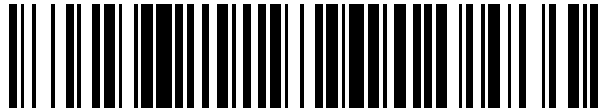


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 441**

51 Int. Cl.:

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 8/65 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2008 E 08780302 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2182971**

54 Título: **Composiciones que comprenden colágeno humano y elastina humana y usos de las mismas**

30 Prioridad:

27.07.2007 US 962289 P

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

27.03.2014

73 Titular/es:

**HUMACYTE, INC. (100.0%)
21 DAVIS DRIVE, SUITE 130
RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 277, US**

72 Inventor/es:

**NIKLASON, LAURA;
LI, YULING;
BLUM, JULIANA;
DAHL, SHANNON;
ERICKSON, GEOFFREY y
ZEIGLER, FRANK**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 451 441 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

Composiciones que comprenden colágeno humano y elastina humana y usos de las mismas

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud estadounidense provisional n.º 60/962.289, presentada el 27 de julio de 2007.

10 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere en general a composiciones que comprenden colágeno humano aislado y elastina humana aislada, y se refiere en general a usos de las mismas y a kits para el aumento de tejido blando que usan estas composiciones.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La piel natural está compuesta de muchos elementos, incluyendo queratinocitos y fibroblastos dérmicos, folículos pilosos, nervios y vasos sanguíneos. Los componentes de la matriz extracelular de la piel, que son responsables de la resistencia, elasticidad y turgencia de la piel sana, nativa, incluyen colágenos, elastina y glicosaminoglicanos. Las moléculas de colágeno proporcionan la mayor parte de las propiedades de tracción de todos los tejidos conjuntivos en el cuerpo humano, incluyendo la piel. La elastina es una proteína de larga vida que no obstante se descompone en la piel de individuos de mayor edad. La descomposición de la elastina contribuye a la piel flácida y las arrugas. La hidratación se retiene en la piel por la presencia de glicosaminoglicanos, que actúan como "esponjas" para retener el agua y proporcionar a la piel su turgencia natural. Sin estos componentes críticos de la matriz extracelular, la piel se adelgaza, aparecen arrugas y se debilita.

Se han desarrollado diversas formas de productos inyectables para el aumento de piel y otros tejidos blandos. Estos productos se clasifican en las categorías de sintéticos y "naturales", en las que los materiales naturales se derivan de tejidos animales o humanos. Los materiales sintéticos que se han usado como agentes de relleno tisular incluyen silicona, aceites y ceras, pero estos materiales se ven afectados por complicaciones en la cicatrización y son muy viscosos y difíciles de inyectar. Los materiales derivados de animales que se han descrito incluyen colágeno bovino en formas inyectables. Sin embargo, el colágeno bovino induce reacciones inmunitarias esporádicas en los receptores, debido al hecho de que los colágenos bovinos no son idénticos a los colágenos humanos y pueden servir como antígenos para la reactividad inmunitaria. Otros materiales de la matriz extracelular derivados de animales incluyen ácido hialurónico que se deriva de crestas de gallo. Este material es bastante viscoso y también tiene el inconveniente de no ser de origen humano. Adicionalmente, diversas preparaciones de elastina actualmente en uso tienen el inconveniente de inducir calcificación tras su implantación.

Las composiciones y los métodos de la presente invención abordan estos problemas y satisfacen una necesidad sentida desde hace mucho en la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones inyectables que comprenden colágeno humano aislado, elastina humana aislada y un portador farmacéuticamente aceptable, en las que la elastina humana es sustancialmente insoluble en agua con un peso molecular mayor que 100 kDa. La composición puede comprender colágeno humano aislado derivado de tejido vascular modificado por ingeniería o derivado de un cultivo sobre microperlas. La composición puede comprender elastina humana aislada derivada de tejido vascular modificado por ingeniería o tejido vascular nativo. La elastina humana aislada puede estar reticulada.

Las composiciones pueden incluir 10-100 mg/ml de colágeno humano aislado, más preferiblemente 30 mg/ml de colágeno humano aislado. El colágeno humano aislado puede tener un peso molecular de 100 a 500 kDa. Las composiciones pueden incluir de 2 a 60 mg/ml de elastina humana aislada, preferiblemente de 3 a 30 mg/ml de elastina humana aislada.

Las composiciones pueden incluir además glicosaminoglicanos humanos aislados. Las composiciones pueden incluir además uno o más agentes activos seleccionados del grupo que consiste en uno o más agentes antiinflamatorios, agentes de formación de tejido, agentes de formación de tejido adiposo, anestésicos, antioxidantes, heparina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos, péptidos activadores de tejido conjuntivo, β -tromboglobulina, factores de crecimiento similares a insulina, factores de necrosis tumoral, interleucinas, factores estimulantes de colonias, eritropoyetina, factores de crecimiento nerviosos, interferones o combinaciones de los mismos. Las composiciones pueden comprender además una o más células o tejidos, preferiblemente tejido adiposo o fibroblastos dérmicos.

La presente invención también proporciona rellenos dérmicos o subdérmicos incluyendo colágeno humano aislado, elastina humana aislada y un portador farmacéuticamente aceptable, en las que la elastina humana es sustancialmente insoluble en agua con un peso molecular mayor que 100 kDa.

Las composiciones pueden incluir además elastina aislada a partir de tejido vascular no congelado humano que es sustancialmente insoluble en agua. Las composiciones de la presente invención no inducen calcificación *in vivo*.

La presente invención también proporciona usos para el aumento de tejido blando en un sujeto que comprende, administrar una composición que comprende colágeno humano aislado, elastina humana aislada y un portador farmacéuticamente aceptable en los que la elastina humana es sustancialmente insoluble en agua con un peso molecular mayor que 100 kDa. El método del aumento de tejido blando puede mejorar estados incluyendo, pero sin limitarse a, líneas, pliegues, arrugas, depresiones faciales menores, labio leporino, corrección de deformidades menores debidas a envejecimiento o enfermedad, deformidades de las cuerdas vocales o la glotis, deformidades del labio, patas de gallo y el surco orbitario alrededor del ojo, deformidades de las mamas, aumento, deformidades del mentón; deformidades de los pómulos y/o la nariz, acné, cicatrices quirúrgicas, cicatrices debidas a daño por radiación o cicatrices por traumatismos y ritides. El tejido blando puede estar ubicado en el suelo pélvico, en la zona periuretral, próximo al cuello de la vejiga o en la unión de la vejiga y el uréter. El método de aumento de tejido blando puede aumentar el volumen tisular. Las composiciones pueden inyectarse en la piel o pueden inyectarse bajo la piel. Las composiciones incluyen elastina insoluble derivada de tejido vascular humano que no induce respuesta inflamatoria o inmunitaria y no induce calcificación.

La presente invención también incluye kits y usos de los kits para el aumento de un tejido blando. Los presentes kits incluyen colágeno humano aislado, elastina humana aislada y un portador farmacéuticamente aceptable, en los que la elastina humana es sustancialmente insoluble en agua con un peso molecular mayor que 100 kDa, una jeringa; un envoltorio estéril que rodea a dicha jeringa y que proporciona un entorno estéril para dicha jeringa y cualquier otro material y/o reactivos necesarios. Los kits también pueden incluir agentes seleccionados del grupo que consiste en heparina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos, péptidos activadores de tejido conjuntivo, β -tromboglobulina, factores de crecimiento similares a insulina, factores de necrosis tumoral, interleucinas, factores estimulantes de colonias, eritropoyetina, factores de crecimiento nerviosos, interferones, factores ostogénicos y proteínas morfogenéticas óseas.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En el caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos sólo son ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra los resultados de un gel de poliacrilamida que muestra los niveles muy altos de pureza de colágeno en esta preparación, en comparación con el control de colágeno bovino purificado.

La figura 2 ilustra los resultados de un gel de poliacrilamida que muestra inmunorreactividad de proteínas aisladas con anticuerpo contra elastina, que muestran que se aísla elastina que tiene pesos moleculares en el intervalo de aproximadamente 100 kDa o mayor.

La figura 3 ilustra el bajo grado de calcificación de preparaciones de elastina implantadas en un modelo de rata joven que muestra que la elastina aislada según la presente invención da como resultado niveles de calcificación que no pueden distinguirse del control de vehículo.

Figura 4 - Tinción con H&E y rojo de alizarina de elastina en comparación con elastina bovina purificada, comercial, implantada en ratas jóvenes que muestran que la calcificación de elastina que se aísla según el método de la invención es insignificante, mientras que la calcificación de la elastina bovina es extensa.

La figura 5 ilustra los resultados de la tinción con H&E y rojo de alizarina de elastina en comparación con aorta de rata singénica, implantada en ratas jóvenes, que muestran que la calcificación de elastina implantada es comparable a o menor que la inducida por la aorta singénica.

La figura 6 ilustra los resultados de la tinción con H&E y rojo de alizarina de elastina en comparación con portador de

solución salina tamponada con fosfato, implantados en ratas jóvenes que muestran que la calcificación de la elastina implantada es comparable a o menor que la inducida por el portador de solución salina.

5 La figura 7 ilustra los resultados de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie para determinar la proteína total que muestran que el colágeno humano aislado según la presente invención presenta una pureza muy alta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La presente invención proporciona composiciones tal como se definen en las reivindicaciones 1-9 para el aumento de piel y otros tejidos blandos. Preferiblemente, las composiciones se formulan para inyección. Las composiciones se componen de componentes de la matriz extracelular que se derivan de tejidos vasculares, incluyendo, pero sin limitarse a, colágenos, elastina y glicosaminoglicanos. Los elementos de la matriz extracelular se combinan de tal manera que mejoran su similitud con componentes de la matriz extracelular de la piel humana, y también para
15 aumentar su longevidad *in vivo* y para minimizar complicaciones de administración. La derivación de la matriz extracelular a partir de tejidos vasculares produce una formulación inyectable de “soporte vascular”, que fomenta que se infiltren vasos sanguíneos del huésped y soporten el producto inyectado. Tales composiciones de matriz extracelular derivadas de tejido vascular tienen la ventaja de incorporarse más fácilmente en el huésped, y de estimular la formación de vasos sanguíneos de alimentación en la piel u otro tejido blando tratado. Los componentes
20 de la matriz extracelular son completamente de origen humano, y pueden derivarse de tejidos modificados por ingeniería o nativos. A diferencia de otras formulaciones inyectables para el aumento de piel que contienen sólo colágenos o sólo hialuronanos derivados de animales, estas formulaciones contienen otros componentes de la matriz extracelular humana que los hacen más similares a piel humana sana, nativa.

25 Aumento de tejido blando

El aumento de tejido blando, tal como piel, puede ser un factor importante en la recuperación de una lesión o para fines cosméticos. Por ejemplo, con el envejecimiento normal, la piel se vuelve floja o pueden formarse arrugas, tal como pliegues nasolabiales. En la cara, arrugas o líneas pueden afectar de manera adversa a la autoestima o incluso la carrera de una persona. Por tanto, ha existido la necesidad de composiciones y métodos que puedan disminuir la aparición de arrugas o líneas.
30

Además, existen situaciones en las que la pérdida de tejido puede dejar una zona hundida en la piel. Por ejemplo la extirpación quirúrgica de un quiste dérmico, lipatrofia o tumor sólido puede dar como resultado la pérdida de volumen tisular. En otros casos, lesiones, tales como heridas por armas de fuego, heridas por armas blancas, u otras lesiones excavadas pueden dejar una zona hundida en la piel. Independientemente de la causa, puede ser deseable proporcionar un relleno adérmico que pueda aumentar el volumen de tejido para proporcionar un aspecto más liso o más uniforme.
35

40 Un ejemplo del soporte necesario es el aumento dérmico en la cara donde se pierde volumen dérmico y subdérmico debido a envejecimiento.

El término “aumento de tejido blando” incluye, pero no se limita a, lo siguiente: aumento de tejido dérmico; relleno de líneas, pliegues, arrugas, depresiones faciales menores, labio leporino y similares, especialmente en la cara y el cuello; corrección de deformidades menores debidas a envejecimiento o enfermedad, incluyendo en las manos y los pies, los dedos de las manos y los dedos de los pies; aumento de las cuerdas vocales o la glotis para rehabilitar el habla; agente hemostático, relleno dérmico de líneas de sueño y líneas de expresión; sustitución de tejido dérmico y subcutáneo perdido debido a envejecimiento; aumento de labios; relleno de patas de gallo y el surco orbitario alrededor del ojo; aumento de mamas; aumento de mentón; aumento de los pómulos y/o la nariz; agente de relleno para soporte periuretral, relleno de zonas hundidas en el tejido blando, dérmico o subcutáneo, debido a, por ejemplo, liposucción excesiva u otro traumatismo; relleno de cicatrices por traumatismo o acné y ritides; relleno de líneas nasolabiales, líneas nasoglabelares y líneas infrabucales. Además, la presente invención puede referirse al aumento de tejido duro. El término “tejido duro” incluye pero no se limita a hueso, cartílago y ligamento.
45
50

55 El tejido blando puede estar ubicado en el suelo pélvico, en la zona periuretral, próximo al cuello de la vejiga o en la unión de la vejiga y el uréter.

El término “aumento” significa la reparación, la disminución, la reducción o el alivio de al menos un síntoma o defecto atribuido debido a la pérdida o ausencia de tejido, proporcionando, suministrando, aumentando o sustituyendo tal tejido con las composiciones de la presente invención. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse para prevenir al menos un síntoma o defecto.
60

Se usan rellenos dérmicos para rellenar cicatrices, depresiones y arrugas. Las sustancias de relleno dérmico tienen diversas respuestas en la dermis desde fagocitosis hasta reacciones por cuerpos extraños dependiendo del material (Lemperle *et al.*, *Aesthetic Plast. Surg.* 27(5):354-366; discusión 367 (2003)). Un objetivo de los rellenos dérmicos es
65

aumentar temporalmente la dermis para corregir el contorno superficial de la piel sin producir una reacción inflamatoria inaceptable, reacción de hipersensibilidad o reacción por cuerpos extraños que provoca dolor, enrojecimiento o formación de cicatriz excesiva durante un periodo de tiempo.

5 El material ideal para el aumento de piel humana incluirá uno o más de los elementos críticos de la matriz extracelular que proporcionan a la piel sus propiedades mecánicas. Estos elementos incluyen colágeno, elastina y glicosaminoglicanos. Además, para obviar las respuestas inmunitarias, estos materiales deberán ser de manera óptima de origen humano. Los materiales humanos también inducirán menos reacción inflamatoria que los materiales derivados de animales, y por tanto probablemente persistirán más tiempo tras su inyección en el receptor,
10 ampliando y mejorando de ese modo el efecto cosmético de una formulación adecuada para inyección.

Muchos tipos de procedimientos de relleno dérmico pueden beneficiarse del uso de las composiciones de la presente invención. Los usos de la presente invención están diseñados (pero no se limitan) para usarse para proporcionar un aumento de volumen de un tejido que, a través de enfermedad, lesión o propiedad congénita, es
15 menos que el deseado. Las composiciones pueden prepararse para adecuarse a un fin particular, y tener tiempos de retención y propiedades físicas y/o químicas deseados.

Pueden ser particularmente deseables usos a modo de ejemplo de las composiciones de esta invención para rellenar tejido facial (por ejemplo, pliegues nasolabiales), para aumentar el volumen de la dermis en los labios, la nariz, alrededor de los ojos, los oídos y otro tejido fácilmente visible. Adicionalmente, las composiciones pueden usarse de manera deseable para proporcionar masa para aumentar el volumen de piel secundario a cirugías o lesiones excavadas. Por ejemplo, puede rellenarse el sitio alrededor de un quiste dérmico para disminuir la aparición de un hoyuelo en el sitio de la cirugía.

20 Como tal, la presente invención proporciona usos para el aumento de piel administrando las composiciones de matriz extracelular de la invención a un sujeto que lo necesita. Preferiblemente, los usos mejoran las arrugas de la piel y/o aumentan el volumen de piel. El sujeto o paciente tratado en la presente invención es un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Las siguientes propiedades o aplicaciones de estos métodos se describirán esencialmente para seres humanos aunque también pueden aplicarse a mamíferos no humanos, por ejemplo, simios, monos, perros, ratones, etc. Por tanto, la invención también puede usarse en un contexto veterinario.
25 30

Composiciones de proteínas de la matriz extracelular

35 La presente invención proporciona composiciones inyectables que comprenden colágeno humano aislado, elastina humana insoluble aislada con un peso molecular mayor que 100 kDa y un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden incluir proteínas y agentes activos adicionales tal como se describe en más detalle en el presente documento.

40 Las composiciones de la presente invención que combinan colágeno con otros elementos de piel nativa, tales como elastina, y en algunas realizaciones, glicosaminoglicanos, proporcionan un aumento de tejido, una elasticidad y una turgencia superiores, en comparación con composiciones que comprenden un único componente de la matriz extracelular (por ejemplo, colágeno). Estas composiciones que comprenden colágeno y elastina humanos aislados proporcionan un aumento de la persistencia *in vivo* en comparación con composiciones que comprenden colágeno solo, debido a la mejora de la similitud de la matriz de colágeno/elastina con piel humana natural.
45

Además, como los componentes de la matriz extracelular se derivan de tejidos vasculares humanos que se someten a descelularización antes del aislamiento de componentes de la matriz extracelular, las composiciones proporcionan una persistencia y retención más prolongadas *in vivo* (debido a menos descomposición inflamatoria), y tendrán menos tendencia a producir inflamación, calcificación y reacción inmunitaria, que los componentes derivados de fuentes animales y aislados sin una etapa de descelularización.
50

Con respecto a la calcificación, se sabe que existe esta complicación para diversas formas purificadas de elastina, aunque el mecanismo que provoca la calcificación sigue sin estar claro (Lee, *et al.*, American Journal of Pathology 2006; 168: 490-498; Daamen *et al.*, Biomaterials 2005; 26: 81-92; Hollinger *et al.*, Calcified Tissue International 1988; 42: 231-236; Urry *et al.*, Calcified Tissue Research 1976; 21: 57-65). Las hipótesis en competencia para la calcificación de elastina avanzadas por los expertos en la técnica incluyen la naturaleza intrínseca de los pentapéptidos de elastina para inducir calcificación, el papel fundamental de las metaloproteinasas en la inducción de calcificación y el papel fundamental de las impurezas de microfibrillas en la calcificación de elastina. Sin embargo, sigue sin conocerse la causa precisa de la calcificación de elastina *in vivo*.
55 60

Colágeno

Las composiciones de la presente invención se describen en las reivindicaciones 1-9. Preferiblemente, el colágeno humano se deriva de tejido modificado por ingeniería *in vitro* y tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 500 kDa. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención comprenden
65

10 mg/ml-100 mg/ml de colágeno humano aislado, preferiblemente 15 mg/ml-70 mg/ml de colágeno humano aislado, más preferiblemente 20 mg/ml-60 mg/ml de colágeno humano aislado y lo más preferiblemente 30 mg/ml de colágeno humano aislado.

5 Para producir colágeno humano aislado, se cultivan *in vitro* células vasculares humanas de modo que se maximice su producción de matriz colagenosa. Esto se logra mediante una combinación de factores de crecimiento y componentes de medio de cultivo seleccionados cuidadosamente, combinados con estímulos físicos de células (tales como estiramiento, cizallamiento o agitación) para aumentar la síntesis de matriz de colágeno (véase, por ejemplo la patente estadounidense n.º 6.537.567). Este tejido cultivado se somete entonces a un procedimiento de
10 descelularización que retira componentes celulares y deja una matriz extracelular a base principalmente de colágeno (véase, por ejemplo la patente estadounidense n.º 6.962.814). El colágeno en esta matriz puede aislarse entonces mediante uno de varios métodos conocidos en la técnica.

15 El colágeno derivado tal como se describió anteriormente tiene varias ventajas con respecto a colágeno derivado de tejidos nativos o usando métodos descritos anteriormente para derivar colágeno modificado por ingeniería. Los tejidos modificados por ingeniería se derivan de células que están depositadas en bancos y que se han examinado sumamente para determinar agentes infecciosos, lo que hace que este material sea generalmente más seguro que los materiales derivados de cadáveres. Además, el material se deriva de células de músculo liso vascular, dando como resultado un material de matriz extracelular "respetuoso con el tejido vascular" que soporta la formación de
20 vasos sanguíneos de alimentación. Además, este método para el aislamiento de colágeno incorpora una etapa de descelularización, mediante la cual se retiran activamente proteínas y componentes celulares de la matriz de colágeno. Esto proporciona un producto de matriz de colágeno sumamente puro (una pureza de al menos el 70-80% tal como se determina mediante cualquier ensayo conocido en la técnica, tal como análisis de SDS-PAGE) y disminuye la posibilidad de reacción inmunitaria frente a componentes que no son de la matriz extracelular.

25 Elastina

Las composiciones de la presente invención se describen en las reivindicaciones 1-9. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención comprenden elastina humana que está reticulada y es insoluble. Además,
30 es preferible que las composiciones de la presente invención comprendan elastina humana que tiene un peso molecular mayor que 100 kDa, tal como se determina mediante cualquier ensayo conocido en la técnica tal como análisis de SDS-PAGE. Además, las composiciones de la presente invención pueden comprender un tamaño de partícula menor que 200 µm, preferiblemente menor que 100 µm, más preferiblemente menor que 50 µm. Las composiciones comprenden 2-60 mg/ml de elastina humana aislada, preferiblemente 3-30 mg/ml de elastina humana aislada. La elastina reticulada aislada es sustancialmente insoluble en agua, en la que el contenido en elastina soluble en agua está en el intervalo del 0,1-10% en peso, preferiblemente en el intervalo del 0,1-8% en peso, más preferiblemente en el intervalo del 0,1-6% en peso, más preferiblemente en el intervalo del 0,1-4% en peso, más preferiblemente en el intervalo del 0,1-2% en peso y lo más preferiblemente en el intervalo del 0,1-1% en peso. Alternativamente, la elastina es completamente insoluble en agua. En algunas realizaciones, es preferible
40 tener elastina con una longitud de aminoácidos que permita la persistencia de la proteína *in vivo*.

Para producir elastina humana aislada, se cultivan *in vitro* células vasculares humanas de modo que se maximice su producción de elastina reticulada. La elastina reticulada será insoluble y permitirá la persistencia de la proteína *in vivo*. Aunque existen múltiples informes de células que producen monómeros de tropoelastina no reticulados en cultivo, se sabe que es muy difícil estimular la formación de elastina reticulada a partir de células vasculares humanas *in vitro*. Sin embargo, la presente solicitud describe condiciones de cultivo mediante las cuales se logra la creación de elastina insoluble, tal como se documenta por la presencia de reticulaciones de desmosina que son específicas para elastina. Estos tejidos que contienen elastina pueden someterse entonces a un procedimiento de descelularización (tal como se describió anteriormente para el colágeno), tras lo cual se recoge la elastina de la matriz restante usando una cualquiera de las varias técnicas convencionales conocidas en la técnica.
50

La pureza de elastina se evalúa normalmente mediante el perfil de aminoácidos en el producto final, y por la presencia de reticulaciones de desmosina, que son específicas para elastina reticulada e insoluble. Se han notificado las composiciones de aminoácidos de elastina de diversas especies (Starcher *et al.*, Analytical Biochemistry 1976; 74: 441-447). En particular, se sabe que concentraciones de residuos de alanina mayores que 200/1000 residuos totales, y residuos de valina mayores que 70/1000 residuos totales, son compatibles con elastina sumamente pura (Daamen *et al.*, Biomaterials 2001; 22: 1997-2005). Sin embargo, se notifican muchos métodos para el aislamiento de elastina purificada, y no se ha alcanzado ningún consenso con respecto al método óptimo para el aislamiento y la implantación de elastina (Daamen, W.F., Hafinans, T., Veerkamp, J.H., van Kuppevelt, T.H.,
60 "Isolation of intact elastin fibers devoid of microfibrils", Tissue Engineering 2005; 11: 1168-1176).

La elastina derivada tal como se describió anteriormente tiene varias ventajas con respecto a informes previos de aislamiento de elastina. La elastina se derivará de origen humano y no animal. Puesto que las células usadas para producir la elastina están depositadas en bancos y se derivan de tejido vascular humano, esto dará como resultado menor inmunogenicidad en los receptores humanos. La elastina así generada es de un tipo "vascular", lo que debe
65

fomentar también la infiltración de vasos sanguíneos en la zona tratada para soportar la reconstitución de tejido. El procedimiento de descelularización, como con la producción de colágeno, retira componentes celulares no deseados y potencialmente inmunogénicos de la matriz de elastina. Esto proporciona un producto de matriz de elastina sumamente puro (una pureza > 70-80% y significa que este producto de elastina tiene una menor propensión a reacción inmunitaria, inflamación y calcificación, que son complicaciones conocidas de la implantación de elastinas xenogénicas. Preferiblemente, la elastina humana aislada de la presente invención comprende reticulaciones de desmosina. Más preferiblemente, las reticulaciones de desmosina están presentes en elastina insoluble a una razón por más de 10.000 picomoles por miligramo de tejido vascular.

Además, la elastina humana también puede aislarse de vasos sanguíneos humanos nativos mediante medios que garantizan una pureza muy alta, y por tanto que minimicen las posibilidades de reacción inmunitaria, inflamación y calcificación. En efecto, la calcificación es una complicación particular asociada con la implantación de elastina, y por tanto el disponer de especies coincidentes y formaciones sumamente puras, que minimizarán la respuesta inflamatoria, son importantes para una función y un resultado cosméticos.

Una respuesta inmunitaria e inflamatoria puede medirse mediante diversos ensayos conocidos en la técnica tales como, pero sin limitarse a, ensayo de tetrámeros CMH-péptidos, ELISPOT, de citocinas intracelulares. En general, un aumento del 10-50% en los linfocitos T con respecto al nivel inicial (por ejemplo, estado normal de tipo natural), preferiblemente un aumento del 50% en los linfocitos T, más preferiblemente un aumento del 40% en los linfocitos T, y lo más preferiblemente un aumento del 30% en la producción de linfocitos T indica una respuesta inmunitaria significativa.

Los niveles de calcificación pueden medirse mediante diversos ensayos conocidos en la técnica tales como, pero sin limitarse a, espectroscopía atómica y tinción con H&E y rojo de alizarina. En general, una reducción del 75-99% en la calcificación, preferiblemente una reducción del 80% en la calcificación, más preferiblemente una reducción del 90% en la calcificación, lo más preferiblemente una reducción del 95% en la calcificación, indica una reducción significativa en la calcificación con las composiciones de la presente invención en comparación con otras formas de control de elastina tales como elastina bovina purificada (por ejemplo, de Elastin Products Co). Es decir, las composiciones de la presente invención no inducen una calcificación significativa, por ejemplo, una calcificación mayor que el 25%, preferiblemente una calcificación de entre el 5-20%, más preferiblemente de entre el 10 y el 15% en comparación con el control de vehículo (o el estado normal de tipo natural en un sujeto antes de su administración). Alternativamente, los niveles de calcificación de la preparación de elastina son indistinguibles del control de vehículo.

Se tratan vasos sanguíneos humanos con un procedimiento de descelularización que retira componentes celulares y glicosaminoglicanos. Preferiblemente, se extraen los vasos sanguíneos humanos de cordones umbilicales humanos desechados, pero pueden obtenerse de otras partes del cuerpo, incluyendo la aorta u otras arterias o venas principales.

Los vasos sanguíneos así tratados consisten principalmente en colágeno y elastina. Puede retirarse colágeno de tales vasos sanguíneos tratados mediante uno cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo tratamiento en autoclave, digestión con pepsina, digestión con colagenasa, tratamientos con alto contenido en sales, tratamientos alcalinos, etc. De esta manera, se retira la matriz de colágeno y se retiene la elastina.

Glicosaminoglicanos

Las composiciones de la presente invención también pueden incluir una cantidad eficaz de uno o más glicosaminoglicanos humanos aislados y un portador farmacéuticamente aceptable. Los glicosaminoglicanos humanos pueden aislarse de tejidos modificados por ingeniería. Los tejidos modificados por ingeniería, que se hacen crecer en un medio que contiene suero, producen una matriz extracelular con un mayor contenido en glicosaminoglicanos que los tejidos nativos correspondientes. Por tanto, la matriz extracelular sintetizada durante el cultivo contiene grandes cantidades de glicosaminoglicanos y es por consiguiente más "acuosa" que los tejidos nativos. Por tanto, los tejidos modificados por ingeniería son ideales para la producción y el aislamiento de glicosaminoglicanos, que unen agua y confieren turgencia tisular a tejidos conjuntivos.

Para producir glicosaminoglicanos humanos aislados, se cultivan células vasculares humanas en medio que contiene un alto contenido en suero (es decir > 10% en volumen de suero), y tras varias semanas, se retiran tejidos del cultivo y se tratan con hialuronidasa u otras enzimas de escisión de glicosaminoglicanos. Se recoge el sobrenadante de esta digestión, que contiene glicosaminoglicanos de alto peso molecular que pueden aislarse usando diálisis, centrifugación u otras técnicas conocidas en la técnica. Estos glicosaminoglicanos pueden usarse entonces para conferir turgencia tisular a una zona tratada.

Además, pueden derivarse glicosaminoglicanos humanos y ácido hialurónico humano de tejidos vasculares nativos. Se tratan vasos sanguíneos humanos nativos con una proteasa tal como pepsina o colagenasa, con el fin de romper la matriz extracelular fibrilar, confinante. Preferiblemente, se extraen los vasos sanguíneos nativos de cordones

umbilicales humanos desechados. Tal pretratamiento con proteasa expone los glicosaminoglicanos y hialuronanos a una disolución acuosa y permite su hinchamiento. Los glicosaminoglicanos y hialuronanos pueden recogerse entonces de los tejidos vasculares mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo tratamiento con hialuronidasa, tratamiento con detergente o tratamiento con otras enzimas que escinden restos de glicosaminoglicanos.

El sobrenadante recogido de este tratamiento puede purificarse entonces para obtener glicosaminoglicanos de alto peso molecular mediante cualquiera de una variedad de métodos, incluyendo diálisis, centrifugación, aislamiento inmunitario y precipitación, etc. Preferiblemente, los glicosaminoglicanos tienen un PM mayor que 100.000 kDa.

Agentes activos adicionales

Las composiciones de la presente invención también pueden incluir una cantidad eficaz de uno o más agentes activos y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, puede ser útil incluir uno o más agentes antiinflamatorios, agentes de formación de tejido, anestésicos, antioxidantes y similares, o combinaciones de los mismos.

Los agentes antiinflamatorios pueden incluir, pero no se limitan a, naproxeno, sulindaco, tolmetina, ketorolaco, celecoxib, ibuprofeno, diclofenaco, ácido acetilsalicílico, nabumetona, etodolaco, indometacina, piroxicam, inhibidores de la cox-2, ketoprofeno, medicamentos antiplaquetarios, salsalato, valdecoxib, oxaprozina, diflunisal, flurbiprofeno, corticosteroides, inhibidores de MMP y modificadores de leucotrienos o combinaciones de los mismos.

Los agentes que aumentan la formación de nuevos tejidos en el sitio de aplicación pueden incluir, pero no se limitan a, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y/o fragmentos de angiotensina II (A-II) o combinaciones de los mismos.

Los anestésicos pueden incluir, pero no se limitan a, los usados en aplicaciones caudales, epidurales, por inhalación, inyectables, retrobulbares y espinales, tales como bupivacaína, lidocaína, benzocaína, cetacaína, ropivacaína y tetracaína, o combinaciones de las mismas.

Los antioxidantes pueden incluir, pero no se limitan a, vitamina C, vitamina A, vitamina E, β -caroteno, superóxido dismutasa, catalasa, la selenoenzima glutatión peroxidasa, ubiquinonas/ubiquinoles, tioredoxina reductasa, ésteres propílico, octílico y dodecílico del ácido gálico, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) y ácido nordihidroguayarático o combinaciones de los mismos.

Las composiciones usadas en la invención pueden incluir adicionalmente uno o más agentes biológicamente activos para ayudar a ayudar en la cicatrización o el nuevo crecimiento de tejido natural. Por ejemplo, pueden incorporarse factores tales como heparina, péptidos activadores de tejido conjuntivo, β -tromboglobulina, factores de crecimiento similares a insulina, factores de necrosis tumoral, interleucinas, factores estimulantes de colonias, eritropoyetina, factores de crecimiento nerviosos, interferones, factores ostogénicos incluyendo proteínas morfogenéticas óseas, y similares.

Métodos de aislamiento y purificación de proteínas de la matriz extracelular

Existen numerosas técnicas reconocidas en la técnica que pueden usarse para extraer componentes de la matriz extracelular a partir de tejidos nativos y modificados por ingeniería. Enzimas específicas que pueden usarse para extraer componentes de la matriz de elastina y colágeno incluyen, pero no se limitan a, colagenasa; pepsina; tripsina; elastasa; metaloproteinasas de la matriz; dispasa; serina proteasas; otras proteasas adecuadas; altas concentraciones de sales tales como NaCl u otras sales; tratamiento alcalino; tratamiento ácido; calor (por ejemplo, tratamiento en autoclave, ebullición o cocción); detergentes (por ejemplo, SDS o CHAPS) y/o tratamiento hipotónico, (por ejemplo, agua) o combinaciones de estos tratamientos.

Existen numerosas técnicas reconocidas en la técnica que pueden usarse para aislar y purificar los componentes de la matriz extracelular que se extraen de los tejidos vasculares modificados por ingeniería o nativos. Tales métodos pueden incluir, pero no se limitan a, centrifugación; precipitación con sales de proteínas tales como colágeno; inmunoprecipitación; unión a perlas mediada por anticuerpos seguido por escisión para aislar el componente de la matriz; aislamiento basado en hidrofobicidad/hidrofilicidad (por ejemplo, extrayendo elastina hidrófoba mediante adhesión a un sustrato hidrófobo tal como poliestireno); diálisis (para retirar contaminantes de bajo peso molecular, enzimas, sal, ácido, por ejemplo); secado; alteración del pH de una disolución para inducir precipitación de componentes extracelulares; inactivación de enzimas que se usaron para el aislamiento; y/o métodos cromatográficos (por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de alta resolución que separan los componentes basándose en la carga y el peso molecular); o combinaciones de estos tratamientos.

Existen numerosas técnicas reconocidas en la técnica que pueden usarse para descellularizar tejidos modificados por ingeniería o nativos antes del aislamiento de la matriz extracelular, con el fin de aumentar la pureza de la matriz

extraída, potenciar su biocompatibilidad y persistencia *in vivo*, y para facilitar el aislamiento de componentes de la matriz seleccionados. En un ejemplo, disoluciones acuosas hipotónicas o de baja fuerza iónica facilitan la lisis celular en tejidos modificados por ingeniería y nativos a través de efectos osmóticos. Tales disoluciones pueden comprender agua desionizada o un tampón acuoso hipotónico (por ejemplo, a un pH de aproximadamente 5,5 a 8, preferiblemente de aproximadamente 7 a 7,5). La descelularización puede lograrse usando una única disolución de descelularización, o el constructo puede incubarse secuencialmente en dos o más disoluciones. Otro enfoque implica la inmersión del constructo en disoluciones hipertónicas e hipotónicas alternas.

Los agentes de descelularización preferidos incluyen, pero no se limitan a, sales, agentes detergentes/de emulsión y enzimas tales como proteasas y/o nucleasas. Pueden emplearse combinaciones de diferentes clases de detergentes, por ejemplo, un detergente no iónico tal como Triton X-100 (terc-octilfenilpolioxietileno) y un detergente iónico tal como SDS (dodecilsulfato de sodio). Preferiblemente, una o más disoluciones de descelularización incluyen Triton X-100, CHAPS (1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amonio]), o SDS en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Otros detergentes adecuados incluyen monooleato de sorbitano-polioxietileno (20) y monooleato de sorbitano-polioxietileno (80) (Tween 20 y 80), desoxicolato de sodio y octil-glucósido. En determinadas realizaciones preferidas, se incluyen diversos aditivos tales como quelantes de iones metálicos, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y/o inhibidores de proteasa, en la disolución de descelularización. Los inhibidores de proteasa adecuados para su uso en disoluciones de descelularización incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina y N-etilmaleimida (NEM).

Pueden incluirse diversas enzimas que degradan componentes celulares en la disolución de descelularización. Tales enzimas incluyen nucleasas (por ejemplo, ADNasas tales como ADNasa I, ARNasas tales como ARNasa A) y fosfolipasas (por ejemplo, fosfolipasa A o C). Determinadas proteasas tales como dispasa II, tripsina y termolisina pueden ser útiles en la descelularización. La disolución de descelularización incluye preferiblemente un tampón. En general, se emplea un pH de entre aproximadamente 5,5 y 8,0, preferiblemente de entre aproximadamente 6,0 y 7,8, más preferiblemente de entre aproximadamente 7,0 y 7,5. Los tampones preferidos incluyen tampones orgánicos tales como tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N-[2-etanosulfónico] (HEPES), etc. También pueden usarse tampones que incluyen glutamato, acetato, bicarbonato, citrato o fosfato de sodio.

Pueden emplearse fuerzas físicas tales como la formación de hielo intracelular como medio primario para lograr la descelularización o para aumentar la actividad de disoluciones de descelularización. Un enfoque de este tipo denominado congelación en fase de vapor implica colocar el constructo o tejido en una disolución apropiada, por ejemplo, una disolución de crioconservación convencional tal como medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), dimetilsulfóxido al 10% (DMSO), suero bovino fetal al 10% (FBS) y enfriamiento a una velocidad lenta, por ejemplo, 1-2°C. Pueden emplearse múltiples ciclos de congelación-descongelación. Pueden añadirse materiales que forman coloides a la disolución para reducir la formación de hielo extracelular a la vez que se permite la formación de hielo intracelular. Los materiales apropiados incluyen polivinilpirrolidona (al 10% p/v) y hidroxietilalmidón dializado (al 10% p/v).

Composiciones farmacéuticas y modos de administración

Los compuestos de la presente invención se administran a un paciente en forma de una composición farmacéutica. Un compuesto que se administra en una composición farmacéutica se mezcla con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable de manera que esté presente una cantidad terapéuticamente eficaz en la composición.

Por "farmacéuticamente aceptable" quiere decirse un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material puede incorporarse en una composición farmacéutica administrada a un paciente sin provocar ningún efecto biológico indeseable ni interaccionar de manera perjudicial con ninguno de los demás componentes de la composición en la que está contenido. Cuando el término "farmacéuticamente aceptable" se usa para referirse a un portador o excipiente farmacéutico, se da a entender que el portador o excipiente ha cumplido con las normas requeridas de pruebas toxicológicas y de fabricación o que está incluido en la Guía de Principios Inactivos (Inactive Ingredient Guide) preparada por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos. "Farmacológicamente activo" (o simplemente "activo") como en un derivado o análogo "farmacológicamente activo", se refiere a un derivado o análogo que tiene el mismo tipo de actividad farmacológica que el compuesto original y de grado aproximadamente equivalente.

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad del compuesto que no es tóxica y es necesaria para lograr un criterio de valoración o efecto terapéutico deseado (por ejemplo, actúa como un relleno dérmico o subdérmico).

Puede usarse una variedad de preparaciones para formular las composiciones o agentes activos de la presente invención para hacer que las composiciones farmacéuticas sean más apropiadas. Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, vigésima edición," Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA. Para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir normas

de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza tal como requiere la FDA. La administración de la composición farmacéutica puede realizarse de una variedad de maneras, tal como se describe en el presente documento.

5 El agente activo puede administrarse, si se desea, en forma de una sal, un éster, una amida, un profármaco, un derivado, o similares, siempre que la sal, el éster, la amida, el profármaco o el derivado sea farmacológicamente adecuado. Pueden prepararse sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de los agentes activos usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica de síntesis y descritos, por ejemplo, por J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 4ª ed. (Nueva York: Wiley-Interscience, 1992).

10 La cantidad de agente activo (por ejemplo, colágeno, elastina, etc.) administrado dependerá de varios factores y variará de un sujeto a otro y dependerá del fármaco particular administrado, el trastorno o estado particular que esté tratándose, la gravedad de los síntomas, la edad, el peso y el estado general del paciente y el criterio del médico que prescribe. La cantidad mínima de fármaco está determinada por el requisito de que deben estar presentes cantidades suficientes de fármaco en un dispositivo o una composición para mantener la tasa de liberación deseada con respecto al periodo de aplicación dado. La cantidad máxima para fines de seguridad está determinada por el requisito de que la cantidad de fármaco presente no puede superar una tasa de liberación que alcance niveles tóxicos. Generalmente, la concentración máxima está determinada por la cantidad de agente que puede recibirse en el portador sin producir efectos histológicos adversos tales como irritación, un pulso inicial inaceptablemente alto de agente en el cuerpo, o efectos adversos sobre las características del dispositivo de administración tales como la pérdida de pegajosidad, viscosidad o deterioro de otras propiedades.

15 El término "forma de dosificación" indica cualquier forma de una composición farmacéutica que contiene una cantidad de agente activo suficiente para lograr un efecto terapéutico con una única administración. Cuando la formulación es una inyección, la forma de dosificación es habitualmente una inyección de este tipo. La frecuencia de administración que proporcionará los resultados más eficaces de manera eficiente sin sobredosis variará con las características del agente activo particular, incluyendo tanto sus características farmacológicas como sus características físicas.

20 Las composiciones de la presente invención también pueden formularse para liberación controlada o liberación sostenida. El término "liberación controlada" se refiere a una formulación que contiene fármaco o fracción de la misma en la que la liberación del fármaco no es inmediata, es decir, con una formulación de "liberación controlada", la administración no da como resultado una liberación inmediata del fármaco en una reserva de absorción. El término se usa de manera intercambiable con "liberación no inmediata" tal como se define en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, novena ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995). En general, el término "liberación controlada" tal como se usa en el presente documento incluye formulaciones de liberación sostenida y liberación retardada.

25 El término "liberación sostenida" (sinónimo de "liberación prolongada") se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación farmacológica que prevé una liberación gradual de un fármaco a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, y que preferiblemente, aunque no necesariamente, da como resultado niveles en sangre sustancialmente constantes de un fármaco a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

30 Las presentes formulaciones también pueden incluir aditivos convencionales tales como opacificantes, colorantes, agentes gelificantes, agentes espesantes, estabilizadores, tensioactivos, y similares. También pueden añadirse otros agentes, tal como agentes antimicrobianos, para impedir que se estropeen con el almacenamiento, es decir, para inhibir el crecimiento de microbios tales como levaduras y mohos. Se seleccionan normalmente agentes antimicrobianos adecuados del grupo que consiste en los ésteres metílico y propílico del ácido p-hidroxibenzoico (es decir, metil y propilparabeno), benzoato de sodio, ácido sórbico, imidourea, y combinaciones de los mismos.

35 La administración de un compuesto de la invención puede llevarse a cabo usando cualquier modo de administración apropiado. Por tanto, la administración puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, tópica, transdérmica, transmucosa (incluyendo rectal y vaginal), sublingual, mediante inhalación, o mediante un depósito implantado en una forma de dosificación.

40 Dependiendo del modo de administración pretendido, la formulación farmacéutica puede ser un sólido, semisólido o líquido, tal como, por ejemplo, un comprimido, una cápsula, un comprimido oblongo, un líquido, una suspensión, una emulsión, un supositorio, gránulos, microgránulos, perlas, un polvo, o similares, preferiblemente en forma de dosificación unitaria adecuada para la administración única de una dosificación precisa. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas y forma de dosificación adecuadas usando métodos convencionales conocidos por los expertos en el campo de la formulación farmacéutica y descritos en los textos y la bibliografía pertinentes, por ejemplo, en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995).

45 El régimen de dosificación dependerá de varios factores que pueden determinarse fácilmente, tales como la

5 gravedad del estado y la capacidad de respuesta del estado que va a tratarse, pero será normalmente de una o más dosis al día, con un ciclo de tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se logra una disminución del estado patológico. Un experto habitual puede determinar fácilmente dosificaciones, metodologías de dosificación y tasas de repetición óptimas. En general, se contempla que la formulación se aplique de una a cuatro veces al día. Con un parche para la piel, el dispositivo se mantiene generalmente en su sitio sobre la superficie corporal durante la totalidad de un periodo de administración de fármaco, normalmente en el intervalo de 8 a 72 horas, y se sustituye según sea necesario.

10 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía parenteral a un sujeto/paciente que necesita tal tratamiento. El término "parenteral" tal como se usa en el presente documento pretende incluir inyección subcutánea (dérmica o subdérmica), intravenosa e intramuscular o implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular o mediante inyección intramuscular).

15 Las preparaciones según esta invención para la administración parenteral incluyen emulsiones, suspensiones y disoluciones estériles acuosas o no acuosas. Las disoluciones acuosas inyectables contienen el agente activo en forma soluble en agua. Los ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos incluyen aceites grasos, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, alcoholes de bajo peso molecular tales como propilenglicol, polímeros hidrófilos sintéticos tales como polietilenglicol, liposomas, y similares. Las formulaciones parenterales también pueden contener adyuvantes tales como solubilizantes, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizadores, y las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y dextrano. Las formulaciones inyectables se vuelven estériles mediante la incorporación de un agente esterilizante, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, irradiación o calor. También pueden fabricarse usando un medio inyectable estéril. El agente activo también puede estar en forma secada, por ejemplo, liofilizada, que puede rehidratarse con un vehículo adecuado inmediatamente antes de su administración mediante inyección.

25 La cantidad de principio activo y el volumen de composición que van a administrarse dependen del animal huésped que va a tratarse. Las cantidades precisas de compuesto activo requeridas para la administración dependen del criterio del médico y son peculiares para cada individuo.

30 Normalmente se utiliza un volumen mínimo de una composición requerido para dispersar los compuestos activos. Los regímenes para la administración adecuados también son variables, pero se tipificarán administrando inicialmente el compuesto y monitorizando los resultados y proporcionando luego dosis controladas adicionales a intervalos adicionales.

35 Un portador para la administración parenteral puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede provocarse que se evite la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede provocarse una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. También es ventajoso incluir una o más células o tejidos que pueden complementar el uso de la composición de la presente invención. Por ejemplo, se prefiere incluir células o tejido adiposo, fibroblastos dérmicos o una combinación de los mismos.

40 Los conservantes adecuados para su uso en disolución incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH a entre aproximadamente pH 6 y pH 8, y preferiblemente, entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5. Agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio, y similares, de manera que el equivalente de cloruro de sodio de la disolución oftálmica esté en el intervalo de 0,9 más o menos el 0,2%. Los antioxidantes y estabilizadores adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, tiourea y similares. Los agentes humectantes y clarificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Los agentes de aumento de la viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares.

50 Las composiciones de la invención pueden formularse para la administración parenteral mediante la disolución, suspensión o emulsionamiento en un disolvente acuoso o no acuoso. Aceites vegetales (por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de cacahuete) o aceites similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos

alifáticos superiores y propilenglicol son ejemplos de disolventes no acuosos. También pueden usarse disoluciones acuosas tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Pueden prepararse disoluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacéuticamente aceptables en agua mezcladas adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En las condiciones de almacenamiento y uso habituales, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos componentes de los otros enumerados a continuación, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado a vacío y secado por congelación que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución esterilizada por filtración previamente de los mismos.

También se contempla la preparación de disoluciones más, o sumamente, concentradas para inyección subcutánea o intramuscular. A este respecto, se prefiere el uso de DMSO como disolvente ya que éste dará como resultado una penetración extremadamente alta, suministrando altas concentraciones del/de los agente(s) o compuesto(s) activo(s) a una pequeña zona.

La presente invención también proporciona kits para realizar el aumento de tejido blando. Tales kits pueden prepararse a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles y pueden venir en una variedad de realizaciones. Por ejemplo, tales kits pueden comprender, en una cantidad suficiente para al menos un tratamiento, uno cualquiera o más de los siguientes materiales: elastina y colágeno humanos aislados mediante métodos de la presente invención, tampones esterilizados (por ejemplo, sal tamponada con fosfato) o agua, otros reactivos necesarios o útiles para realizar el método, e instrucciones. Normalmente, las instrucciones incluyen una expresión tangible que describe la concentración de reactivo o al menos un parámetro del método, tal como la cantidad de reactivo que va a usarse, periodos de tiempo de mantenimiento para los reactivos, y similares, para permitir que el usuario lleve a cabo los métodos descritos anteriormente. En una realización preferida de la invención, un kit comprende un medio para la administración. Tal medio puede incluir, a modo de ilustración y sin limitación, una jeringa pequeña (de calibre 22 a 27), una jeringa grande (de calibre 13 a 19) y equipo usado en procedimientos de disectomía percutánea o endoscópica. Los reactivos pueden proporcionarse en disolución, como suspensiones, o como un polvo sustancialmente seco, por ejemplo, en forma liofilizada, o bien independientemente o bien en una mezcla de componentes para mejorar la facilidad de uso. Cuando se proporciona un reactivo degradable, se eligen condiciones de modo que se estabilice el reactivo, por ejemplo, almacenamiento a menor temperatura, adición de agentes estabilizantes (por ejemplo, glicerol o un agente reductor). Pueden proporcionarse reactivos inestables junto con o por separado de los componentes más estables del kit.

Aunque se ha descrito la invención junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos en modo alguno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Aislamiento de colágeno a partir de tejido vascular modificado por ingeniería

Se modifican por ingeniería tejidos vasculares de células de músculo liso vascular humano según métodos descritos previamente (Niklason *et al.*, Science 284(5413):489-93, 1999). Brevemente, se siembran células de músculo liso vascular procedentes de fuentes de células vasculares humanas seleccionadas y depositadas en bancos, sobre un andamiaje fibroso sintético tubular que comprende fibras de poli(ácido glicólico). Se enrosca el andamiaje sembrado tubular sobre tubo de silicona distensible dentro de un biorreactor estéril. Se llena el biorreactor con medio de cultivo que soporta la síntesis de colágeno por células vasculares. Específicamente, este medio comprende medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 20% u otro suero, ácido ascórbico (50 mg/l), factores de crecimiento tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (10 ng/ml), factor de crecimiento de fibroblastos básico (10 ng/ml), factor de crecimiento epidérmico (3 ng/ml), prolina 50 mg/l, glicina 50 mg/l, alanina 20 mg/l, sulfato de cobre 3 ng/ml. También pueden incluirse en el medio de cultivo otros

componentes de medio que soportan el crecimiento de células y/o la producción de matrices extracelulares. Puede suministrarse una deformación radial pulsátil cíclica a los constructos tubulares sobre el tubo de silicona bombeando fluido a través del tubo, siendo las distensiones más preferibles del 1-5%. Alternativamente, puede omitirse la deformación cíclica durante el cultivo, con el fin de simplificar el sistema de cultivo. Se mantiene el cultivo durante 2-10 semanas, tiempo durante el que se sintetiza matriz colagenosa por las células de músculo liso vascular.

Al concluir el cultivo, se descelulariza el tejido vascular modificado por ingeniería usando técnicas similares a las notificadas en la técnica (Dahl, Cell Transplant 12(6):659-66, 2003). Específicamente, la descelularización a base de detergente puede incorporar dos disoluciones de tratamiento diferentes. La disolución 1 incluye CHAPS 8 mM, NaCl 1,0 M y EDTA 25 mM en PBS. Se exponen tejidos vasculares modificados por ingeniería a esta disolución durante una hora. Tras aclarados con PBS, entonces se exponen los tejidos vasculares modificados por ingeniería a la disolución 2 durante una hora. La disolución 2 incluye dodecilsulfato de sodio 1,8 mM, NaCl 1,0 M y EDTA 25 mM en PBS. Entonces se aclaran los vasos modificados por ingeniería con PBS y se vuelven acelulares mediante este procedimiento. Se realizan todos los tratamientos a temperatura ambiente o a aproximadamente 37°C.

Se usan las siguientes etapas para aislar y purificar el colágeno de los tejidos vasculares humanos modificados por ingeniería, descelularizados:

1. Comenzar con un material modificado por ingeniería celular. Cortar, seccionar, combinar, cortar en trozos pequeños.

2. Digerir el material tisular en pepsina (una concentración de pepsina de 0,5 a 2,0 mg/ml disuelta en una disolución de bajo pH) a 4-20°C. La agitación durante la digestión ayudará en el procedimiento.

3. Una vez que se ha completado la digestión, centrifugar brevemente para retirar cualquier cantidad de material no digerido.

4. Retirar el sobrenadante y elevar el pH de la disolución hasta aproximadamente pH 8,5 añadiendo lentamente NaOH para inactivar la pepsina.

5. Usando HCl, llevar el pH de la disolución de nuevo a aproximadamente pH 3,5.

6. Clarificar la disolución de colágeno usando tierra de diatomeas.

7. Precipitar el colágeno clarificado añadiendo NaCl a la disolución. Precipitar a 4°C durante > 24 h.

8. Recoger el colágeno precipitado mediante centrifugación con enfriamiento a altas velocidades durante ~30 minutos.

9. Aspirar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender los colágenos precipitados en HCl enfriado con hielo. Permitir que las moléculas de colágeno se solubilizan completamente.

10. Dializar la disolución para purificar adicionalmente el colágeno.

11. Concentrar el colágeno hasta el nivel deseado.

12. Almacenar este colágeno purificado en disolución.

13. Añadir disolución de difosfato de sodio esterilizada por filtración al colágeno concentrado, purificado, hasta que se alcance una concentración final de aproximadamente 20-50 mM y aproximadamente pH 7,4. Incubar a 22-37°C durante > 24 horas.

14. Se formará un precipitado fibroso blanco opaco, que contiene grandes fibrillas de colágeno macromoleculares.

15. Centrifugar para obtener la alta concentración resultante de colágeno fibrilar para inyección, desechando el sobrenadante.

Usando estas etapas, se extrae colágeno de tejidos descelularizados, modificados por ingeniería. Entonces se hizo correr el colágeno extraído sobre un gel de poliacrilamida para evaluar la conservación de la pureza y morfología de cadena. La figura 1 muestra los niveles muy altos de pureza de colágeno en esta preparación, en comparación con el control de colágeno bovino purificado. Por tanto, los métodos de este ejemplo producen colágeno sumamente puro a partir de tejidos vasculares modificados por ingeniería.

Ejemplo 2. Aislamiento de elastina a partir de tejido vascular modificado por ingeniería

Normalmente la síntesis de elastina insoluble, reticulada en células cultivadas es bastante difícil. Aunque existen muchos informes de la síntesis de monómeros de tropoelastina no reticulados, la creación de elastina reticulada, documentada es extremadamente rara. La mayoría de informes de producción de elastina insoluble utilizan células que se han modificado por ingeniería genética, por ejemplo para expresar altos niveles de proteína tropoelastina, o para expresar variantes de versicano que estimulan la deposición de elastina. Alternativamente, se ha notificado que células de roedores derivadas de animales neonatales sintetizan elastina. Sin embargo, la elastina no humana está asociada con riesgos de rechazo inmunitario si se inyecta en un receptor humano. Además, la utilización de células modificadas genéticamente para generar elastina humana conlleva riesgos intrínsecos de transferir material transgénico a cualquier receptor eventual del material de matriz extracelular.

Por tanto, es ventajoso concebir métodos para generar elastina insoluble, reticulada a partir de células humanas cultivadas, sin el uso de ingeniería genética. En particular, el uso de células vasculares humanas que están depositadas en bancos y que se han examinado para determinar agentes infecciosos también ayuda a reducir cualquier riesgo infeccioso de la elastina resultante que se produce.

Los métodos de la presente invención cultivan tejidos vasculares humanos para produce cantidades medibles de elastina reticulada, insoluble, tal como se indica mediante el análisis de desmosina. Entonces pueden descelularizarse tales tejidos y extraerse y purificarse la elastina dentro de estos tejidos. En un ejemplo, se siembran células de músculo liso vascular humano sobre andamiajes de poli(ácido glicólico) en biorreactores, de manera análoga al procedimiento descrito en el ejemplo 1. Puede aplicarse una deformación cíclica a través del tubo de silicona luminal, o puede omitirse, con el fin de simplificar las condiciones de cultivo. El tiempo de cultivo total puede variar entre 2-10 semanas. En este ejemplo, el tiempo de cultivo total es de 3 semanas. El medio de cultivo que está diseñado para estimular la síntesis de elastina durante las dos primeras semanas de cultivo contiene los siguientes componentes:

1. 400 ml de DMEM con bajo contenido de glucosa
2. 100 ml de suero humano
3. 5 ml (50.000 U) de penicilina G
4. 2,5 mg de insulina,
5. 0,5 µg de CuSO₄
6. Alícuota de 5 ml de glicina/alanina/valina/prolina (30 mg/18 mg/17,5 mg/11,5 mg)
7. Dexametasona 10⁻⁸-10⁻¹⁰ M
8. 2,5 µg de TGF-beta

Con el fin de estimular adicionalmente la síntesis de elastina por células de músculo liso vascular humano cultivadas dentro del tejido modificado por ingeniería, se usa el siguiente medio durante la semana final de cultivo:

1. 475 ml de DMEM con bajo contenido de glucosa
2. 25 ml de suero humano
3. 5 ml (50.000 U) de penicilina G
4. 2,5 mg de insulina, (5 µg/ml)
5. 1,5 µg de CuSO₄
6. Alícuota de 5 ml de glicina/alanina/valina/prolina (30 mg/18 mg/17,5 mg/11,5 mg)
7. Dexametasona 10⁻⁸-10⁻¹⁰ M
8. 2,5 µg de TGF-beta (5 ng/ml)

Usando estas condiciones de cultivo, se generan tejidos vasculares modificados por ingeniería que contienen elastina, células y otros componentes de la matriz. Al concluir el cultivo, se someten los tejidos vasculares modificados por ingeniería al procedimiento de descelularización descrito en el ejemplo 1. De forma posterior a este

procedimiento de descelularización, se someten a análisis los tejidos intactos y descelularizados para determinar desmosina, que es un componente reticulado covalente en la elastina madura. La presencia de desmosina indica la producción de elastina madura por los tejidos vasculares modificados por ingeniería. La tabla 1 contiene los resultados de desmosina para una variedad de tejidos vasculares modificados por ingeniería, tanto intactos como descelularizados.

Tabla 1

Muestras	pmol de desmosina/mg de proteína	pmol de desmosina/mg de tejido
Fresca-1	32	25
Fresca-2	29	27
Fresca-3	37	20
Fresca-4	49	35
Fresca-5	57	26
Fresca-6	67	29
Fresca-7	41	12
Descelularizada-1	53	29
Descelularizada-2	31	34
Descelularizada-3	39	19
Descelularizada-4	55	46
Descelularizada-5	37	25
Descelularizada-6	28	35
Descelularizada-7	64	51

La tabla 1 muestra que están presentes reticulaciones de elastina-desmosina en tejidos modificados por ingeniería intactos, y se retienen tras el procedimiento de descelularización. Por tanto, es factible modificar por ingeniería la elastina reticulada que es estable tras la retirada de constituyentes celulares. Entonces puede lograrse el aislamiento de elastina a partir de tejidos vasculares modificados por ingeniería y descelularizados, mediante uno cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, tratamiento en autoclave, tratamiento alcalino o ácido, digestión con pepsina o colagenasa, o combinaciones de estos tratamientos.

Ejemplo 3. Aislamiento de elastina a partir de vasos umbilicales humanos nativos

Se aísla elastina a partir de vasos sanguíneos humanos nativos, tales como los aislados de cordones umbilicales desechados. Se descelularizan los vasos y luego se aísla la elastina de la matriz extracelular resultante. Las disoluciones para el procedimiento de descelularización son las descritas en el ejemplo 1. Las etapas usadas en el procedimiento de descelularización y aislamiento de elastina son tal como sigue:

1. Descongelar la arteria o vena umbilical congelada durante la noche a 4°C.
2. Registrar la longitud y el peso del vaso.
3. Descelularizar el vaso en la disolución 1 durante 12 h.
4. Aclarar 2 veces con solución salina tamponada con fosfato, 5 min. cada vez.
5. Descelularizar en la disolución 2 durante 12 h.
6. Aclarar 3 veces con solución salina tamponada con fosfato, 5 min. cada vez.
7. Digerir la arteria o vena umbilical descelularizada con pepsina o colagenasa a 37°C o temperatura ambiente durante 1-5 h con agitación suave. Esto retira los componentes de la matriz extracelular distintos a elastina.
7. Alternativamente, pueden tratarse en autoclave los vasos descelularizados durante 3-4 ciclos a 121°C durante 30 min. o 115°C durante 20 min., para retirar los componentes de la matriz extracelular distintos a elastina.
8. Aclarar el tejido digerido o tejido tratado en autoclave con agua destilada.
9. Congelar rápidamente el tejido en hielo seco.
10. Liofilizar el tejido durante la noche.
11. Someter la elastina resultante a análisis de aminoácidos para evaluar su pureza.
12. Digerir adicionalmente la elastina purificada con pepsina para producir un tamaño de partícula inyectable.

13. Alternativamente, descomponer mecánicamente la elastina usando un mortero/mano de mortero o un molino o un homogeneizador, para producir partículas de un tamaño apropiado para productos inyectables, preferiblemente menor que aproximadamente 200 µm, más preferiblemente menor que aproximadamente 100 µm, lo más preferiblemente menor que aproximadamente 50 µm.

Se tratan vasos umbilicales humanos según las etapas de este ejemplo, y se analizan para determinar el contenido de aminoácidos para determinar la pureza de la elastina (etapa 12 anterior). La tabla 2 indica las etapas de preparación exactas de la lista anterior que se usan para cada muestra.

TABLA 2:

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8
Extracción con NaCl	y				y			
Autoclave	115°C	115°C	115°C	115°C	121°C	121		
Deslipid.	Y	y	y	y	y	y		
Descel.						y	y	y
Pepsina							37°C	TA

La tabla 3 muestra los resultados del análisis de aminoácidos de las elastinas purificadas resultantes.

TABLA 3 Los valores son residuos/1000

N.º de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	Esperado
*CVS	16	0	24	2	23	3	0	0	3
asx	93	73	92	88	96	38	94	79	2
thr	38	23	45	42	43	21	38	28	14
ser	31	24	34	31	34	13	37	30	9
glx	111	98	120	116	125	51	100	88	3
pro	87	104	76	84	68	113	94	144	129
gly	202	352	145	157	134	286	273	326	312
ala	96	120	100	107	99	197	97	110	239
val	73	37	76	81	78	123	55	41	137
*met	6	0	5	14	0	0	0	0	0
ile	44	24	48	53	50	31	52	28	24
leu	76	40	85	84	88	66	69	45	65
*tyr	0	0	3	2	0	0	0	0	23
phe	28	15	33	34	35	26	29	20	24
his	1	0	8	6	23	0	0	0	0
lys	50	36	60	57	59	25	33	29	9
arg	47	54	46	43	44	8	30	32	9

En la tabla 3, la columna "Esperado" indica el número de residuos de aminoácido por 1000 residuos de aminoácido que se esperaría en el caso de elastina humana completamente pura. Queda claro a partir de la tabla 3 que la muestra 6 contiene la elastina aislada más sumamente pura. Se preparó esta muestra usando descclularización y extracción en autoclave (véase la tabla 2). Por tanto, a diferencia de las técnicas notificadas previamente que afirman aislar elastina pura a partir de otros tipos de tejidos, se había encontrado que los tejidos vasculares humanos requieren una etapa de descclularización adicional con el fin de aislar elastina de una pureza suficiente. Este hallazgo contrasta con múltiples informes en la bibliografía que afirman que el tratamiento en autoclave solo, cuando se aplica a otros tejidos tales como ligamento nugal bovino, produce una preparación de elastina sumamente pura (Lee *et al.*, American Journal of Pathology 2006; 168: 490-498). A partir de la tabla 3, queda claro que métodos convencionales tales como el tratamiento en autoclave, sin una etapa de descclularización adicional, producen productos de elastina sumamente impuros cuando se aplican a material vascular de cordón umbilical humano nativo.

Ejemplo 4. Aislamiento de elastina a partir de aorta humana nativa

También se purifica elastina a partir de aorta humana. El procedimiento implica una etapa de descclularización a base de sales, seguida por ebullición en NaOH 0,1 N y luego extracción con disolventes hidrófobos. El aislamiento de elastina según este ejemplo tiene propiedades inesperadas cuando se implanta *in vivo*, tal como se muestra en el ejemplo 5 (a continuación). Las etapas para purificar elastina a partir de aorta según la presente invención son tal como sigue:

1. Obtener el peso en húmedo de aorta. La aorta es preferiblemente fresca o no congelada.
2. Triturar la aorta usando una mezcladora o algún otro dispositivo en agua destilada.
3. Extraer los tejidos triturados a intervalos de 1 hora en disolución de NaCl al 0,9% a 4°C con agitación.

4. Repetir la extracción con NaCl hasta que el ensayo de proteínas no muestre extracción de proteínas solubles.
5. Suspender las muestras en disolución de NaOH 0,1 N en ebullición, llevar a ebullición durante 40-45 minutos.
6. Desechar la disolución de NaOH, luego aclarar con agua destilada.
7. Extraer la elastina 3 veces, 30 minutos cada vez, con el 100% de etanol a temperatura ambiente.
8. Extraer la elastina en el 50% de etanol/el 50% de dietil éter durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Extraer la elastina en el 100% de dietil éter durante 1 hora a temperatura ambiente.
10. Decantar el éter, secar durante la noche. Obtener el peso final.
11. Moler o pulverizar para crear partículas de elastina inyectables e insolubles.

Se lleva a cabo el análisis de aminoácidos, junto con el análisis mediante RIA para determinar las reticulaciones de desmosina, de elastina que se purifica a partir de aorta humana usando el método anterior. Para estos experimentos, se trata un total de 6 aortas diferentes usando este protocolo, y se realiza el análisis de aminoácidos en 4 de las 6 muestras. Se realiza la cuantificación de desmosina en todas las muestras tal como se resume en la tabla 4.

TABLA 4: Análisis de AA y desmosina para elastina procedente de aorta humana: (por 1.000 residuos totales)

Aminoácido	Muestra 54	Muestra 55	Muestra 56	Muestra 57	Esperado
*cys	0	0			3
asx	7	7	5	6	2
thr	9	8	5	5	14
ser	6	6	3	3	9
glx	21	21	20	19	3
pro	116	116	111	111	129
gly	332	331	353	353	312
ala	263	263	261	259	239
val	114	116	127	127	137
*met	0	0	0	0	0
ile	23	25	21	21	24
leu	60	61	55	58	65
*tyr	13	14	5	3	23
phe	24	25	19	21	24
his	0	0	0	0	0
lys	6	7	11	9	9
arg	5	4	5	5	9
Des (pM/mg)	12332	13291	19793	11904	

* Cys, Tyr y Met se destruyen parcialmente durante la hidrólisis ácida
 Las unidades de desmosina están en (picomoles/mg de proteína)

Tal como se muestra en la tabla 4, los valores de alanina están muy por encima de 200 residuos por 1.000 residuos totales, y los valores de valina están muy por encima de 70 residuos por 1.000 residuos. Éstos concuerdan con proteína elastina muy pura. Además, los valores de reticulaciones de desmosina son muy altos, y son comparables a o mayores que los notificados para preparaciones de elastina a partir de una variedad de especies (véase la tabla 5):

Tabla 5: Desmosina procedente de aortas de diferentes especies (pM/mg de proteína)

picomol/mg de proteína	
Vaca	12573
Cerdo	13934
Mono	10948
Rata	6266
Perro	12942

Un método alternativo según la presente invención consiste en aislar elastina a partir de aorta humana usando una digestión con pepsina. La figura 2 muestra una inmunotransferencia de proteínas aisladas a partir de aorta humana usando digestión con pepsina, y que se hacen reaccionar con anticuerpo anti-elastina. Para tiempos de digestión

que oscilan entre 2-5 horas, se libera abundante proteína que reacciona con el anticuerpo contra elastina, teniendo pesos moleculares (PM) en el intervalo aproximado de 100-500 kDa (es decir, mayor que 100 kDa).

Ejemplo 5: Implantación de elastina purificada *in vivo*

Un inconveniente de otras preparaciones de elastina es una tendencia a calcificar *in vivo*. La implantación en ratas jóvenes (es decir, de 21 días de edad) es un ensayo extremadamente sensible para la calcificación. Con el fin de determinar la propensión de la elastina humana que se aísla según la presente invención a calcificar, se implantó la elastina por vía subdérmica en ratas. Se aisló la elastina humana a partir de aorta según la presente invención usando descelularización basada en sales seguida por extracción con NaOH tal como describe en el ejemplo 4. Se comparó la calcificación con la inducida por elastina bovina purificada (adquirida comercialmente), aorta de rata singénica (que contiene elastina de rata), e inyección de control de solución salina tamponada con fosfato. Los implantes permanecieron *in situ* durante 21 días y luego se explantaron. Se evaluó la calcificación histológicamente, usando la tinción con rojo de alizarina, que produce un color marrón rojizo en tejidos calcificados. Además, se determinó cuantitativamente la acumulación de calcio en los sitios de implante mediante espectroscopía de absorción atómica.

La figura 3 muestra la espectroscopía de absorción atómica del contenido en calcio de tejidos explantados de ratas jóvenes que contenían diversos implantes de elastina o implantes de control. Las barras de error son la desviación estándar de la media. Se analizaron diversas muestras: tejido subcutáneo de ratas jóvenes, control negativo (tejido subcut.); portador de solución salina tamponada con fosfato (PBS); aorta de rata singénica, que contenía elastina de rata singénica (elastina de rata); elastina humana aislada según la presente invención, a partir de aorta fresca (E56); elastina humana aislada según la presente invención, a partir de aorta fresca, esterilizada mediante radiación gamma (E56 gamma); elastina humana aislada según la presente invención, a partir de aorta congelada (E59); elastina humana aislada según la presente invención, a partir de aorta congelada, esterilizada mediante radiación gamma (E59 gamma); elastina bovina purificada obtenida de Elastin Products Co. (B-elastina); elastina bovina purificada de Elastin Products Co, esterilizada mediante radiación gamma (B-elastina gamma); forma inyectable de elastina bovina obtenida de Elastin Products Co. (inyección de B-elastina); forma inyectable de elastina bovina obtenida de Elastin Products Co, esterilizada mediante radiación gamma (inyección de B-elastina gamma); y portador de solución salina tamponada con fosfato (inyección de PBS)

Los resultados de la espectroscopía de absorción atómica muestran que los niveles de calcio en explantes que tienen elastina que se aísla a partir de aorta humana no congelada según la presente invención no son diferentes de los niveles de calcio en tejidos a los que se les inyecta portador de PBS. Sin embargo, los resultados muestran que cuando se aisló elastina según la presente invención a partir de aorta congelada, aumentó significativamente la calcificación de tejido. En términos generales, no parece haber ningún impacto de la esterilización mediante radiación gamma sobre el grado de calcificación de tejido para ninguna de las formas de elastina que se somete a prueba (véase la figura 3 para los resultados de espectroscopía de absorción atómica y la tabla 6 para un resumen de los valores cuantitativos de calcio correspondientes en explantes de tejido)

La figura 4 muestra la tinción de muestras de tejido explantado de ratas jóvenes a las que se les implantó elastina que se aisló según la presente invención, y elastina bovina. A,B: tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de tejidos explantados 21 días tras la implantación de elastina humana que se aisló según la presente invención ("humacito") y elastina bovina obtenida comercialmente ("bovina"). C,D: tinción con rojo de alizarina de tejidos explantados 21 días tras la implantación de elastina humana que se aisló según la presente invención ("humacito") y elastina bovina obtenida comercialmente ("bovina"). Las flechas en el panel D indican zonas de calcificación visible.

La figura 5 muestra la tinción de muestras de tejido explantado de ratas jóvenes a las que se les implantó elastina que se aisló según la presente invención, y elastina de rata singénica procedente de aorta de rata. A,B: tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de tejidos explantados 21 días tras la implantación de elastina humana que se aisló según la presente invención ("humacito") y aorta de rata singénica que contenía elastina ("rata"). C,D: tinción con rojo de alizarina de tejidos explantados 21 días tras la implantación de elastina humana que se aisló según la presente invención ("humacito") y aorta de rata singénica que contenía elastina ("rata"). Las flechas en el panel D indican zonas probablemente de calcificación.

La figura 6 muestra la tinción de muestras de tejido explantado de ratas jóvenes a las que se les implantó elastina que se aisló según la presente invención, y portador de solución salina tamponada con fosfato. A,B: tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de tejidos explantados 21 días tras la implantación de elastina humana que se aisló según la presente invención ("humacito") y portador ("PBS"). C,D: tinción con rojo de alizarina de tejidos explantados 21 días tras la implantación de elastina humana que se aisló según la presente invención ("humacito") y portador ("PBS"). Las flechas en el panel D indican zonas de posible calcificación.

La tinción con H&E junto con una tinción con rojo de alizarina de tejido explantado de ratas jóvenes para determinar la calcificación en las figuras 4-6 confirma los resultados de la espectroscopía de absorción atómica en la figura 3 y la tabla 6 con respecto al grado de calcificación de tejido, y muestra que la elastina humana que se aísla según la

presente invención a partir de tejido no congelado no induce calcificación *in vivo*, usando un sistema de modelo de implantación extremadamente sensible.

Tabla 6: niveles de calcio en muestras explantadas:

Calcio procedente de tejido explantado				
Grupo	Fuente de elastina	Promedio	Desv. est.	N
Tejido subcut. de rata	N/D	0,25	0,160421877	4
Portador de PBS	N/D	0,49	0,383992568	6
Elastina de rata	Aorta fresca	2,80	3,808000837	2
E56 - Humacito	Aorta humana fresca	0,47	0,195592829	3
E - 56 Humacito gamma	Aorta humana fresca	0,44	0,081904605	3
E59-Humacito (congelado)	Aorta humana congelada	23,73	6,610771334	3
E59-Humacito gamma (congelado)	Aorta humana congelada	46,36	17,10482952	3
Elastina bovina	Elastin Products Co.	22,26	4,662817486	6
Elastina bovina, gamma	Elastin Products Co.	28,97	11,63379649	6
Inyectable bovino	Elastin Products Co.	4,76	5,485544335	4
Inyectable bovino, gamma	Elastin Products Co.	9,95	9,181395142	6
Portador de PBS	N/D	0,46	0,172634466	5

5

Ejemplo 6: Aislamiento de colágeno humano a partir de SMC sobre microperlas portadoras

También pueden cultivarse células de músculo liso vascular humano sobre microperlas portadoras en un cultivo en suspensión tal como se describe en el presente documento. Durante el periodo de cultivo, se replican las células de músculo liso sobre la superficie de las perlas, y depositan matriz extracelular colagenosa. Entonces se recoge la matriz colagenosa y se purifica según la presente invención. Las etapas específicas en este procedimiento son tal como sigue:

1. Cultivar células de músculo liso humanas en un matraz de cultivo convencional en condiciones adecuadas para el crecimiento las células, en medio de cultivo completo que contiene al menos suero al 10%.

2. Esterilizar el matraz de agitación mediante tratamiento en autoclave.

3. Pesar 2,0 g de microperlas portadoras Cytodex-1 y mezclar con 500 ml de PBS, luego esterilizar mediante tratamiento en autoclave.

4. Pipetear 10 ml de suspensión de microperlas portadoras en un reactor de matraz de agitación.

5. Tripsinizar células de músculo liso vascular y sembrarlas sobre perlas en un matraz de agitación un total de 5 millones de células en 25 ml de medio de crecimiento celular.

6. Cultivar células sobre perlas en presencia de medio de DMEM que contiene al menos suero al 10%, ácido ascórbico (50 mg/l), factores de crecimiento tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (10 ng/ml), factor de crecimiento de fibroblastos básico (10 ng/ml), factor de crecimiento epidérmico (3 ng/ml), prolina 50 mg/l, glicina 50 mg/l, alanina 20 mg/l, sulfato de cobre 3 ng/ml

7. Agitar el matraz a baja velocidad, preferiblemente de no más de 10 revoluciones por minuto, durante el cultivo.

8. Complementar con vitamina C dos veces a la semana, y sustituir los cultivos por nuevo medio una vez a la semana.

9. Tras 4-12 semanas de cultivo de células de músculo liso sobre perlas, retirar por decantación el sobrenadante del medio de cultivo y retener las perlas que contienen células y la matriz colagenosa.

10. Digerir la perla y el material tisular en pepsina (concentración de pepsina de 0,5 a 2,0 mg/ml disuelta en una disolución de bajo pH) a 4-20°C. La agitación durante la digestión ayudará en el procedimiento.

11. Una vez que se ha completado la digestión, centrifugar brevemente para retirar cualquier cantidad de material no digerido mediante filtración, para retirar las microperlas portadoras.

12. Retirar el sobrenadante y elevar el pH de la disolución hasta aproximadamente pH 8,5 añadiendo lentamente

NaOH para inactivar la pepsina.

13. Usando HCl, llevar el pH de la disolución de nuevo a aproximadamente pH 3,5.

5 14. Clarificar la disolución de colágeno usando tierra de diatomeas.

15. Precipitar el colágeno clarificado añadiendo NaCl a la disolución. Precipitar a 4°C durante >24 h.

10 16. Recoger el colágeno precipitado mediante centrifugación con enfriamiento a altas velocidades durante ~30 minutos.

17. Aspirar cuidadosamente el sobrenadante y resuspender los colágenos precipitados en HCl enfriado con hielo. Permitir que las moléculas de colágeno se solubilizan completamente.

15 18. Dializar la disolución para purificar adicionalmente el colágeno.

19. Concentrar el colágeno hasta el nivel deseado.

20 20. Almacenar este colágeno purificado en disolución.

21. Añadir disolución de difosfato de sodio esterilizada por filtración al colágeno concentrado, purificado, hasta que se alcance una concentración final de aproximadamente 20-50 mM y aproximadamente pH 7,4. Incubar a 22-37°C durante > 24 horas.

25 Se comparó la pureza del producto solubilizado resultante producido tal como se describe en el presente documento con otros colágenos humanos purificados procedentes de fuentes comerciales mediante electroforesis en gel de poliacrilamida tal como se muestra en la figura 7. El carril 1 muestra 20 microgramos de colágeno humano PureCol, Inamed Biomaterials. El carril 2 muestra 10 microgramos de colágeno derivado de fibroblastos dérmicos humanos. El carril 3 muestra 10 microgramos de colágeno humano derivado de células de músculo liso vascular y purificado tal como se describe en el presente ejemplo. Se tiñó el gel con azul de Coomassie para la detección de proteínas. Las bandas de colágeno típicas alfa, beta y gamma estaban presentes en todas las muestras. Los resultados en la figura 7, carril 3, demuestran la alta pureza del colágeno producido mediante los presentes métodos en comparación con otras muestras de colágeno humano sumamente purificado.

35 Ejemplo 7: Formulación de material de colágeno inyectable:

Puede formularse colágeno en un producto inyectable que puede administrarse a pacientes. Se recoge colágeno soluble a partir de tejido vascular modificado por ingeniería usando el procedimiento contenido en el ejemplo 1. Se centrifuga el colágeno precipitado y se retira el sobrenadante mediante aspiración. Entonces se resuspende el colágeno precipitado en una disolución tampón de solución salina fisiológica que es farmacéuticamente aceptable (tal como disolución de cloruro de sodio al 0,9%) que puede contener lidocaína al 0,3%. Se agita la mezcla para garantizar un mezclado uniforme, y se ajusta el pH a aproximadamente 7,0. Se valora el volumen de disolución de resuspensión de manera que la concentración final de colágeno sea de aproximadamente 30 mg/ml. Entonces se dispensa la disolución de colágeno en jeringas estériles y se envasa de manera estéril, para aplicaciones clínicas.

45 Ejemplo 8: Formulación de material compuesto de colágeno y elastina inyectable:

Pueden combinarse colágeno y elastina en un producto compuesto que es inyectable. Se recoge colágeno soluble de tejido vascular modificado por ingeniería usando el procedimiento contenido en el ejemplo 1. Se centrifuga el colágeno precipitado y se retira el sobrenadante mediante aspiración. Entonces se resuspende el colágeno precipitado en una disolución tampón de solución salina fisiológica que es farmacéuticamente aceptable (tal como disolución de cloruro de sodio al 0,9%) que puede contener lidocaína al 0,3%. Se agita la mezcla para garantizar un mezclado uniforme, y se ajusta el pH a aproximadamente 7,0. Se valora el volumen de disolución de resuspensión de manera que la concentración final de colágeno sea de aproximadamente 20 mg/ml.

55 Para generar la formulación inyectable compuesta de colágeno-elastina, se aísla elastina a partir de tejido aórtico no congelado según el ejemplo 4. Se pulveriza elastina insoluble aislada tras la extracción con éter (con o sin una etapa de congelación previa para ayudar en la formación de partículas) y luego se tamiza en condiciones estériles para seleccionar partículas que sean menores que 50 micrómetros. Entonces se mezclan partículas secas y se suspenden dentro de la disolución que contiene colágeno, con el fin de crear la disolución compuesta de colágeno-elastina. Entonces se dispensa el material compuesto de colágeno-elastina en jeringas estériles y se envasa de manera estéril, para aplicaciones clínicas.

65 Otro medio mediante el que puede hacerse que la elastina sea adecuada para inyección es mediante digestión con pepsina o alguna otra proteasa con actividad elastasa. La digestión de elastina purificada con pepsina a temperatura

5 ambiente o a 37°C durante entre 1-5 horas genera fragmentos de elastina de peso molecular mayor que 100.000. Entonces se purifican los fragmentos de elastina de la pepsina residual utilizando membranas de diálisis de exclusión molecular, y luego se concentran hasta una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml o mayor en un portador fisiológicamente aceptable tal como solución salina al 0,9%. Entonces se combinan los fragmentos de elastina suspendidos, con colágeno precipitado o disolución que contiene colágeno para producir un producto final con una concentración de colágeno de 20 mg/ml, y una concentración de elastina de 10 mg/ml, en solución salina con lidocaína al 0,3%. Entonces se dispensa el material compuesto de colágeno-elastina en jeringas estériles y se envasa de manera estéril, para aplicaciones clínicas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición inyectable que comprende elastina humana aislada, colágeno humano aislado y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que la elastina humana es sustancialmente insoluble en agua con un peso molecular mayor que 100 kDa.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el colágeno humano aislado
- a) se deriva de tejido vascular modificado por ingeniería,
 - b) se deriva de un cultivo sobre microperlas, o
 - c) tiene un peso molecular de 100 a 500 kDa.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, en la que la elastina humana aislada
- a) se deriva de tejido vascular modificado por ingeniería o tejido vascular nativo, o
 - b) está reticulada.
- 20 4. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende 10-100 mg/ml de colágeno humano aislado, opcionalmente en la que la composición comprende 30 mg/ml de colágeno humano aislado.
- 25 5. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende de 2 a 60 mg/ml de elastina humana aislada, opcionalmente en la que la composición comprende de 3 a 30 mg/ml de elastina humana aislada.
- 30 6. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además
- a) glicosaminoglicanos humanos aislados,
 - b) tejido adiposo, o
 - c) fibroblastos dérmicos.
- 35 7. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además uno o más agentes activos seleccionados del grupo que consiste en uno o más agentes antiinflamatorios, agentes de formación de tejido, agentes de formación de tejido adiposo, anestésicos, antioxidantes, heparina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos, péptidos activadores de tejido conjuntivo, β -tromboglobulina, factores de crecimiento similares a insulina, factores de necrosis tumoral, interleucinas, factores estimulantes de colonias, eritropoyetina, factores de crecimiento nerviosos, interferones o combinaciones de los mismos.
- 40 8. Relleno dérmico o subdérmico que comprende la composición según la reivindicación 1.
- 45 9. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha elastina se aísla a partir de tejido vascular no congelado humano y en la que la composición no induce calcificación *in vivo*.
- 50 10. Composición inyectable que comprende colágeno humano aislado, elastina humana aislada y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que la elastina humana es sustancialmente insoluble en agua con un peso molecular de más de 100 kDa para su uso en un método de aumento terapéutico de tejido blando en un sujeto, en la que la composición no induce una respuesta inflamatoria o inmunitaria y no induce calcificación.
- 55 11. Composición para el uso según la reivindicación 10, en la que el aumento terapéutico de tejido blando mejora un estado seleccionado del grupo que consiste en labio leporino, corrección de deformidades menores debidas a enfermedad, deformidades de las cuerdas vocales o la glotis, deformidades del labio, deformidades de las mamas, deformidades del mentón; deformidades de los pómulos y/o la nariz, acné, cicatrices quirúrgicas y cicatrices debidas a daño por radiación o cicatrices por traumatismos.
- 60 12. Composición para el uso según la reivindicación 10, en la que el tejido blando está ubicado en el suelo pélvico, en la zona periuretral, próximo al cuello de la vejiga o en la unión de la vejiga y el uréter.
- 65

13. Composición para el uso según la reivindicación 10, en la que
- a) el aumento terapéutico de tejido blando aumenta el volumen tisular,
 - 5 b) la composición se inyecta en la piel, o
 - c) la composición se inyecta bajo la piel.
- 10 14. Uso de una composición inyectable que comprende colágeno humano aislado, elastina humana aislada y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que la elastina humana es sustancialmente insoluble en agua con un peso molecular de más de 100 kDa en el aumento no terapéutico de tejido blando en un sujeto, en el que la composición no induce una respuesta inflamatoria o inmunitaria y no induce calcificación.
- 15 15. Uso según la reivindicación 14, en el que el aumento no terapéutico de tejido blando mejora un estado seleccionado del grupo que consiste en líneas, pliegues, arrugas, depresiones faciales menores, corrección de deformidades menores debidas a envejecimiento, patas de gallo y el surco orbitario alrededor del ojo, aumento de mentón; y ritides.
- 20 16. Uso según la reivindicación 14, en el que
- a) el aumento no terapéutico de tejido blando aumenta el volumen tisular,
 - 25 b) la composición se inyecta en la piel, o
 - c) la composición se inyecta bajo la piel.
- 30 17. Kit para el aumento de un tejido blando que comprende la composición según la reivindicación 1, una jeringa, un envoltorio estéril que rodea dicha jeringa y que proporciona un entorno estéril para dicha jeringa y cualquier otro material y/o reactivos necesarios.
- 35 18. Kit según la reivindicación 17, en el que dichos reactivos incluyen agentes seleccionados del grupo que consiste en heparina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos, péptidos activadores de tejido conjuntivo, β -tromboglobulina, factores de crecimiento similares a insulina, factores de necrosis tumoral, interleucinas, factores estimulantes de colonias, eritropoyetina, factores de crecimiento nerviosos, interferones, factores ostogénicos y proteínas morfogenéticas óseas.

FIG. 1

Gel de colágeno procedente de tejido vascular

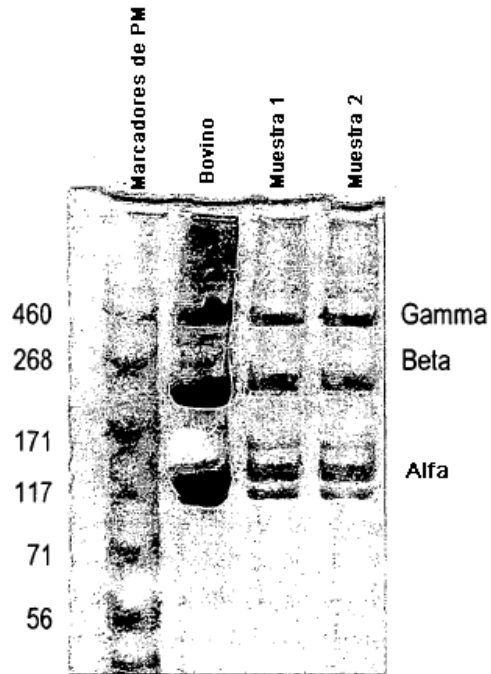
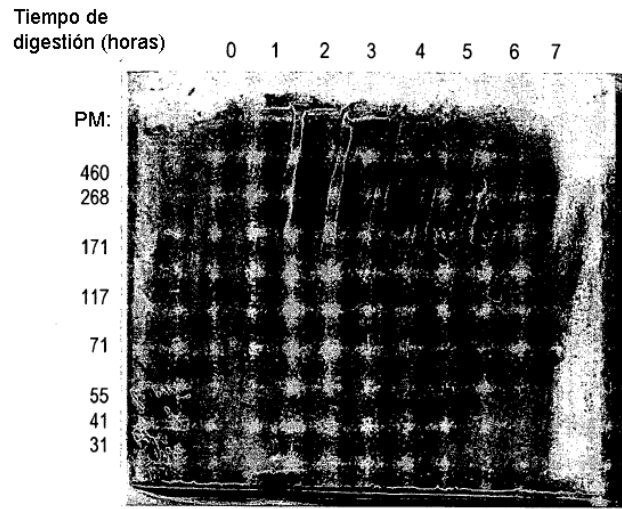


FIG. 2



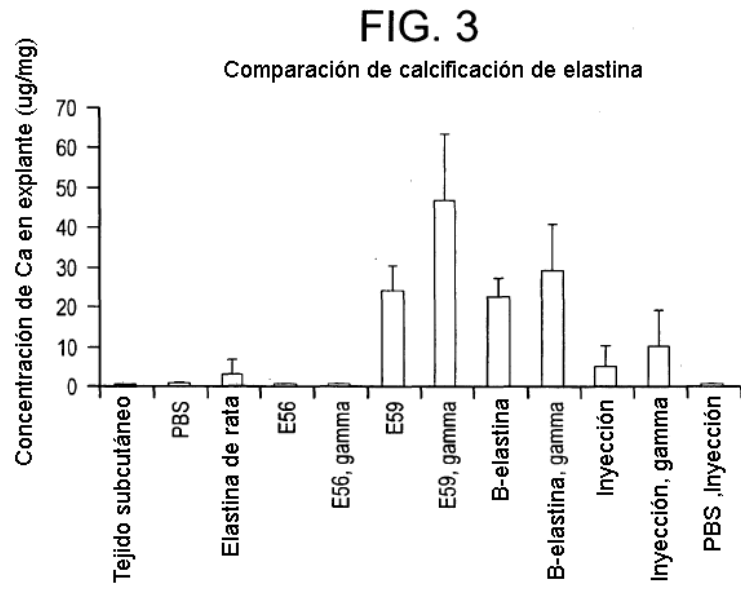


FIG. 4A

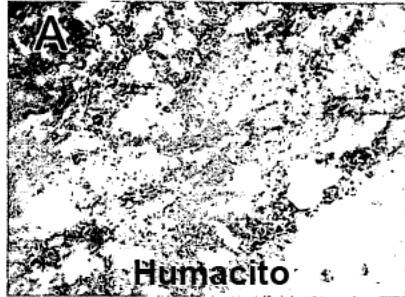


FIG. 4B



FIG. 4C



FIG. 4D

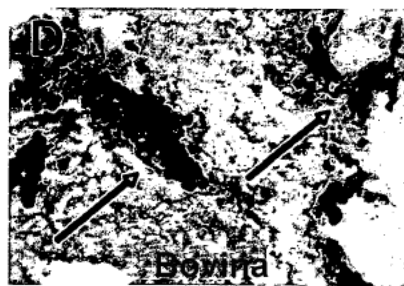


FIG. 5A



FIG. 5B

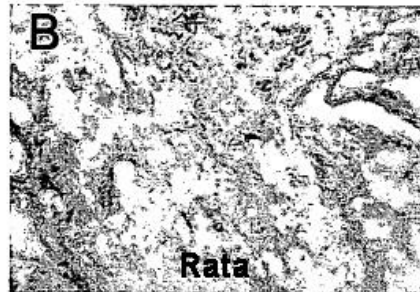


FIG. 5C

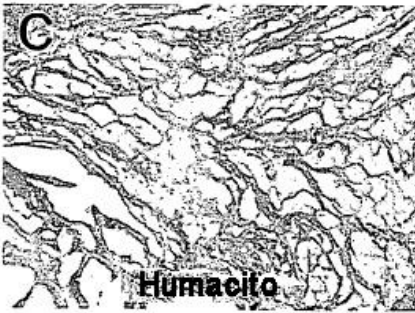


FIG. 5D



FIG. 6A

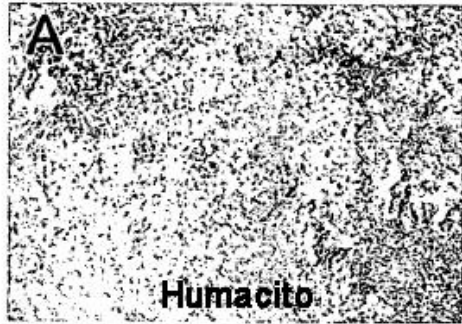


FIG. 6B

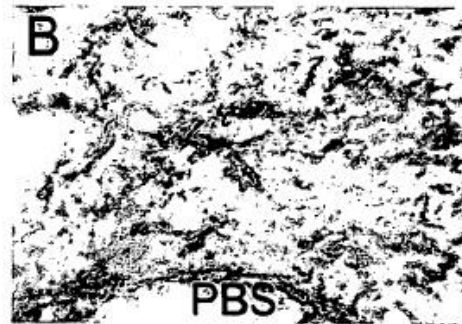


FIG. 6C

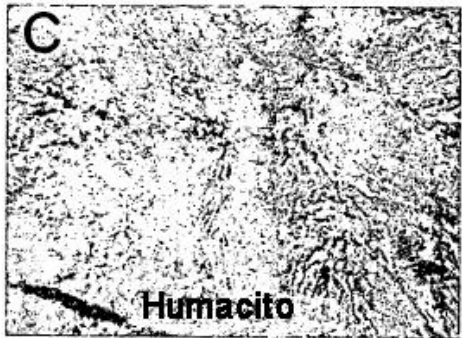


FIG. 6D

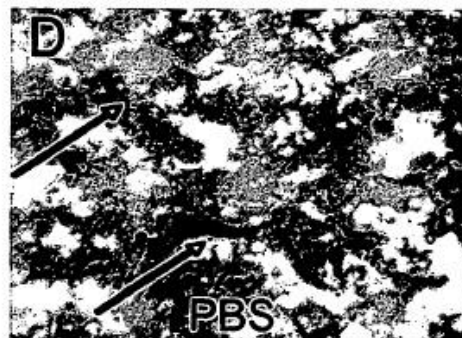


FIG. 7

