viene somministrata per mezzo di un dispositivo di iniezione idoneo per la somministrazione per via intraepidermica e/o intradermica e/o sottocutanea, può essere selezionato tra una siringa, una serie di microsiringhe, un dispositivo laser, un dispositivo idraulico, una pistola per iniezione, un dispositivo per iniezione senza ago, un rullo con microaghi.

Preferibilmente, il dispositivo di iniezione può essere selezionato tra una siringa o una serie di microsiringhe.

Come alternativa, il dispositivo di iniezione può essere adattato alla tecnica della mesoterapia.

La mesoterapia è una tecnica di trattamento mediante uno o più principi attivi per via intraepidermica e/o intradermica e/o sottocutanea.

La somministrazione per via intraepidermica e/o intradermica e/o sottocutanea consiste nell'iniettare la composizione in una regione epidermica, dermo-epidermica e/o dermica.

Il dispositivo di iniezione può comprendere un qualsiasi dispositivo di iniezione convenzionalmente usato come un ago ipodermico o una cannula.

Un ago o una cannula possono avere un diametro che varia tra 18 e 34 G, preferibilmente da 25 a 32 G, e una lunghezza variabile da 4 a 70 mm, preferibilmente da 4 a 25 mm.

L'ago o la cannula sono preferibilmente monouso.

Vantaggiosamente, l'ago o la cannula sono associati a una siringa o a un altro dispositivo in grado di distribuire attraverso l'ago o la cannula detta composizione iniettabile. Tra l'ago/cannula e la siringa è possibile inserire un catetere.

In una modalità nota, la siringa può essere azionata manualmente dal medico oppure mediante un supporto di siringa come una pistola.

In tutta la descrizione, incluse le rivendicazioni, l'espressione "comprendente uno" deve essere intesa come sinonimo di "comprendente almeno uno" salvo specificamente indicato altrimenti.

Le espressioni "tra ... e ..." e "che varia da ... a ..." devono essere intese a indicare che i limiti sono inclusi, salvo altrimenti specificato.

I seguenti esempi e figure sono presentati a titolo di illustrazione non limitante dell'invenzione.

ESEMPI:

Materiale e metodo:

Il protocollo definito nella presente di seguito riguardante la misurazione delle proprietà viscoelastiche di una composizione si applica per i seguenti esempi.

Le proprietà viscoelastiche di una composizione vengono misurate usando un reometro (Haake RS6000) con una geometria di cono/piastra (angolo di cono 1°/diametro di piastra 35 mm). Viene eseguita una scansione di deformazione e vengono misurati il modulo elastico G' (in Pa) e l'angolo di transizione di fase δ (in °) per una sollecitazione di 5 Pa.

Esempio 1: protocollo di preparazione di una composizione che implementa un acido ialuronico non reticolato e analisi riguardante la sua stabilità alla sterilizzazione

Vengono miscelati 3 g di acido ialuronico (1,5 MDa) e 197 g di un tampone fosfato (come definito in FR 2 979 539).

Il protocollo di preparazione è come segue:

1. omogeneizzazione tridimensionale della miscela "acido ialuronico + tampone fosfato" a temperatura ambiente in un contenitore ermetico (vaschetta Nalgene) per un minimo di 20 ore;
2. separazione del gel non reticolato ottenuto in 2 frazioni equivalenti (denominate di seguito frazioni A1 e A2);
3. per quanto riguarda la frazione A1, aggiungere al gel l'1% in peso di una soluzione di mepivacaina (30% in peso in un mezzo tampone fosfato) e lo 0,4% in peso di una soluzione di NaOH 1%; o

4. per quanto riguarda la frazione A2, aggiungere al gel l'1% in peso di una soluzione di lidocaina (30% in peso in un mezzo tampone fosfato) e lo 0,4% in peso di una soluzione di NaOH 1%; e

5. omogeneizzazione, impaccamento in siringhe da 1 ml per iniezione e autoclavaggio ($F_0 > 15$).

Risultati:

Le tabelle di seguito forniscono i valori dei moduli elastici G' (in Pa) degli idrogel ottenuti e della forza di estrusione $F(N)$.

<u>Frazione A1</u>		Reologia oscillatoria dinamica		F(N) a 12,5 mm/min
		F = 5 Hz	F = 1 Hz	Ser Schott 1 ml
		G' (Pa)	G' (Pa)	Ago TSK HPC 30 G: 120347
Mepivacaina 0,3%	Non sterilizzata	103,3	36,3	9
	Sterilizzata	45,0	9,6	9
	Perdita per sterilizzazione (in %)	<u>56,4</u>	<u>73,5</u>	

La perdita per sterilizzazione per G' a $F=5$ Hz è calcolata come segue:

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

<u>Frazione A2</u>		Reologia oscillatoria dinamica		F(N) a 12,5 mm/min
		F = 5 Hz	F = 1 Hz	Ser Schott 1 ml
		G' (Pa)	G' (Pa)	Ago TSK HPC 30 G: 120347
Lidocaina 0,3%	Non sterilizzata	105,9	37,4	9
	Sterilizzata	36,7	7,0	9
	Perdita per sterilizzazione (in %)	<u>65,4</u>	<u>81,2</u>	

In considerazione di quanto precede, sembra pertanto che con la mepivacaina la stabilità alla fase di sterilizzazione di una composizione comprendente acido ialuronico non reticolato sia almeno equivalente a quella della lidocaina.

I risultati sono anche significativamente migliori con la mepivacaina.

Esempio 2: protocollo di preparazione di una composizione che implementa acido ialuronico reticolato e non reticolato e analisi riguardante la sua stabilità alla sterilizzazione

Vengono implementati 8 g di acido ialuronico (4 MDa), 58,7 g di idrossido di sodio (NaOH) 1% e 0,6 g di butandiolo diglicidil etere (BDDE). La reazione di reticolazione viene indotta mediante incubazione per 3 ore a 52 °C.

Il protocollo di preparazione è come segue:

1. Omogeneizzazione della miscela "acido ialuronico + NaOH 1%" a temperatura ambiente in un contenitore ermetico e deformabile (una sacca come considerato nella domanda di brevetto

WO 2010/131175) per circa 1 ora e 30 minuti in modo da ottenere una soluzione viscosa perfettamente omogenea;

2. Aggiunta dell'agente reticolante (BDDE) nel contenitore e nuova omogeneizzazione a temperatura ambiente per circa 20 minuti;

3. Incubazione per 3 ore a 52 °C del contenitore contenente la soluzione viscosa di "acido ialuronico/idrossido di sodio 1%/BDDE" in modo da avviare la fase di reticolazione;

4. Neutralizzazione, rigonfiamento e omogeneizzazione del solido ottenuto (soluzione di acido ialuronico reticolato) in un tampone fosfato (come definito in FR 2 979 539) e aggiunta di un gel non reticolato contenente 4 g di HA 4 MDa e 668 g di tampone fosfato integrato, in modo da ottenere un idrogel avente 11 mg/g di acido ialuronico, a un pH prossimo alla neutralità;

5. Purificazione mediante dialisi per 48 ore e successivamente raccolta del gel purificato in un serbatoio di omogeneizzazione;

6. Setacciatura dell'intero gel (230 µm);

7. Separazione del gel raccolto in due frazioni (Frazione B1 e B2);

8. Incorporazione al gel dell'1% in peso di una soluzione di mepivacaina (30% in peso in mezzo tampone fosfato) e dello 0,4% in peso di una soluzione di NaOH 1% (=Frazione B1);

9. Incorporazione al gel dell'1% in peso di una soluzione di lidocaina (30% in peso in mezzo tampone fosfato) e dello 0,4% in peso di una soluzione di NaOH 1% (=Frazione B2);

10. Omogeneizzazione, impaccamento in siringhe da 1 ml per iniezione e sterilizzazione.

Risultati:

Le tabelle di seguito forniscono i valori del modulo elastico G' (in Pa) degli idrogel ottenuti e della forza di estrusione F(N).

<u>Frazione B1</u>		Reologia oscillatoria dinamica	F(N) a 12,5 mm/min
		F = 1 Hz	Ser Schott 1 ml
		G' (Pa)	Ago TSK HPC 30 G: 120347
Mepivacaina 0,3%	Non sterilizzata	20,4	10
	Sterilizzata	8,1	10

	Perdita per sterilizzazione (in %)	<u>60,3</u>	
<u>Frazione B2</u>	Reologia oscillatoria dinamica		F(N) a 12,5 mm/min
	F = 1 Hz		Ser Schott 1 ml
	G' (Pa)		Ago TSK HPC 30 G: 120347
Lidocaina 0,3%	Non sterilizzata	19,2	10
	Sterilizzata	6,2	10
	Perdita per sterilizzazione (in %)	<u>67,6</u>	

La perdita per sterilizzazione è calcolata come mostrato nell'esempio 1.

In considerazione di quanto precede, sembra pertanto che con la mepivacaina la stabilità alla fase di sterilizzazione di una composizione comprendente acido ialuronico reticolato e non reticolato sia almeno equivalente a quella della lidocaina.

I risultati sono anche migliori con la mepivacaina.

Esempio 3: protocollo di preparazione di una composizione che implementa acido ialuronico reticolato e non reticolato e analisi riguardante la sua stabilità nel tempo

Vengono miscelati 10 g di acido ialuronico (1,5 MDa), 73 g di idrossido di sodio 1% e 0,9 g di butandiolo diglicidil etere (BDDE). Successivamente, la reazione di reticolazione viene indotta mediante incubazione per 3 ore a 52 °C.

La procedura di preparazione è come segue:

1. omogeneizzazione della miscela "acido ialuronico + idrossido di sodio 1%" a temperatura ambiente, in un contenitore ermetico e deformabile (sacca) per circa 1 ora e 30 minuti per ottenere una soluzione viscosa perfettamente omogenea;
2. aggiunta dell'agente reticolante (BDDE) nel contenitore e ulteriore omogeneizzazione a temperatura ambiente per circa 20 minuti;
3. incubazione per 3 ore a 52 °C del contenitore contenente la soluzione viscosa di acido ialuronico/idrossido di sodio 1%/BDDE in modo da avviare la fase di reticolazione;
4. neutralizzazione, rigonfiamento e omogeneizzazione del solido ottenuto (soluzione di acido ialuronico reticolato) in un tampone fosfato contenente 2 g di acido ialuronico non reticolato (1,5 MDa), in modo da ottenere un idrogel a 25 mg/g di acido ialuronico a un pH prossimo alla neutralità;

5. purificazione mediante dialisi (per 48 ore) e successivamente raccolta del gel purificato in un recipiente di degassaggio/omogeneizzazione;

6. incorporazione nel gel dell'1% in peso di una soluzione di mepivacaina (30% in peso in un mezzo tampone fosfato) e dello 0,4% in peso di una soluzione di NaOH 1%;

7. omogeneizzazione, degassaggio, impaccamento in siringhe da 1 ml per iniezione e sterilizzazione ($F_0 > 15$).

Risultati:

La tabella di seguito fornisce i valori dell'angolo di transizione di fase δ ($^\circ$) e della forza di estrusione.

Analisi	Scansione di ampiezza reologica (cono/piastra)	Forza di estrusione, misurata con un ago TSK 30G1/2	pH
	Misure di δ ($^\circ$) a 5 Pa e 1 Hz	F(N), a 12,5 mm/min	
T0	17,8 \pm 2,0	24,2 \pm 2,5	7,1
T0 + 19 mesi	19,1 \pm 2,0	23,1 \pm 2,5	7,1

I risultati ottenuti 19 mesi dopo la data di produzione del gel sono equivalenti a quelli ottenuti inizialmente e pertanto dimostrano la stabilità del gel.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per preparare una composizione sterile e iniettabile, il metodo comprendendo almeno le fasi di:

a) fornire almeno un gel di un acido ialuronico o un relativo sale, detto acido ialuronico essendo selezionato tra una forma di acido ialuronico reticolato, una forma di acido ialuronico non reticolato o una relativa miscela;

b) aggiungere a detto gel di acido ialuronico almeno mepivacaina cloridrato come agente anestetico; e

c) sterilizzare la miscela ottenuta nella fase b).

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta fase c) viene condotta a una temperatura che varia da 120 a 140 °C.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui l'acido ialuronico ha un peso molecolare medio che varia da 50 000 a 10 000 000 Dalton.

4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui l'acido ialuronico reticolato della fase a) viene precedentemente ottenuto mediante la reticolazione di un acido ialuronico non reticolato con una quantità efficace di almeno un agente reticolante selezionato dal gruppo costituito da 1,4-butandiolo diglicidil etere (BDDE), 1,4-bis(2,3-epossipropossi)butano, 1,4-bis(glicidilossibutano), 1,2-bis(2,3-epossipropossi)etilene, 1-(2,3-epossipropil)-2,3-epossicicloesano, putrescina, spermidina, spermina e una relativa miscela.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.